

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS  
BIOTECNOLÓGICOS**

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS E  
TERMODINÂMICOS PARA A CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS  
A PARTIR DA DISSOLUÇÃO E DO TEMPO DE INDUÇÃO**

Monografia apresentada à Faculdade de  
Engenharia Química da Universidade  
Estadual de Campinas como parte do  
exame de obtenção do título de Mestre  
em Engenharia Química.

**Mestrando: Eng. André Bernardo**

**Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda**

**Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Calmanovici**

Campinas – São Paulo

Julho de 2002

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC  
 Nº CHAMADA T17UNICAMP  
B456d  
 V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
 TOMBO SCI 51241  
 PROC 16.837102  
 C \_\_\_\_\_ DY \_\_\_\_\_  
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 23/10/02  
 Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00175034-6

BIBID. 265163

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

B456d Bernardo, André  
 Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a cristalização de proteínas a partir da dissolução e do tempo de indução / André Bernardo.--Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadores: Everson Alves Miranda; Carlos Eduardo Calmanovici.  
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

1. Insulina. 2. Lisozima. 3. Crescimento. 4. Solubilidade. 5. Precipitação (Química). 6. Cristalização. I. Miranda, Everson Alves. II. Calmanovici, Carlos Eduardo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

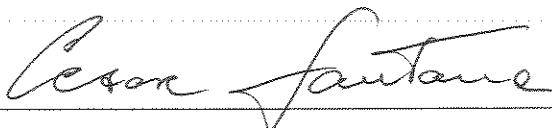
Dissertação de Mestrado defendida por André Bernardo e aprovada em 17 de Julho de 2002 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



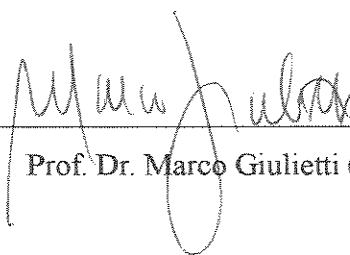
Prof. Dr. Everson Alves Miranda – Orientador



Prof. Dr. Carlos Eduardo Calmanovici - Co-orientador



Prof. Dr. César Costapinto Santana (titular)



Prof. Dr. Marco Giuliatti (titular)

6576/20

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
- 30 CIRCULANTE

Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por André Bernardo, e aprovada pela Comissão Julgadora em 17 de Julho de 2002.



---

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

*À minha mãe, por tudo.*

## *Agradecimentos*

Gostaria de agradecer aos meus orientadores que durante todo o trabalho complementaram a orientação imprescindível à boa feitura deste trabalho. Prof. Dr. Carlos Eduardo Calmanovici usou a indesejável distância para, com imparcialidade e sabedoria, fazer intervenções corretas no andamento e boa conclusão do trabalho. Prof. Dr. Everson Alves Miranda, mais próximo por força das circunstâncias, apresentou-me ao mundo único das proteínas e motivou-me sempre com elogios fartos e poucas críticas, sempre construtivas.

Agradeço também aos colegas de laboratório Adriana, Adriano, Antenor, Chrissana, Cristiane, Gisele, Isa, Kátia, Luciana, Oselys, Rosana, Sindélia e Victor que, dividindo o mesmo espaço de trabalho, têm o mérito de me terem suportado. Obrigado àqueles que, mais do que colegas, foram amigos que me orientaram nos momentos de dificuldade e dividiram risos e alegrias, e cujas amizades espero carregar para o resto da vida. Agradeço ao amigo Rodrigo, sempre paciente, com quem amadureci e me diverti um bocado.

Obrigado aos colegas de IPT, que tiveram paciência e palavras de incentivo. Obrigado Marco Giulietti e Silas Derenzo pelas orientações no começo difícil dos experimentos. Obrigado ao técnico Pierre Delmorio e ao estagiário Rafael Cândido do Agrupamento de Processos Químicos pela feitura das análises. Obrigado à Emília e ao Gustavo do Departamento de Metalurgia, onde foi possível a realização das análises de raios-X.

Obrigado à Fapesp pelo imprescindível apoio financeiro. Obrigado a todos que, se não colaboraram com o desenvolvimento do trabalho, fizeram parte da minha vida neste período.

*Ao vencedor, as batatas.*

*(Machado de Assis)*

## RESUMO

A cristalização de proteínas tem sido tradicionalmente aplicada como uma técnica de apoio a estudos cristalográficos, sendo referida muitas vezes como uma arte mais do que uma ciência. A cristalização como uma operação de recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) tem sido sub-utilizada devido principalmente à carência de parâmetros cinéticos e termodinâmicos que auxiliem no projeto adequado de processos industriais. Neste contexto, o tempo de indução, definido como o tempo transcorrido desde o estabelecimento da supersaturação até a formação e crescimento a um tamanho detectável dos núcleos, medido em diferentes níveis de supersaturação e temperatura, é um parâmetro relativamente fácil de se obter e permite a inferência da cinética de nucleação e da tensão interfacial.

O presente trabalho apresenta medidas do tempo de indução pela variação da absorbância no comprimento de onda de 320 nm da insulina suína e da lisozima de clara de ovo de galinha, os resultados de ensaios de dissolução dessas proteínas em diferentes níveis de pH e temperatura, a partir dos quais foram determinados a solubilidade e o calor de dissolução. Os ensaios de medida do tempo de indução em diferentes concentrações permitiram inferir a influência do pH na cinética de nucleação e na tensão interfacial.

Dos ensaios de dissolução, pôde-se observar a existência de polimorfismo nas proteínas estudadas – confirmado por análises de raios-X – e que a insulina tem solubilidade retrógrada. Também, a partir desses resultados, foi possível estimar a cinética de crescimento da insulina. Das medidas de tempo de indução, observou-se que as interações eletrostáticas são preponderantes na nucleação de proteínas e que a resistência à nucleação diminui exponencialmente com o aumento da carga superficial das proteínas.

*Palavras-chave: tempo de indução, insulina, lisozima, nucleação, crescimento, solubilidade.*

## ***ABSTRACT***

The crystallization of proteins has been traditionally applied as an auxiliary technique to crystallographic studies, and is often referred as an art more than a science. Crystallization as an operation of recovery and purification of bioproducts (RPB) has been underused mainly because of the lack of kinetic and thermodynamic parameters that allow the adequate design of industrial processes. Therefore, the induction time, defined as the period of time elapsed since the establishment of supersaturation until the appearing and growth to a detectable size of nuclei, is an easily obtainable parameter and allows to infer nucleation kinetics and interfacial tension, when it is measured in different temperatures and supersaturation degrees.

The present work presents induction time measurements by absorbance in 320 nm of porcine insulin and hen egg white lysozyme, the results of dissolution assays of these proteins in different pH and temperature levels, from which were determined the solubility and the heat of dissolution. The induction time measurements in different concentration allowed inferring the influence of pH in the nucleation kinetics and in the interfacial tension.

From dissolution assays, it could be observed protein polymorphism – which was confirmed by X-ray analyses. Moreover, it was determined that insulin has retrograde solubility, besides insulin growth kinetics. It was observed from induction time measurements that the electrostatic interactions are preponderant in protein nucleation and that the resistance to nucleation decreases exponentially as the surface charge of proteins increases.

*Key-words: induction time, insulin, lysozyme, nucleation, crystal growth, solubility.*

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b>	1
1.1.ESCOPO	1
1.2.CRISTALIZAÇÃO	2
1.3.CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	3
1.4.COLOCAÇÃO DO PROBLEMA	6
1.5.OBJETIVO	7
1.6.ETAPAS DESENVOLVIDAS	8
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA</b>	9
2.1.TEMPO DE INDUÇÃO	9
2.2.MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INDUÇÃO	13
2.3. CARACTERÍSTICAS DA INSULINA E DA LISOZIMA PERTINENTES À CRISTALIZAÇÃO	15
2.3.1. Insulina	15
2.3.1. Lisozima	17
<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS</b>	19
3.1.MATERIAIS	19
3.1.1. Reagentes	19
3.1.2. Principais Equipamentos	19
3.2.PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	20
3.2.1. Determinação de Proteína	20
3.2.2. Determinação da solubilidade por dissolução em agitação recíproca	20
3.2.3. Determinação da solubilidade por dissolução em agitação por tombamento	20
3.2.4. Determinação da solubilidade por dissolução em agitação por barra magnética	21

3.2.5. Verificação da desnaturação da insulina suína por fibrilação.....	21
3.2.6. Verificação do comportamento polimórfico da insulina suína.....	21
3.2.7. Verificação do comportamento polimórfico da lisozima.....	22
3.2.8. Medida do tempo de indução por absorbância de UV.....	22
<b>3.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....</b>	<b>23</b>
3.3.1. Análise de difração de raios-X das proteínas originais e processadas.....	23
3.3.2. Determinação do potencial zeta das proteínas.....	23
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.DETERMINAÇÃO DE SOLUBILIDADE.....</b>	<b>24</b>
4.1.1.A dissolução da insulina e o indício de comportamento polimórfico.....	24
4.1.2.A dissolução da lisozima e a repetição do comportamento polimórfico.....	41
<b>4.2.O CRESCIMENTO CRISTALINO DA INSULINA E DA LISOZIMA.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.O TEMPO DE INDUÇÃO.....</b>	<b>53</b>
4.3.1.Estudo da Nucleação da Insulina Suína.....	53
4.3.2.Estudo da Nucleação da Lisozima.....	63
<b>4.4. A INFLUÊNCIA DAS INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....</b>	<b>73</b>
5.1.CONCLUSÃO.....	73
5.2. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	74
<b>CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

<b><i>A.1. POLIMORFISMO</i></b> .....	82
<b><i>A.2. EFEITO DA AGITAÇÃO E DA ADIÇÃO DE ZINCO NA DISSOLUÇÃO DA INSULINA</i></b> .....	84
<b><i>A.3. FIBRILAÇÃO DE INSULINA</i></b> .....	87
<b><i>A.4. CÁLCULOS DETALHADO PRA AS ESTIMATIVAS DE CRESCIMENTO CRISTALINO DAS PROTEÍNAS ESTUDADAS</i></b> .....	89

## NOMENCLATURA

### Latinas

a: atividade do soluto;  
 a\*: atividade de equilíbrio do soluto no sistema;  
 a<sub>4</sub>: fator de forma  $\pi/3$  para esferas;  
 A: coeficiente linear da equação (11);  
 B: constante que é parte do coeficiente angular da equação (11) e depende da tensão interfacial do sistema;  
 C: concentração do soluto no sistema (mg/mL);  
 C\*: concentração de equilíbrio do soluto no sistema (mg/mL);  
 D: diâmetro da célula unitária (nm);  
 D: coeficiente de difusividade (cm<sup>2</sup>/s ou mm<sup>2</sup>/s);  
 E<sub>att</sub>: energia de ativação da nucleação (kJ/mol);  
 f: fator igual a um para a nucleação homogênea e menor que 1 para a nucleação heterogênea;  
 g: ordem de crescimento  
 G: taxa de crescimento (mm/s ou cm/s);  
 J: taxa de nucleação (#/(m<sup>3</sup>·s));  
 J<sub>est</sub>: taxa de nucleação estacionária (#/(m<sup>3</sup>·s));  
 k<sub>B</sub>: constante de Boltzman ( $1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K);  
 k<sub>d</sub>: coeficiente de transferência de massa (cm/s ou mm/s);  
 k<sub>G</sub>: constante de crescimento (cm/s ou mm/s);  
 k<sub>N</sub>: constante de nucleação (#/(m<sup>3</sup>·s));  
 k<sub>v</sub>: fator de forma volumétrico;  
 L: comprimento característico do cristal (μm);  
 m: massa de insulina em solução (mg);  
 n: ordem de nucleação;  
 N: número de núcleos do sistema;  
 N<sub>A</sub>: número de Avogadro ( $6,022 \cdot 10^{23}$  mol<sup>-1</sup>);  
 P<sub>1</sub>: probabilidade de que pelo menos um núcleo seja formado no sistema de volume V dentro de um tempo t;  
 P<sub>2</sub>: probabilidade de que uma quantidade detectável da nova fase seja formada no sistema dentro de um tempo t;  
 R: constante geral dos gases (8,3145 J/(mol·K));  
 S: supersaturação adimensional (C/C\*);  
 t: tempo (s);  
 T: temperatura absoluta (K);  
 t\*: tempo de indução real (s);  
 t<sub>ind</sub>: tempo de indução (s);  
 t<sub>MN</sub>: tempo médio para o aparecimento do primeiro núcleo no sistema;  
 t<sub>PN</sub>: tempo para o surgimento de um número estatisticamente grande de núcleos no sistema;  
 V: volume do sistema;  
 V<sub>macr</sub>: volume macroscópico da nova fase do sistema.

*Gregas*

$\alpha$ : fração específica da nova fase do sistema ( $V_{\text{macr}}/V$ );

$\beta$ : fator de forma  $16\pi/3$  para esferas;

$\delta$ : espessura da camada limite estagnante ( $\mu\text{m}$ );

$\gamma_s$ : tensão interfacial ( $\text{J}/\text{m}^2$ );

$\eta$ : viscosidade da solução ( $\text{cP}$ );

$v$ : volume molecular ( $\text{m}^3$ );

$\rho_c$ : densidade do cristal ( $\text{kg}/\text{m}^3$ );

$\sigma$ : supersaturação relativa  $(C - C^*)/C^*$ ;

$\zeta$ : potencial zeta ( $\text{mV}$ ).

## *CAPÍTULO 1*

### *INTRODUÇÃO*

#### *1.1. ESCOPO*

O escopo deste trabalho é a aplicação de princípios de Engenharia Química no entendimento de uma operação para purificação de biomoléculas. Este trabalho insere-se no campo da Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB) também conhecida como *Downstream Processing*, considerada uma das etapas mais laboriosas e de alto custo em um bioprocessamento, uma vez que números elevados de operações sequenciais são frequentemente necessários até que o nível de pureza requerido seja atingido. O nível de pureza a se atingir é estabelecido em função da finalidade da molécula alvo, sendo que maiores níveis de pureza são exigidos no caso de moléculas aplicadas como fármacos. Neste caso, o custo da RPB no processo produtivo pode atingir até 80% do custo da produção.

Com a crescente geração de produtos biológicos, decorrente do grande desenvolvimento da biotecnologia na década de 90, surgiu a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias de RPB, buscando uma maior eficiência em termos de retenção nos custos de processamento associada a uma maior qualidade do produto. Dentre estas novas tecnologias, a cristalização, como uma etapa de refinamento do produto, é uma das mais simples e eficazes operações de separação e purificação, podendo proporcionar alta pureza e estabilidade do produto, em uma única etapa.

## 1.2. CRISTALIZAÇÃO

Sempre que partículas são formadas por cristalização em solução, dois processos fundamentais, a nucleação e o crescimento de cristais, estão envolvidos, e um bom entendimento destes fenômenos é essencial para lidar com a tecnologia de cristalização e os subseqüentes problemas de separação sólido-líquido.

Esses dois fenômenos que participam da formação das partículas podem, simplificarmente, ser associados a duas fases distintas e seqüenciais: uma fase de indução envolvendo a formação de núcleos, seguida pela fase de crescimento durante a qual moléculas de soluto adicionais condensam-se na superfície dos núcleos. As partículas então formadas continuam a crescer e aglomerar até que um estado de equilíbrio seja alcançado. Para que as moléculas de soluto saiam da solução e iniciem a formação de partículas, a concentração de soluto solúvel deve ser maior que o valor de solubilidade, isto é, a solução deve estar em um estado metaestável, supersaturada com relação às espécies de soluto. Como estruturas organizadas com superfícies definidas são criadas a partir de uma distribuição aleatória das moléculas em solução, nucleação e crescimento são processos consumidores de energia. Esse requerimento de energia implica na necessidade da solução atingir um dado nível de supersaturação para que se formem núcleos e ocorra a cristalização. A força motriz para os processos envolvidos na formação de partículas é a magnitude da supersaturação, sendo as cinéticas dos dois processos afetadas diferentemente pelo grau de supersaturação.

A nucleação é a geração espontânea, por associação molecular não-covalente na fase líquida supersaturada metaestável, de um agregado (*cluster*) estável de tamanho ultramicroscópico. Inicialmente, tais agregados de moléculas formam-se e aumentam de tamanho pela adição continuada de moléculas. A medida em que seus tamanhos aumentam, aumentam seus potenciais químicos. Muitos dos agregados, que são indistinguíveis da solução, são instáveis e se dissociam. Os agregados mais estáveis continuam a crescer até um tamanho crítico para formar núcleos que têm máximo potencial químico. A taxa de nucleação é uma função exponencial do grau de supersaturação e torna-se infinita no máximo nível de supersaturação. Este máximo é chamado de limite de supersolubilidade.

Portanto, poucos núcleos serão formados por unidade de tempo a baixos níveis de supersaturação, enquanto que o número máximo de núcleos formados por unidade de tempo ocorrerá no limite de supersolubilidade (Boistelle e Astier, 1988).

Núcleos estão na fronteira da transição entre as fases líquida e sólida. Uma vez formados, eles agem como centros para deposição de moléculas de solutos adicionais. Nem todos os núcleos continuam a crescer; muitos desagregam e as moléculas liberadas podem então condensar em núcleos mais estáveis em um processo chamado amadurecimento (*ripening*). Agregados cujo tamanho é maior que o do núcleo formam uma fase separada e continuam a crescer para formar os cristais. O crescimento das partículas continua enquanto a solução permanecer supersaturada.

O hábito cristalino, ou forma global do cristal, depende de fatores internos às moléculas (estrutura e ligações) e de fatores externos (supersaturação e composição da solução) (Boistelle e Astier, 1988).

### ***1.3. CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS***

Mais de 90% de todos os produtos farmacêuticos, como tabletes, aerossóis, cápsulas, suspensões e supositórios contêm drogas em forma de particulado geralmente cristalino (Shekunov e York, 2000).

A cristalização de proteínas encontra pouco uso como técnica de separação e purificação em indústrias de bioprocessos, apesar dos altos níveis de pureza e dos bons fatores de separação obtidos por cristalização. Um dos maiores empecilhos é a falta de dados cinéticos e termodinâmicos requeridos para uma cristalização eficiente. A natureza complexa das moléculas de proteína torna suas cristalizações processos difíceis e desafiantes. Embora haja casos onde a cristalização é usada como uma técnica preparatória para obtenção de proteínas puras, a maior parte dos trabalhos nesta área mira na obtenção de grandes cristais individuais para estudos cristalográficos para determinar suas estruturas moleculares (Saikumar et al., 1998).

Segundo Shekunov e York (2000), o comportamento de fase e a cinética de precipitação de proteínas farmacêuticas têm, embora geralmente menos definidas e menos estudadas do que a cristalização de proteínas para estudos estruturais, muitos aspectos analíticos similares que podem ser aplicados.

Desde a primeira cristalização de proteínas por Hartig em 1855, algumas regras empíricas e protocolos são usados para obter cristais de proteínas. Entretanto, o crescimento de cristais, segundo escrevem quase todos os autores nesta área, “mantém-se mais como uma arte do que como uma ciência”. A razão para isso é a natureza heterogênea, complexa de um sistema de cristalização e o longo tempo (às vezes semanas ou mesmo meses) requerido para observar o efeito de uma mudança em um dos parâmetros por inspeção visual (Kam et al., 1978).

Cristais de proteínas têm vantagens definitivas sobre soluções, sólidos amorfos ou pós cristalinos: as moléculas de proteínas são empacotadas de modo mais denso em cristais; suas densidades são algumas vezes maiores do que aquelas que podem ser encontradas em soluções concentradas; cristais podem ser secos, ao menos em casos favoráveis, sem quebrar ou sem desdobramentos moleculares; os cristais secos têm altas estabilidades térmica e mecânica (Ataka e Tanaka, 1986). Apesar da necessidade de adicionar açúcares para proteger a proteína dos cristais da desnaturação durante a desidratação, tal como ocorre para produtos de liofilização, a quantidade de excipientes necessária para estabilizar cristais de proteínas (1:5) é bem menor que a necessária para pós amorfos (20:1) (Shenoy et al., 2001)

Uma proteína não tem de ser “100% pura” com relação a outras proteínas para cristalizar. Em alguns casos, proteínas podem ser purificadas por recristalizações sequenciais. Há casos em que proteínas são cristalizadas a partir de uma solução com 70% de pureza. No entanto, impurezas – outras proteínas – podem inibir a cristalização e, por isso, é recomendável partir de uma solução com pelo menos 90% de pureza para realizar a cristalização (Littlechild, 1991). Como exemplo, a cristalização de ovalbumina a partir de uma solução de concentração de 86% em massa resultou em cristais de ovalbumina com pureza de 99,4% em massa (Judge et al., 1995). Judge et al. (1998), estudando o efeito de impurezas protéicas no crescimento cristalino de lisozima, observaram que a medida da

solubilidade da lisozima não é afetada pela presença de outras proteínas, que avidina (até 3%), ovalbumina (até 50%) e conalbumina (menos de 30%) não têm efeito na cinética de crescimento da lisozima, e que a conalbumina em concentrações acima de 30% afeta o crescimento da face [110] do cristal de lisozima. Os cristais de lisozima obtidos tinham pureza de até 99,9%. No entanto, os autores citam outros trabalhos, nos quais a cristalização foi realizada na presença de impurezas sem sementeira, o que resultou em cristais impuros (até 6% de impureza) e com más formações estruturais, concluindo que a nucleação é a etapa determinante na purificação de proteínas por cristalização.

Pellegrini et al. (1997) criaram um programa computacional para simular a nucleação de proteínas. Eles compararam quantitativamente as estruturas cristalinas dos núcleos simulados por modelagem molecular com as quantidades de diferentes tipos de estruturas cristalinas de um banco de dados de estruturas cristalográficas de proteínas e encontraram proporções muito parecidas. Como o programa em nenhum momento levou em consideração condições ambientais e obteve bons resultados no que se refere à predição de tipos de núcleos formados, os autores concluíram que a nucleação de proteínas depende predominantemente de condições geométricas (entrópicas).

Algumas características das proteínas e de outras macromoléculas biológicas diferem substancialmente daquelas de moléculas pequenas, o que permite poucas conclusões a partir de trabalhos de cristalização de moléculas pequenas. As principais diferenças são: baixa simetria, alto conteúdo de solvente dos cristais – o que torna os cristais de proteínas menos densos – e baixas energias de ligação – que os torna sensíveis a pequenas mudanças nas condições externas. As proteínas têm um grande número de sítios potenciais de ligação entre si que são energeticamente quase tão favoráveis quanto o pequeno número de sítios específicos através dos quais um arranjo ordenado (cristal) é formado. Assim, inúmeros possíveis contatos entre moléculas podem levar à agregação que resulta em partículas amorfas e não em cristais.

Uma das principais questões ligadas ao processo de cristalização de proteínas está relacionado à nucleação: saber quando e em que condições uma entidade cristalina, ordenada, ou um precipitado amorfo, desordenado, é energeticamente favorecido.

Os trabalhos que estudam a cristalização de proteínas como um processo de recuperação de produto, e não como meio para a análise cristalográfica (mais abundantes), são poucos, mas animadores, incluindo patentes sobre cristalização na presença de contaminantes. Exemplos destes artigos são os trabalhos de Schlichtkrull (1956) e Schlichtkrull e Nöring (1958) que produziram cristais de insulina; de Judge et al. (1995) que cristalizaram ovalbulmina na presença de conalbumina e lisozima; de Judge et al. (1998) que estudaram o efeito de impurezas protéicas no crescimento de cristais de lisozima; e o de Jacobsen et al. (1998) no qual se relata a purificação de lipase de fungos por meio da cristalização. Outras proteínas cristalizadas na presença de impurezas, que são apenas citadas por Jacobsen et al. (1998), são uma celulase e uma glicose isomerase.

#### ***1.4. COLOCAÇÃO DO PROBLEMA***

Como já foi dito, a maior parte dos trabalhos a respeito da cristalização de proteínas refere-se à determinação da estrutura cristalina (Littlechild, 1991). Há um certo pessimismo entre alguns pesquisadores que estudam a cristalografia de proteínas com relação ao enfoque e aplicação da cristalização de proteínas como ciência, com parâmetros bem estabelecidos que permitam, por exemplo, o projeto de cristalizadores. Acredita-se que um forte componente de empirismo estará sempre presente na predição dos fenômenos (Rosenberger, 1986). Por outro lado, Jacobsen et al. (1998) acreditam que os artigos referentes à cristalização em massa de proteínas, apesar de poucos, são uma forte evidência de que esta operação unitária é uma nova opção para a recuperação de proteínas devido à diversidade de moléculas já cristalizadas com sucesso.

Esta é a principal motivação deste trabalho: a atual dificuldade de entendimento e projeto de tais sistemas de cristalização (devido à complexidade dos fenômenos e carência de trabalhos voltados para processos de larga escala) em paralelo aos indicadores do potencial de sucesso o que fornece um amplo campo a ser explorado em pesquisa.

O projeto de sistemas de cristalização em massa, como o de outras operações unitárias, baseia-se em parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Dentre os parâmetros de

relevância visando a quantificação e entendimento da nucleação está o tempo de indução (tempo decorrido entre o estabelecimento da supersaturação e a detecção da formação de núcleos estáveis), pois ele permite estimar parâmetros termodinâmicos e cinéticos de nucleação. Seu uso para sistemas de sais e moléculas orgânicas pequenas já é praticado há bastante tempo (Calmanovici, 1994).

A literatura tem reportado valores de tempo de indução de proteínas (principalmente para a lisozima) ou de aminoácidos, mas nestes trabalhos não se enfatiza a aplicação desses dados, pois, em geral, tais trabalhos concentram-se na apresentação de uma técnica de monitoramento de soluções (Berglund e LeCaptain, 1999), ou citam a cristalização como importante para a análise cristalográfica (Haas e Drenth, 1999).

Portanto, a determinação do tempo de indução para diferentes proteínas pode propiciar um maior conhecimento sobre o processo de cristalização destas moléculas. A comparação com sistemas mais simples (sais e moléculas orgânicas pequenas) e a possível correlação de tendências de comportamento com propriedades das proteínas são estratégias que podem contribuir para mudar o balanço entre empirismo e predição no projeto de cristalizadores de proteínas.

### **1.5. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho é a determinação do efeito da temperatura, do pH e da concentração de proteína (fatores que determinam a supersaturação) no tempo de indução da insulina suína e da lisozima, de modo a estimar parâmetros cinéticos e termodinâmicos (energia de ativação de nucleação, tensão interfacial e calor de cristalização) necessários no projeto de sistemas de cristalização dessas proteínas.

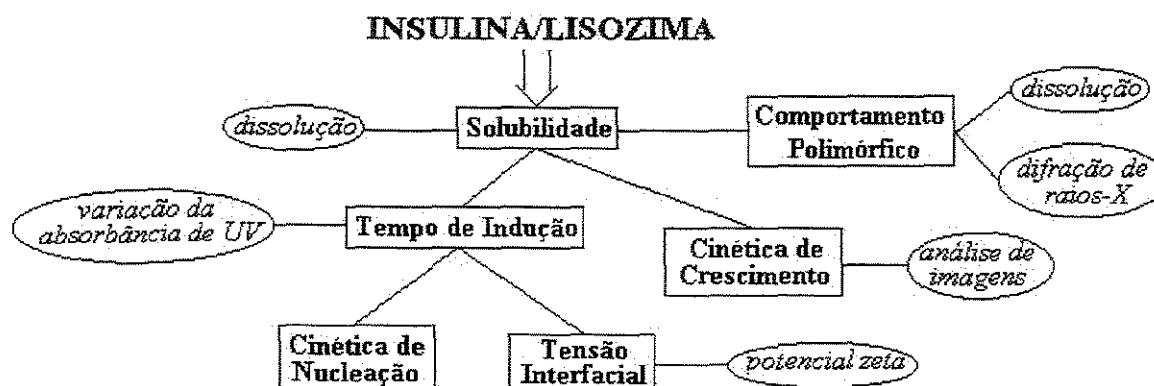
## 1.6. ETAPAS DESENVOLVIDAS

Nesta dissertação, o trabalho foi estruturado da maneira seguinte:

Foram determinadas experimentalmente as solubilidades da insulina suína em alguns valores de pH e temperatura. O mesmo foi feito para a lisozima, para a qual também se utilizou dados de literatura.

Os valores de solubilidade permitiram calcular o grau de supersaturação das soluções protéicas, o que é essencial para estudos de cristalização. Os ensaios de determinação da solubilidade também permitiram que se observasse um certo comportamento polimórfico da insulina e da lisozima, e que se estimasse uma taxa de crescimento dos cristais das proteínas controlada pela difusão.

Conhecendo a solubilidade e, conseqüentemente, o grau de supersaturação das soluções protéicas, mediu-se a variação do tempo de indução da insulina e da lisozima com a concentração (supersaturação) a temperatura constante em dois valores de pH, e a variação do tempo de indução com a temperatura mantendo a supersaturação constante em um dado valor de pH. Estes ensaios permitiram que se calculassem as taxas de nucleação primária e as tensões interfaciais. Verificou-se a influência das interações eletrostáticas na nucleação e associaram-se as tensões interfaciais com o potencial zeta das proteínas.



**Figura 1:** Representação esquematizada da maneira como se desenvolveu a dissertação.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1. TEMPO DE INDUÇÃO

Uma definição importante no estudo da cinética de nucleação primária é o limite de metaestabilidade. A potencialidade de perceber estados metaestáveis termodinamicamente é característica de transições de fase de primeira ordem (como a cristalização). Ao supersaturar a fase de origem, um certo tempo (ou período) de indução  $t_{ind}$  pode decorrer antes de uma quantidade apreciável da nova fase ser formada. Este tempo é uma medida da habilidade do sistema permanecer em equilíbrio metaestável e pode, portanto, ser usada para determinar o limite de metaestabilidade da fase de origem, isto é, a supersaturação crítica (ou máxima) abaixo da qual esta fase pode permanecer sem perder sua metaestabilidade e sem nenhum produto formado.

Para a determinação teórica do tempo de indução, até agora, dois caminhos têm sido usados. O primeiro é baseado na assunção de que o aparecimento do primeiro núcleo é o evento que faz o sistema sair do seu equilíbrio metaestável. Neste caso, pode-se falar de um mecanismo mononuclear (MN) de perda da metaestabilidade. O segundo caminho conta com a presunção de que a formação de um número estatisticamente grande de núcleos e o crescimento destes a tamanhos detectáveis são responsáveis pela quebra do equilíbrio metaestável. Analogamente, pode-se falar que nesse caso a metaestabilidade é perdida por um mecanismo polinuclear (PN). Embora ambos os caminhos MN e PN estejam corretos,

eles levam a diferentes expressões para  $t_{ind}$ , já que descrevem dois casos limites da nucleação que podem ser encontrados na prática (van Rosmalen e Witkamp, 1992).

Segundo esses autores, a probabilidade  $P_1$  de que pelo menos um núcleo seja formado no sistema de volume  $V$  dentro de um tempo  $t$  dada uma taxa de nucleação estacionária (independente do tempo)  $J_{est}$  é da forma:

$$P_1(t) = 1 - \exp(-J_{est} \cdot V \cdot t) \quad (1)$$

e o tempo médio  $t_{MN} = \int_0^{\infty} t \cdot dP_1(t)$  para o aparecimento do primeiro núcleo é, portanto, dado por:

$$t_{MN} = \frac{1}{J_{est} \cdot V} \quad (2)$$

Desde que é postulado que o sistema perde sua metaestabilidade bem no momento do aparecimento do primeiro núcleo (abordagem mononuclear), o tempo de indução, tempo para a formação da nova fase, coincide com  $t_{MN}$  e é expresso por:

$$t_{ind} = \frac{1}{J_{est} \cdot V} \quad (3)$$

Da definição da taxa de nucleação primária:

$$J(t) = \frac{1}{V} \cdot \frac{dN}{dt} \quad (4),$$

onde  $J$  é a taxa de nucleação primária,  $N$  a quantidade de núcleos existentes e  $t$  o tempo, e da equação (3), o tempo de indução pode ser expresso como:

$$t_{ind} = \frac{1}{J_{est}} = \left( \frac{dN}{dt} \right)^{-1} \quad (5)$$

O mecanismo PN é o mecanismo que está em vigor no extremo oposto, ou seja, quando mais núcleos têm tempo de serem formados enquanto o primeiro núcleo cresce a

um tamanho detectável. A probabilidade  $P_2$  de que uma quantidade detectável da nova fase seja formada no sistema dentro de um tempo  $t$  é da forma:

$$P_2(t) = 1 - \exp(-a_4 \cdot J_{est} \cdot G^3 \cdot t^4) \quad (6)$$

onde  $G$  é a taxa de crescimento e  $a_4$  é um fator de forma numérico que é, por exemplo, igual a  $\pi/3$  para esferas.

Desde que os dados experimentais de  $t_{ind}$  são obtidos por técnicas sensíveis à presença de um certo volume macroscópico  $V_{macr} \leq V$  da nova fase,  $t_{ind}$  pode ser definido como o tempo necessário para a formação desse volume que é uma fração específica  $\alpha$  igual a  $V_{macr}/V$  de  $V$ . Então, da definição do tempo de indução, o volume da nova fase  $V_{nova}(t_{ind})$  é igual a  $V_{macr}$  e pode ser apresentado na forma  $P_2(t_i) = \alpha$ . Isto posto, da equação (6), segue que:

$$t_{ind} = t_{PN} = \left[ \frac{\alpha}{(a_4 \cdot J_{est} \cdot G^3)} \right]^{1/4} \quad (7)$$

desde que  $\alpha \ll 1$  (ou seja,  $\ln(1 - \alpha) \approx -\alpha$ ).

Para casos intermediários, quando alguns núcleos (não um nem uma quantidade grande estatisticamente) levam ao desarranjo da metaestabilidade, o tempo de indução deve ser expresso como:

$$t_i = t_{MN} + t_{PN} = \frac{1}{J_{est} \cdot V} + \left[ \frac{\alpha}{(a_4 \cdot J_{est} \cdot G^3)} \right]^{1/4} \quad (8)$$

Das equações (5), (7) e (8), pode-se obter a taxa de nucleação primária  $J$  a partir da medida do tempo de indução. É uma prática comum descrever a taxa de nucleação primária como função da supersaturação e da temperatura por uma lei de potências:

$$J = k_N \cdot \sigma^n \quad (9)$$

onde  $\sigma$  é a definição supersaturação relativa  $\sigma = (C - C^*)/C^*$ ,  $C$  é a concentração do soluto,  $C^*$  é a concentração de equilíbrio naquelas condições e  $k_N$  uma constante de nucleação que varia com a temperatura segundo a equação de Arrhenius:

$$k_N = k_N^0 \cdot \exp\left(\frac{E_{att}}{RT}\right) \quad (10)$$

onde  $E_{att}$  é a energia de ativação da nucleação,  $R$  é a constante geral dos gases e  $T$  a temperatura absoluta em Kelvin.

Portanto, medindo o tempo de indução em diferentes supersaturações e em diferentes temperaturas, pode-se descrever completamente a cinética de nucleação primária. Se for válido o mecanismo mononuclear de perda da metaestabilidade, pode-se, a partir das expressões das cinéticas de nucleação homogênea e heterogênea e da relação entre a tensão interfacial envolvida na formação de um núcleo heterogêneo  $\gamma_{Shet}$  e a tensão interfacial envolvida na formação de um núcleo homogêneo  $\gamma_{Shomo}$ , da forma  $\gamma_{Shet} = f\gamma_{Shomo}$ , determinar a tensão superficial do sistema:

$$\log(t_i) = A + \frac{B}{T^3 \cdot (\log S)^2} \quad (11)$$

$$B = \frac{\beta \cdot \gamma_s^3 \cdot v^2 \cdot N_A \cdot f}{(2,3R)^3} \quad (12)$$

onde  $\beta$  é um fator de forma ( $16\pi/3$  para esferas),  $\gamma_s$  é a tensão superficial,  $v$  é o volume molecular,  $N_A$  é o número de Avogadro,  $R$  é a constante dos gases e  $f$  um fator (igual a 1 para a nucleação homogênea e menor que 1 para a nucleação heterogênea).  $S$  é a supersaturação adimensional  $S = C/C^* = \sigma + 1$ . Fazendo o gráfico de  $\log(t_{md})$  versus  $1/(\log S)^2$  para uma faixa suficientemente larga de supersaturações, pode-se determinar quando a nucleação é homogênea e quando a nucleação é heterogênea (Lancia et al., 1999).

Pode-se obter equações semelhantes à equação (11) para os mecanismos polinuclear e intermediário de perda da metaestabilidade desde que haja – por hipótese ou determinação experimental – uma equação para a velocidade de crescimento do tipo da equação (9).

## 2.2. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INDUÇÃO

Como foi apresentado no item anterior, um parâmetro importante no que concerne a cinética de nucleação de cristais é o tempo que decorre entre o estabelecimento da supersaturação e a formação de núcleos críticos, ou embriões (grupos de moléculas livremente agregadas que têm a mesma probabilidade de crescer para se tornarem cristais ou se dissolverem para desaparecer na solução). Esse tempo, definido como ‘tempo de indução real’ ( $t^*$ ), depende fundamentalmente da temperatura e supersaturação do sistema (Boistelle e Astier, 1988).

Entretanto,  $t^*$  não pode ser experimentalmente medido, pois não é possível detectar a formação de núcleos críticos; portanto, a fim de realizar as medidas, é necessário deixar tais núcleos crescerem até alcançarem um tamanho detectável. Conseqüentemente, só é possível avaliar um tempo designado simplesmente como ‘tempo de indução’ ( $t_{ind}$ ), sendo este  $t_{ind}$  maior que  $t^*$ , definido como o tempo decorrido entre o estabelecimento da supersaturação e as primeiras mudanças detectáveis nas propriedades físicas do sistema devido à formação de uma fase sólida. Deve ser observado que o tempo de indução não pode ser considerado uma propriedade fundamental do sistema uma vez que o seu valor depende da técnica empregada para detectar a formação da fase sólida. No entanto, uma análise dos valores de tempo de indução determinados experimentalmente pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de formação da fase sólida e do processo de crescimento que leva os núcleos críticos a cristais (Lancia et al., 1999).

O método mais simples para determinação do tempo de indução é a observação visual da formação de núcleos, com auxílio, ou não, de instrumentos ópticos. Ataka e Tanaka (1986) descrevem a observação da formação de cristais de lisozima com o auxílio de uma lente com aumento de cinco vezes. Segundo os autores, devido à diferença entre os índices de refração dos cristais e da solução, é relativamente fácil detectar cristais quando estes alcançam o tamanho de 50  $\mu\text{m}$ ; no entanto, partículas deste tamanho não podem mais ser considerado núcleo. Portanto, é muito provável que este método de determinação do tempo de indução pode levar a diferenças muito grandes entre o tempo de indução e o tempo de indução real, mas não impede a observação da variação do tempo de indução com

a temperatura e com a supersaturação para a determinação dos parâmetros cinéticos da nucleação.

Outros métodos de determinação do tempo de indução baseiam-se nas mudanças provocadas na solução pelo início da nucleação. Rosenberger (1986) descreve a brusca diminuição dos valores de supersaturação que ocorrem no tempo de indução. Portanto, qualquer método que permita detectar a variação da concentração de uma solução de proteína ao longo do tempo pode, a princípio ser usado para a determinação do tempo de indução. Como exemplo, a medida da absorbância de radiação ultravioleta a 280 nm permite o acompanhamento da variação de concentração de uma solução de proteína (Judge et al., 1995).

O método do espalhamento de luz (*light scattering*) foi utilizado pioneiramente por Kam et al. (1978) para distinguir entre a formação de núcleos tridimensionais e agregados amorfos. Lancia et al. (1999) descrevem a utilização do espalhamento de luz para determinação do tempo de indução do sulfato de cálcio. Outros autores utilizam o espalhamento de luz para o estudo do monitoramento de cristalização de soluções de proteínas (Littke et al., 1991; Giegé et al., 1991; Bishop et al., 1992).

A detecção do aparecimento de material particulado por dispersão de radiação a 320 nm através do aparente aumento da absorção da solução conforme descrito por Gehle e Schügerl (1984) pode também permitir a determinação do  $t_{ind}$ . Wilson et al. (2001), baseados neste princípio, utilizaram a absorbância em 350 nm para detecção do tempo de indução da lisozima. Outra técnica possível é a microscopia eletrônica, que pode ser utilizada para o acompanhamento da formação de núcleos: Michinomae et al. (1998) descreve o acompanhamento do processo inicial de crescimento de cristais de lisozima. Berglund e LeCaptain (1999) descrevem a aplicabilidade da medição do tempo de indução por 'geração de segundo harmônico'. A ressonância magnética nuclear foi utilizada para determinação do tempo de indução para a lisozima (Haas e Drenth, 1999). O uso da fluorescência também já foi descrito (Crosio e Julien, 1992). Neste caso, o método é restrito às proteínas que fluorescem naturalmente.

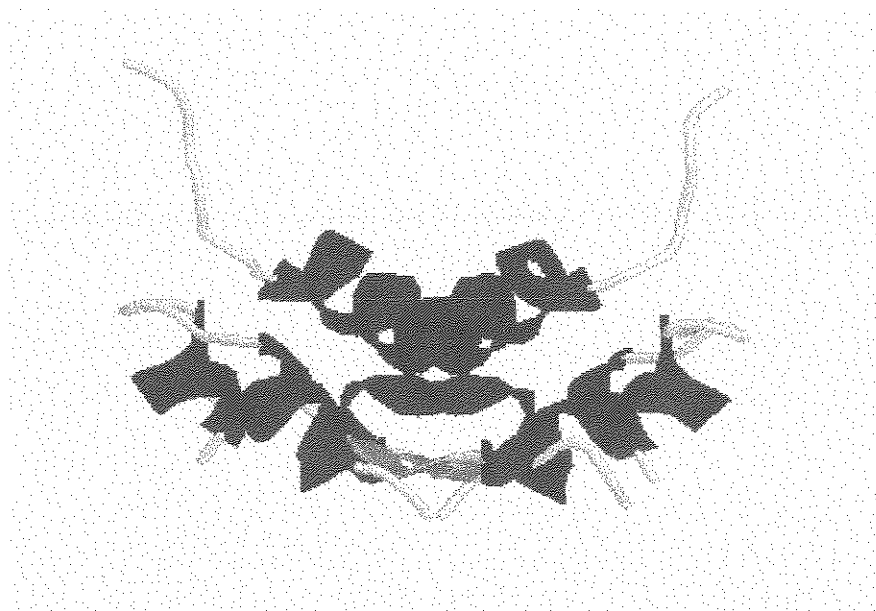
### 2.3. CARACTERÍSTICAS DA INSULINA E DA LISOZIMA PERTINENTES À CRISTALIZAÇÃO

#### 2.3.1. *Insulina*

A insulina (Figura 2) é um hormônio pancreático envolvido na regulação da concentração de glicose sangüínea, assim como tem importância no metabolismo de proteínas e lipídeos. A insulina é produzida pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas e consiste de duas cadeias de aminoácidos – A e B – ligadas por duas pontes de dissulfeto. Insulinas produzidas por espécies diferentes têm a mesma estrutura básica, mas diferentes seqüências de aminoácidos nas cadeias. A insulina suína (fórmula  $C_{256}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$ , com massa molecular de 5777,6 Da) difere da insulina humana (fórmula  $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ , com massa molecular de 5807,7 Da) em apenas um aminoácido na cadeia B (Martindale, 1993). O ponto isoelétrico (pI) da insulina é 5,5.

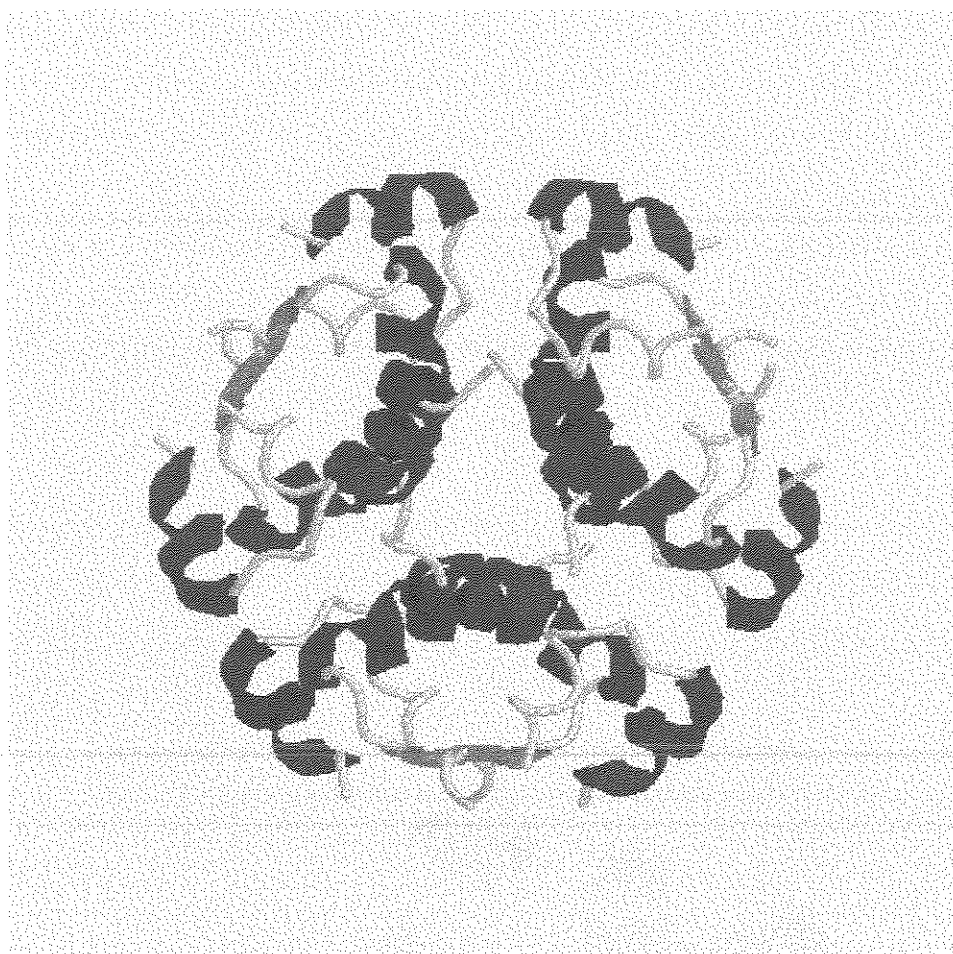
Uma população predominante de hexâmeros de moléculas de insulina (Figura 3) é característica de soluções de insulina em faixas neutras e moderadamente alcalinas de pH desde que zinco ou certos outros cátions divalentes estejam presentes (Schlichtkrull, 1956). Com aumento do pH acima de 8,0, a dissociação desses hexâmeros torna-se predominante mesmo na presença de altos conteúdos de zinco (Blundell et al., 1972). Segundo Kadima et al. (1993), a valores de pH mais baixos e concentrações salinas mais altas (pH 7,5, 100 mM de NaCl, 12 mg/mL de insulina livre de zinco), a massa molecular média em solução é próxima à do hexâmero, e a valores de pH mais altos e concentrações de sal mais baixas (pH 10,5, 10 mM de NaCl, 1,9 mg/mL de insulina livre de zinco) a massa molar média é próxima à do monômero. Além disso, os raios hidrodinâmicos dos monômeros, dímeros, tetrâmeros e hexâmeros das insulinas com zinco e sem zinco praticamente coincidem (são coincidentes também com a estimativa por volumes de van der Waals).

É razoavelmente certo que o hexâmero encontrado nos cristais é o mesmo que é observado em soluções de insulina zíncica. Hexâmeros de insulina são complexos zinco-imidazol com todos os grupos de ácidos carboxílicos e grupos amina livres para titulação, muito compactos com aspecto geral de um esferóide oblato com diâmetro de cerca de 50 Å e altura de cerca de 35 Å (Blundell et al., 1972).



**Figura 2:** Molécula de insulina ligada a dois átomos de zinco (Blundell et al., 1972). Na representação da estrutura, a diferença de cores se deve a estrutura secundária. Alfas hélices são magenta, placas beta são amarelas, e outros resíduos são brancos.

A cristalização de insulina é conhecida há muitos anos e tem sido usada em sua purificação desde então. Schlichtkrull (1956) cita a primeira cristalização de insulina feita por Abel em 1926 e a primeira cristalização de insulina com zinco em 1929 por Hartig. Em seu trabalho, Schlichtkrull (1956) descreve a cristalização de insulina suína e bovina em tampão citrato pH 6,0 na presença de acetona, na qual pôde observar cristais pequenos (5 a 10  $\mu\text{m}$ ). Os cristais de insulina suína eram romboédricos, enquanto que os cristais de insulina bovina tinham a forma de estrela. Isso é um indício de que a supersaturação era maior para a insulina bovina e, portanto, a solubilidade da insulina suína é maior que a solubilidade da insulina bovina. Utilizando uma solução supersaturada de insulina bovina de concentração inicial 2,42 mg/mL em tampão acetato 0,1M, pH 5,5, com 7% de NaCl, Schlichtkrull determinou uma concentração de insulina em solução igual a 0,085 mg/mL (1957).



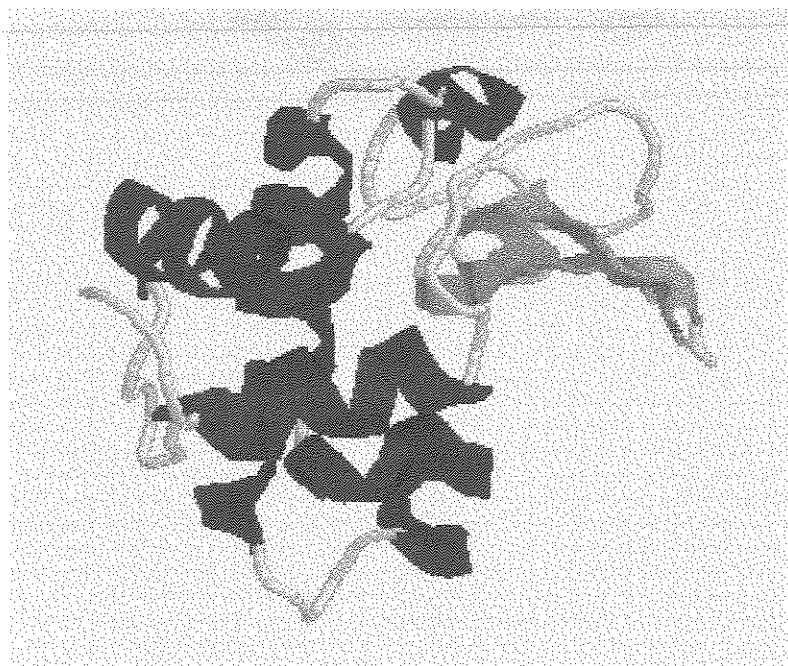
**Figura 3:** Representação do hexâmero de insulina zíncica, que constitui a unidade de crescimento dos cristais de insulina (Blundell et al., 1972). Na representação da estrutura, a diferença de cores se deve a estrutura secundária. Alfas hélices são magenta, placas beta são amarelas, e outros resíduos são brancos.

### **2.3.2. Lisozima**

A lisozima (Figura 4) é uma enzima de massa molecular igual a 14400 Da e pI igual a 11,1 encontrada na lágrima, secreção nasal, saliva, baço, e leucócitos. A habilidade desta enzima de hidrolisar as ligações glicosídicas de oligossacarídeos da parede celular de certas bactérias pode causar a lise de organismos suscetíveis. A lisozima está presente em grandes quantidades nos ovos de muitos pássaros, onde presumivelmente desempenham um importante papel na defesa do embrião contra infecção bacteriana (Smith et al, 1985). A

lisozima de clara de ovo de galinha é a proteína mais usada em estudos de cristalização de macromoléculas (Pusey et al., 2001). No entanto, alguns autores contestam a eficácia da lisozima como proteína modelo de cristalização. Chayen e Saridakis (2001) não obtiveram para outras proteínas o mesmo desempenho da lisozima, ao estudarem a nucleação heterogênea de proteínas. Rosenberger et al. (1996) também contestam os resultados de ensaios cristalização obtidos com a lisozima alegando que a pureza da proteína na maior parte dos ensaios realizados (95%) e a afinidade da lisozima na associação com outras proteínas mascaram os resultados obtidos.

Ao contrário da insulina, a lisozima tem os grupos carregados bem distribuídos sobre a superfície da molécula. Por isso, o potencial dos grupos hidrofóbicos para a formação de oligômeros é substancialmente reduzido. Estudos de crescimento cristalino de resolução molecular também sugerem que a unidade de crescimento é uma molécula (revelam degraus de crescimento de altura monomolecular) (Rosenberger et al., 1996).



**Figura 4:** Molécula de lisozima de clara de ovo de galinha (Diamond, 1974). Na representação da estrutura, a diferença de cores se deve a estrutura secundária. Alfas hélices são magenta, placas beta são amarelas, e outros resíduos são brancos.

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. Reagentes

A insulina suína com pureza de 96,57% (segundo análise por HPLC) foi gentilmente doada pela Biobrás, Brasil. A lisozima de clara de ovo de galinha tem pureza de 99% e foi obtida da Sigma, EUA. Água ultra-pura foi obtida com a utilização do aparelho Milli-Q da Millipore, EUA. Acetato de sódio anidro foi obtido da Merck, Alemanha, o cloreto de sódio grau reagente da Labsynth Produtos para Laboratório, Brasil, o ácido acético glacial da Ecibra Reagentes Analíticos, Brasil.

##### 3.1.2. Principais Equipamentos

Um espectrofotômetro Beckman modelo DU650 (EUA) foi utilizado para medir a concentração de proteína nas soluções preparadas. O espectrofotômetro também foi usado para medir o tempo de indução de soluções supersaturadas de proteínas, por meio da variação da absorbância em 320 nm. Durante esses ensaios, a temperatura era mantida constante com auxílio de um banho termostatzado Tecnal T-2000 (Brasil). Para que fosse feita a caracterização das proteínas utilizadas (insulina e lisozima) um difratômetro Shimadzu XRD-6000 mediu a cristalinidade e as eventuais diferenças de estrutura de uma mesma proteína submetida a diferentes condições; um analisador de tamanho de partículas Coulter LS230 mediu a distribuição de tamanho de partículas da amostra original de

insulina; o Malvern Zetasizer S mediu o potencial zeta da insulina e da lisozima em diferentes níveis de pH; um analisador de imagens Leica auxiliou na determinação do fator de forma das partículas de insulina.

### **3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.2.1. Determinação de Proteína**

A concentração de proteína total foi determinada por medida de absorção de radiação a 280 e 320 nm e a diferença entre as medidas foi usada no cálculo da concentração para evitar erros devido à turbidez da solução como proposto por Gehle e Schügerl (1984).

#### **3.2.2. Determinação da solubilidade por dissolução em agitação recíproca**

Em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, foram colocados em contato os 100 mL de tampão tampão acetato 0,1 M pH 5,5 (com 7% de NaCl) e 450 mg de insulina suína, formando assim uma suspensão de concentração inicial 4,5 mg/mL. A suspensão foi agitada em um banho de agitação recíproca de temperatura controlada (25°C). De tempos em tempos, uma amostra de 1,0 mL era coletada, centrifugada (1.500g, 3 min) e a absorbância do sobrenadante era medida. O tempo registrado (neste e em todos os ensaios semelhantes a este) era o tempo quando se fazia a coleta, antes da centrifugação. A hipótese implícita neste caso é que a centrifugação separa quase imediatamente as fases líquida e sólida interrompendo a transferência de massa.

#### **3.2.3. Determinação da solubilidade por dissolução em agitação por tombamento:**

Em frascos do tipo Eppendorf, foram colocados de 4,0 a 7,0 mg de proteína e 1,0 mL de tampão acetato pH 5,5 0,1M (com 7% de NaCl) para os ensaios com insulina, e de 18 a 22 mg de proteína além de cinco esferas de vidro (diâmetro  $\pm 2$  mm) e 1,0 mL de tampão acetato pH 3,5 0,05 M (com 10% de NaCl) para os ensaios com lisozima. Os frascos foram agitados por tombamento (a uma rotação de cerca de 12,5 rpm com um

diâmetro de rotor de 20 cm) em um ambiente de temperatura controlada. De tempos em tempos, dois ou três frascos eram retirados, centrifugados (a 5.300g por 5 min para a insulina e a 1.400g por 4 min para a lisozima) e tinham seus sobrenadantes coletados e, destes, a absorbância foi medida.

#### ***3.2.4. Determinação da solubilidade dissolução em agitação por barra magnética***

Em um frasco Erlenmeyer de 50 mL, foram misturados 150 mg de insulina suína e 50 mL de solução de acetato 0,1M (com 7% de NaCl) – em uma suspensão de concentração inicial 3,0 mg/mL. A suspensão foi agitada magneticamente em um banho a temperatura controlada igual a 25°C. De tempos em tempos, uma amostra de 1,0 mL era coletada, centrifugada (7650g, 4 a 10 min) e a absorbância do sobrenadante era medida.

#### ***3.2.5. Verificação da desnaturação da insulina suína por fibrilação***

Utilizando o tampão acetato 0,1M pH 5,50 (com 7% de NaCl), adicionou-se 16,5 mL (volume útil) em um tubo de vidro, com tampa de vidro, com 15 esferas de vidro (diâmetro  $\pm 2$  mm) para promover a agitação. A quantidade de insulina era 50 mg e como o volume do tubo era todo ocupado eliminaram-se quaisquer superfícies hidrofóbicas (o agitador de teflon, ou as paredes de polietileno dos frascos Eppendorf) e, portanto, foram praticamente eliminadas as possibilidades de fibrilação. Não foi possível eliminar todo ar do sistema, pois ao adicionar a insulina, adiciona-se também ar incluso e ocluso nas partículas de insulina e dissolvido no tampão. No entanto, a quantidade de ar era mínima.

#### ***3.2.6. Verificação do comportamento polimórfico da insulina suína***

Em um frasco Erlenmeyer de 50 mL, foram misturados 150 mg de insulina suína e 50 mL de solução de acetato 0,1 M (com 7% de NaCl) (suspensão de concentração inicial 3,0 mg/mL). A suspensão foi agitada magneticamente em um banho a temperatura controlada igual a 25°C por 24 horas, foi filtrada e o sólido retido foi seco a temperatura ambiente por uma noite. Este sólido resultante foi utilizado em um ensaio de determinação da solubilidade da insulina suína por dissolução em agitação por barra magnética.

### **3.2.7. Verificação do comportamento polimórfico da lisozima**

Em um tubo de ensaio, foram misturados 200 mg de lisozima e 10 mL de solução de acetato 0,05 M (com 10% de NaCl) (suspensão de concentração inicial 20 mg/mL). A suspensão foi agitada por tombamento à temperatura ambiente por 48 horas, foi filtrada e o sólido retido foi seco a temperatura ambiente por uma noite. Este sólido resultante foi utilizado em um ensaio de determinação da solubilidade da lisozima por dissolução em agitação por tombamento.

### **3.2.8. Medida do tempo de indução por absorbância de UV**

Em uma cubeta de quartzo de 3,0 mL mantida no espectrofotômetro a temperatura constante por circulação de água proveniente de um banho termostatzado, adicionava-se uma solução de insulina suína de concentração conhecida em solução 0,1 M de acetato de sódio pH 10,0 com 7% de cloreto de sódio (m/v) e completava-se o volume com solução 0,1 M de ácido acético com 7% de cloreto de sódio (m/v) de modo que a solução resultante tivesse volume de 2,0 mL e pH de 6,59 ou 5,50 e a concentração de insulina estivesse acima da saturação, ou adicionava-se 1,0 mL de uma solução de lisozima de concentração conhecida em tampão 0,05 M de acetato de sódio (pH 3,5 ou 4,0) e completava-se o volume com solução 0,1 M de tampão 0,05 M de acetato de sódio (pH 3,5 ou 4,0) com 20% de cloreto de sódio (m/v) de modo que a solução resultante tivesse volume de 2,0 mL, pH de 3,5 ou 4,0, 10% de cloreto de sódio (m/v) e a concentração de lisozima estivesse acima da saturação. Mediu-se a variação da absorbância em 320 nm ao longo do tempo. Considerou-se o tempo de indução o instante a partir do qual há um aumento abrupto na oscilação ou uma mudança no comportamento da absorbância. O modelo de espectrofotômetro utilizado permite a medida simultânea de até 6 soluções (em 6 cubetas diferentes). Foram medidas três soluções simultaneamente, de modo a ter no fim de cada ensaio uma triplicata com valor de tempo de indução médio e o respectivo desvio-padrão das medidas.

### **3.3 PROCEDIMENTO ANALÍTICO**

#### **3.3.1. *Análise de difração de raios-X das proteínas originais e processadas***

As análises de difração de raios-X foram realizadas na Divisão de Metalurgia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$ , tensão e correntes de varredura de 40 kV e 30 mA, respectivamente, e rotação do corpo de prova de 20 rpm. Os ângulos ( $2\theta$ ) foram variados de 5 a  $60^\circ$ .

#### **3.3.2. *Determinação do potencial zeta das proteínas***

Foram medidos os potenciais zeta de suspensões de insulina e lisozima em solução de 0,001 M de cloreto de sódio em diferentes níveis de pH. O Zetamaster S opera detectando a luz espalhada de uma suspensão de partículas (usualmente na faixa de tamanhos de 5 nm a 5000 nm, ou mais) e interpreta o espectro para extrair uma medida da velocidade das partículas na direção de um campo elétrico aplicado. Esta velocidade provém da presença de uma carga nas partículas individuais. Geralmente, pretende-se manter o sinal espalhado como menos de 10% do signal do feixe de referência. Assim, medindo o potencial zeta em uma solução salina de 0,001 M, deve-se manter a concentração da suspensão entre 2000 e 3000 Kcps. A taxa de contagem (Kcps, ou milhares de fótons detectados por segundo durante o período da medida) pode ser usada como indicação da concentração da amostra, para uma dada amostra, uma vez que há prévia calibração com o solvente limpo.

## ***CAPÍTULO 4***

### ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

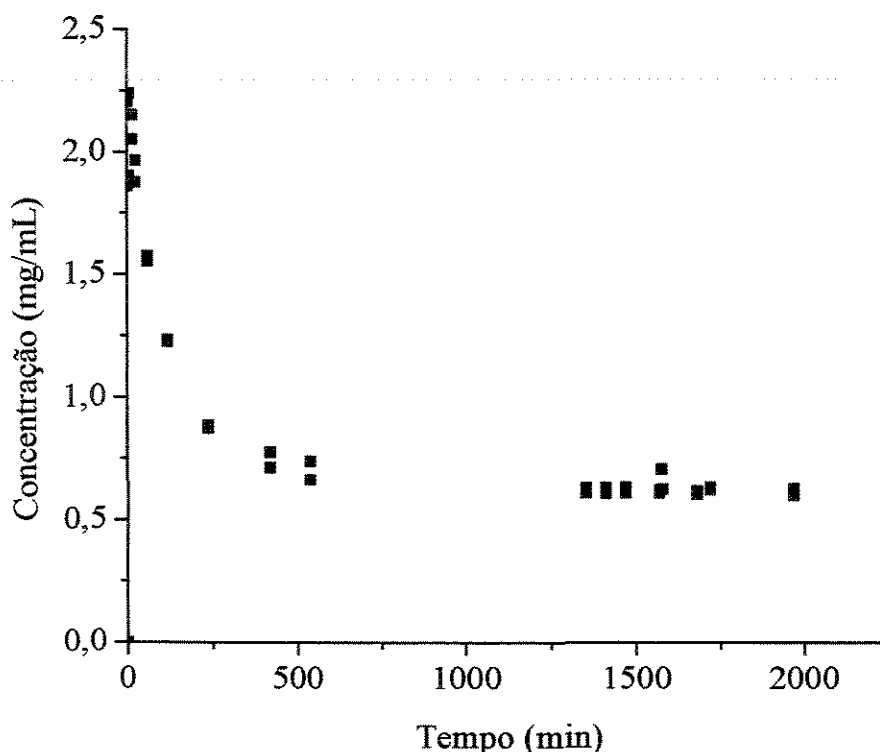
#### ***4.1. DETERMINAÇÃO DE SOLUBILIDADE***

##### ***4.1.1. A dissolução da insulina e o indicio de comportamento polimórfico***

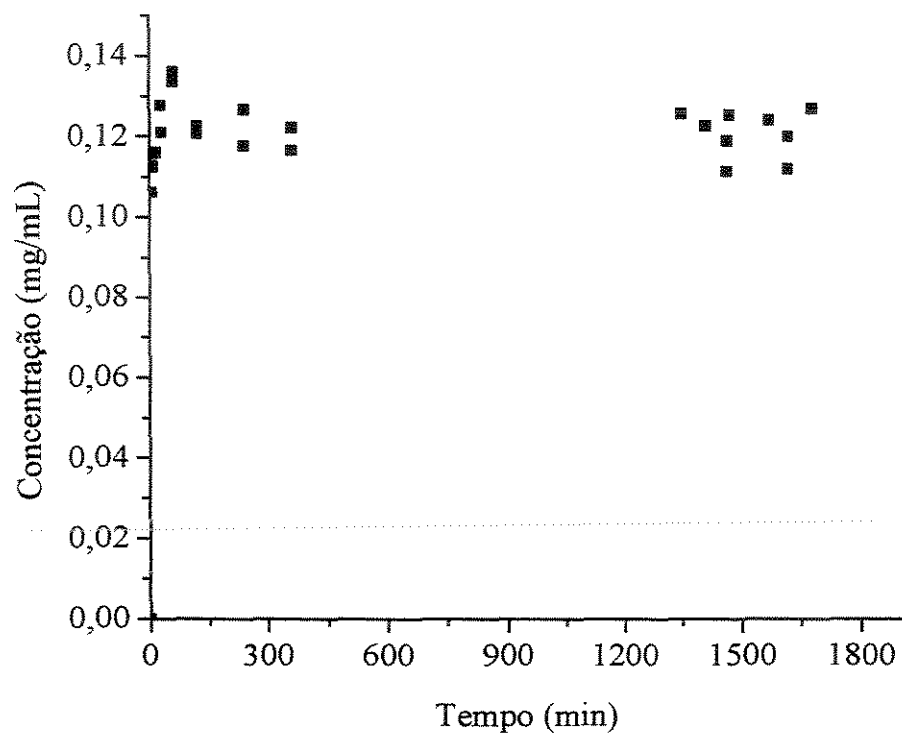
Os dados de solubilidade de insulina existentes na literatura são muito escassos (Fredericq e Neurath, 1950, Schlichtkrull, 1956), e estes dados são necessários para calcular a supersaturação de um sistema e, conseqüentemente, obter as cinéticas envolvidas no processo de cristalização (nucleação e crescimento). O método utilizado para a determinação da solubilidade da insulina foi a dissolução de uma suspensão da proteína no sistema solvente acetato 0,1M com 7% de NaCl a 25°C agitada através do uso de barra magnética em ambiente de temperatura controlada. Foram feitos ensaios em três níveis de pH a temperatura constante igual a 25°C (Figuras 5, 6, 7 e 8), e em três temperaturas diferentes mantendo pH constante igual a 5,5 (Figura 9). Como não se conhecia o tempo necessário para que se alcançasse o equilíbrio, acompanhou-se a dissolução ao longo do tempo. Foram consideradas como medidas da solubilidade as médias dos últimos valores dos patamares. O erro da medida é o desvio-padrão desses pontos.

Foram escolhidos os valores de pH 3,0, pH 5,5 e pH 7,0 para avaliar a possível influência da carga líquida superficial da molécula e das diferentes formas em que a insulina se associa na solubilidade: em pH 3,0 a insulina em solução está positivamente

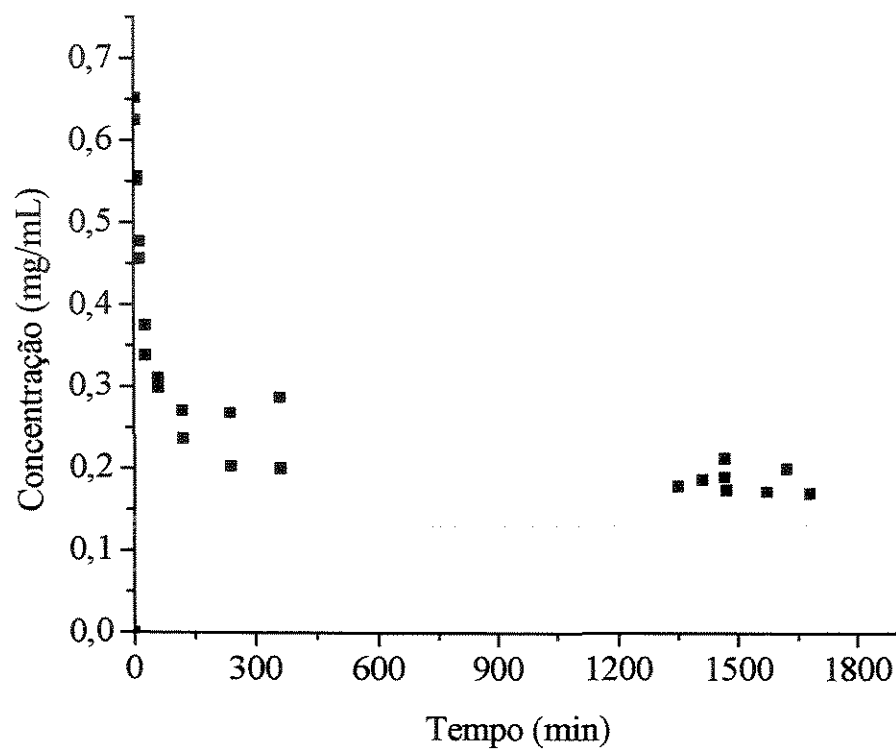
carregada e predominantemente sob a forma de monômeros e dímeros, em pH 5,5 (o ponto isoelétrico) a carga superficial líquida é nula e em pH 7,0 a molécula em solução está negativamente carregada e quase toda sob a forma de hexâmeros (Blundell et al., 1972). No entanto, em pH 3,0 e pH 7,0 o sistema solvente (acetato 0,1 M com 7% de NaCl) não é tamponante. Então, foi necessário que se verificasse a variação do pH durante a dissolução. Os resultados mostraram que o pH varia rapidamente em poucos minutos e depois se mantém estável e, por conseguinte, o pH final da suspensão é igual ao pH de dissolução. No entanto, a variação do pH no início da dissolução poderia ter mascarado ou alterado a percepção de alguns fenômenos que são discutidos mais adiante. Foram feitas triplicatas para cada condição de pH. A Tabela I lista os resultados dos ensaios, com o valor da solubilidade da insulina suína no sistema solvente acetato 0,1M com 7% de NaCl a 25°C em cada valor de pH estudado.



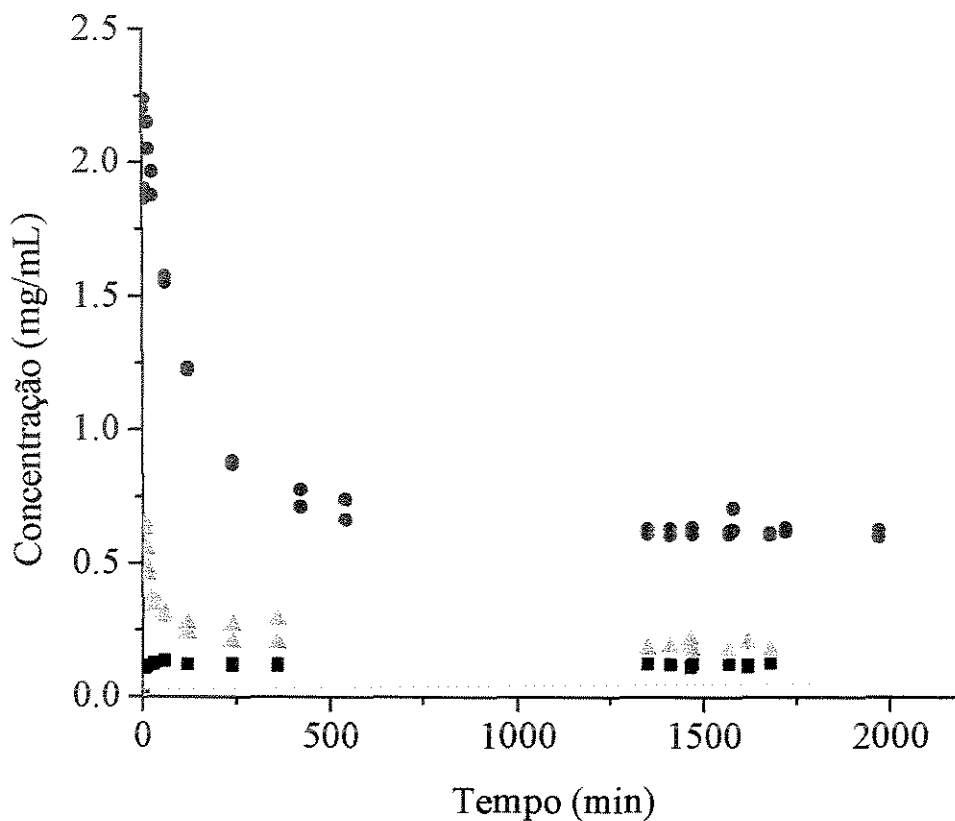
**Figura 5:** Ensaio de dissolução da insulina suína em tampão acetato 0,1 M pH 5,50 (com 7% de NaCl) a 25°C por agitação com barra magnética.



**Figura 6:** Ensaio de dissolução da insulina suína em solução acetato 0,1 M pH 3,23 (com 7% de NaCl) a 25°C por agitação com barra magnética.



**Figura 7:** Ensaio de dissolução da insulina suína em solução acetato 0,1 M pH 6,59 (com 7% de NaCl) a 25°C por agitação com barra magnética.



**Figura 8:** Efeito do pH na dissolução da insulina suína em solução acetato 0,1 M (com 7% de NaCl) a 25°C por agitação com barra magnética para diferentes valores de pH. O coeficiente de extinção (determinado experimentalmente) utilizado foi 1,259. Os símbolos ■, ●, ▲ correspondem aos valores das diferentes replicatas em valores de pH de 3,23, 5,50 e 6,59, respectivamente.

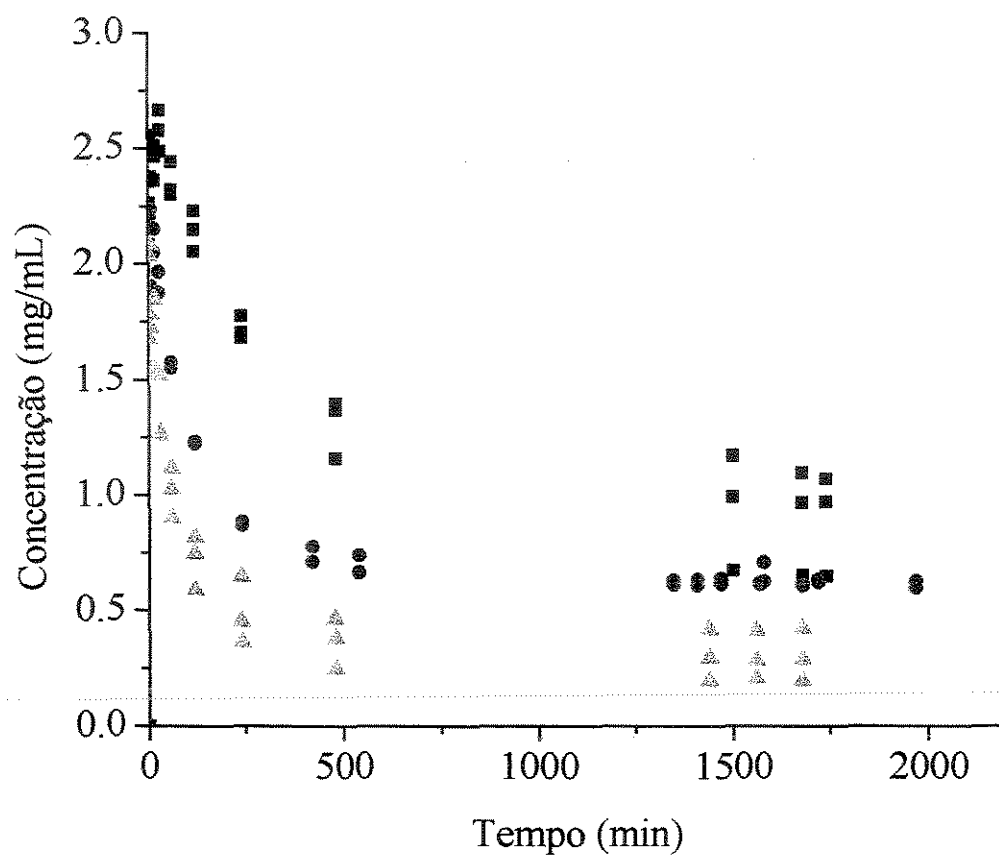
Pode-se observar na legenda das Figuras 6 e 7 que nestas estão representadas a dissolução da insulina suína em pH 3,23 (Figura 6) e pH 6,59 (Figura 7). A maneira como esses valores de pH variou foi estudada em ensaios à parte, nos quais repetia-se o procedimento experimental dos ensaios de dissolução medindo continuamente o valor de pH das suspensões. Os valores de pH variaram até seus valores em pouco menos de três minutos e, a partir de então se mantiveram constantes por cerca de duas horas. Em pH 5,50, não ocorreu variação do pH, pois o sistema solvente era tamponante. Os fenômenos ocorridos no início da dissolução e que poderiam ter suas percepções alteradas pela variação do pH também ocorreram em pH constante em três temperaturas diferentes (Figura 9), o que descarta a variação do pH como causa – ou causa principal – desses fenômenos.

**Tabela I – Solubilidade da insulina suína em função do pH a 25°C em acetato 0,1M com 7% de NaCl**

pH	C* (mg/mL)
3,23	0,1209 ± 0,0058
5,50	0,6260 ± 0,0250
6,59	0,1864 ± 0,0147

A variação da solubilidade com o pH teve um comportamento oposto ao esperado. A solubilidade no ponto isoelétrico é, em geral, o menor valor de solubilidade da proteína, pois no ponto isoelétrico a carga superficial líquida da proteína é nula e há, portanto, uma menor resistência à aproximação entre as moléculas. No entanto, em pH 5,50 (ponto isoelétrico da insulina) observa-se um máximo local de solubilidade.

O efeito da temperatura na solubilidade da insulina também foi estudado (Figura 9).



**Figura 9:** Efeito da temperatura na dissolução da insulina suína em tampão acetato 0,1 M pH 5,50 (com 7% de NaCl) por agitação com barra magnética para diferentes valores de temperatura. Os coeficientes de extinção (determinados experimentalmente) utilizados foram 1,195, 1,259 e 1,139 para 15°C, 25°C e 35°C respectivamente. Os símbolos ■, ●, ▲ correspondem às replicatas feitas a 15, 25 e 35°C, respectivamente.

Segundo Kawashima et al. (1975), a variação da solubilidade com a temperatura pode ser expressa por uma equação do tipo de Arrhenius:

$$C^* = C_0^* \cdot \exp\left(-\frac{\Delta H_{\text{diss}}}{RT}\right) \quad (13)$$

onde  $C_0^*$  é a solubilidade no zero absoluto,  $R$  é a constante dos gases e  $\Delta H_{\text{diss}}$  é a entalpia de dissolução.

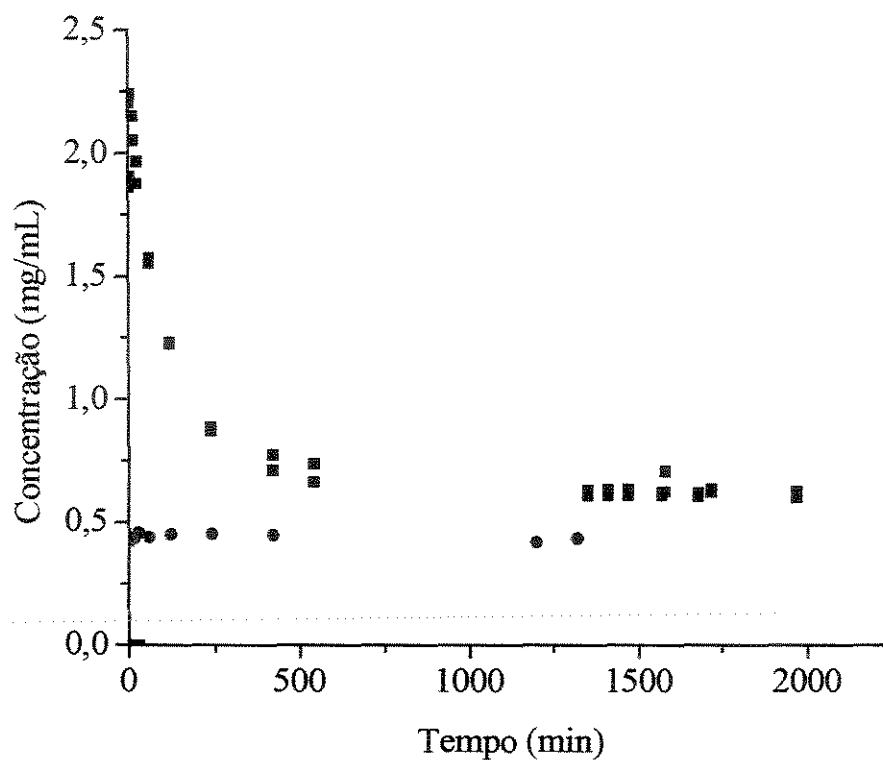
Com os dados de solubilidade da insulina a diferentes temperaturas (Tabela II), pode-se inferir que entalpia de dissolução da insulina suína em tampão acetato 0,1 M pH 5,50 com 7% de NaCl tem um valor igual a  $-41,6$  kJ/mol. Pode-se observar que a solubilidade diminui com a temperatura. Este fato não é incomum. Christopher et al. (1998) mediram a solubilidade de 28 proteínas, das quais 24 mostraram ter solubilidade dependente da temperatura e, destas, 13 mostraram ter solubilidade retrógrada (que diminui com o aumento da temperatura).

**Tabela II – Solubilidade da insulina suína em função da temperatura em tampão acetato 0,1M pH 5,50 com 7% de NaCl**

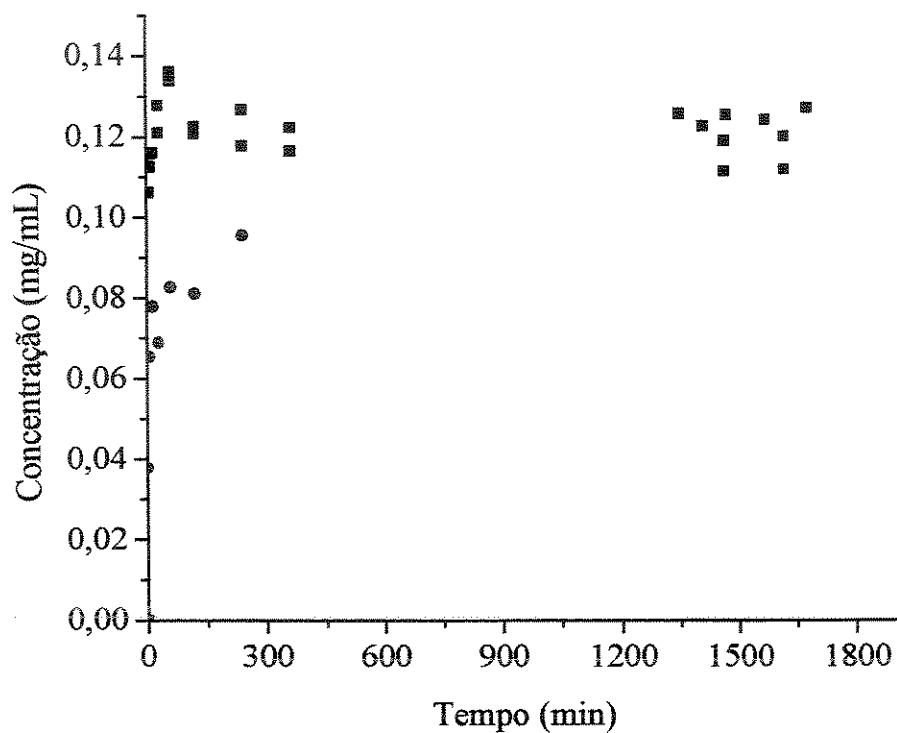
Temperatura (°C)	C* (mg/mL)
15	$0,9181 \pm 0,2049$
25	$0,6260 \pm 0,0250$
35	$0,3013 \pm 0,0946$

O comportamento da dissolução em todas as condições estudadas apresentou um aumento rápido da concentração seguido de uma queda da concentração até um valor de equilíbrio. Isto sugere que poderia estar ocorrendo uma mudança da estrutura cristalina, ou do grau de cristalinidade, da insulina. Para verificar esta hipótese, foram feitos ensaios

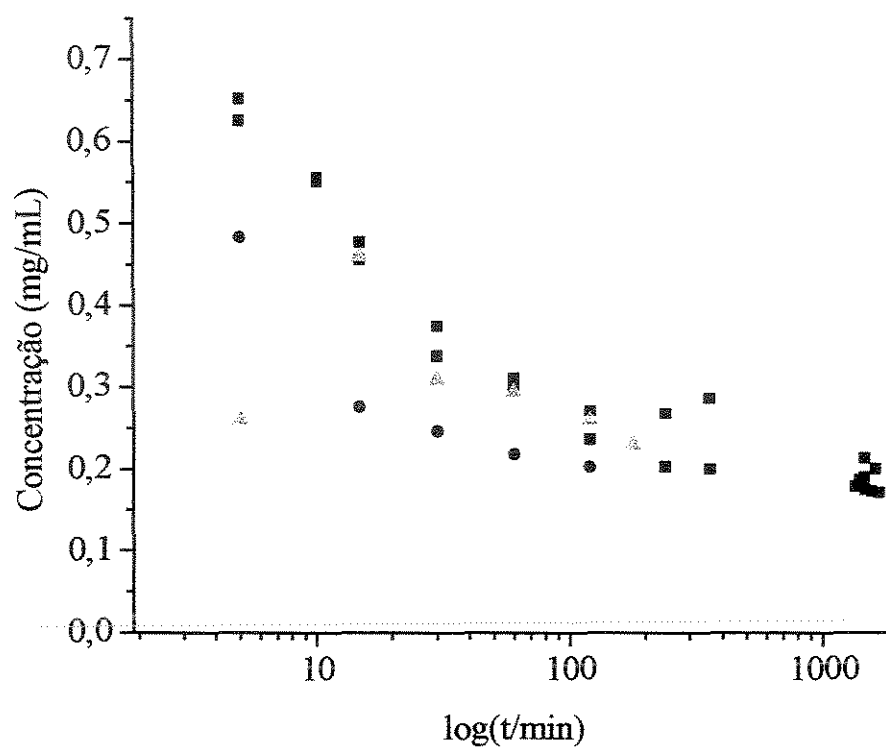
comparando as dissoluções da insulina original e da insulina processada: agitação por 24 horas, filtração e secagem a temperatura ambiente (Figuras 10, 11 e 12).



**Figura 10:** Comparação entre as cinéticas de dissolução em tampão acetato 0,1 M pH 5,50 com 7% de NaCl a 25°C da amostra de insulina suína tal qual e da amostra de insulina suína processada. Os símbolos ■, ●, correspondem às amostras original e processada, respectivamente.



**Figura 11:** Comparação entre as cinéticas de dissolução em tampão acetato 0,1 M pH 3,23 com 7% de NaCl a 25°C da amostra de insulina suína tal qual e da amostra de insulina suína processada. Os símbolos ■, ●, correspondem às amostras original e processada, respectivamente.

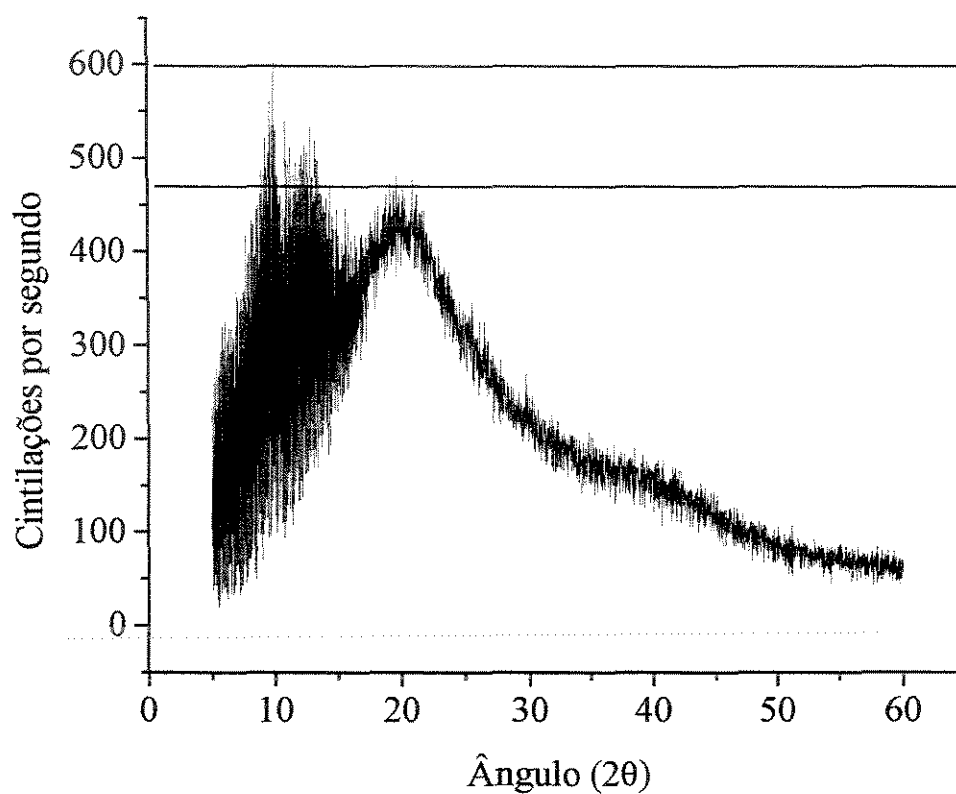


**Figura 12:** Comparação entre as cinéticas de dissolução em tampão acetato 0,1 M pH 6,59 com 7% de NaCl a 25°C da amostra de insulina suína tal qual e da amostra de insulina suína processada. Os símbolos ■, ●, ▲ correspondem às amostras original, processada e reprocessada, respectivamente.

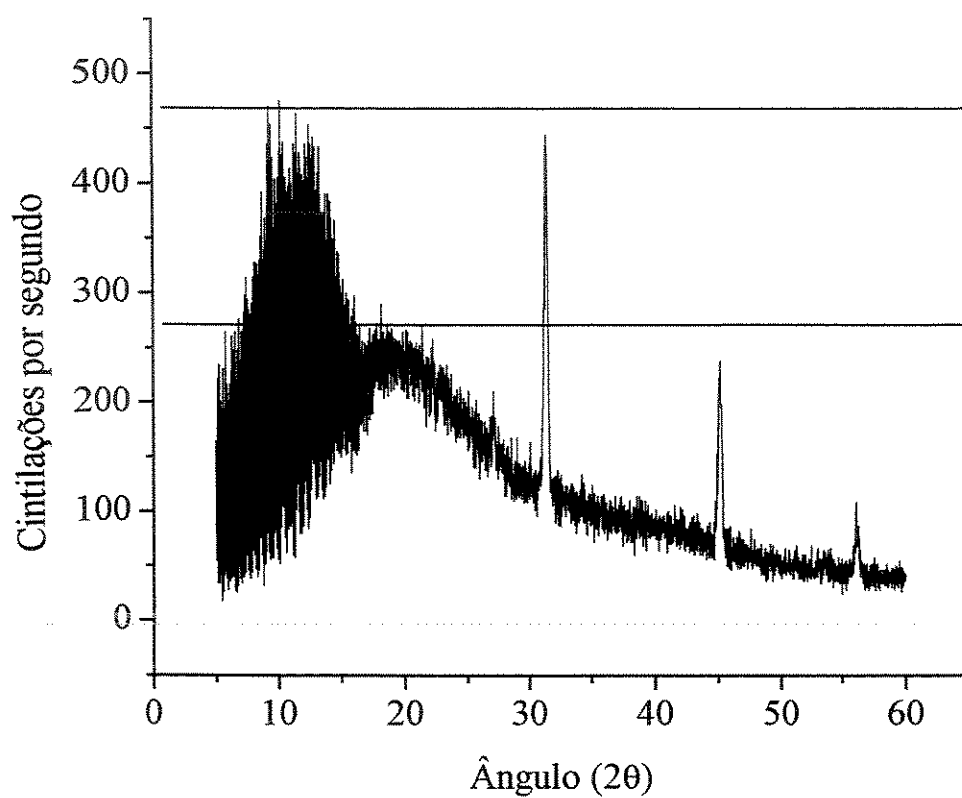
Pôde-se observar que a dissolução da insulina processada, ou a redissolução da insulina, quase sempre apresenta o comportamento esperado: aumento monotônico da concentração, tendendo assintoticamente a um valor de equilíbrio, o que sugere um rearranjo estrutural da insulina durante os ensaios para a determinação da solubilidade. Em pH 6,59, o comportamento da dissolução se manteve, mesmo após dois processamentos consecutivos da amostra. Isto, além do fato de que em pH 3,23 a queda de concentração observada na dissolução da amostra original foi menos acentuada, sugerem que o possível rearranjo estrutural que seria proporcional à quantidade de hexâmeros disponíveis em solução. Segundo Blundell et al. (1972), em pH 7,0, quase toda insulina em solução está sob a forma de hexâmeros, enquanto que em pH 2,0 a população de dímeros atinge o valor máximo. Há ainda o efeito da variação do pH no início da dissolução, já discutido, que poderia ter encoberto ou exacerbado o pico de concentração real.

Estudaram-se também as possibilidades, mais remotas, de o pico de concentração resultante do aumento rápido da concentração seguido de uma queda da concentração até um valor de equilíbrio ser causado pela desnaturação da insulina (pelo cisalhamento na agitação ou por fibrilação), ou a possibilidade um aumento no teor de zinco (dois átomos de zinco ou de outros metais bivalentes são necessários para a estabilização do hexâmero que constitui a célula unitária dos cristais de insulina, como já foi discutido no capítulo 2) modificar o comportamento da dissolução da insulina. Nem a desnaturação é explicação para a queda de concentração após o pico nem o aumento do teor de zinco em solução modifica a cinética de dissolução da insulina. Os resultados desses ensaios podem ser vistos em detalhes nos Anexos 2 e 3.

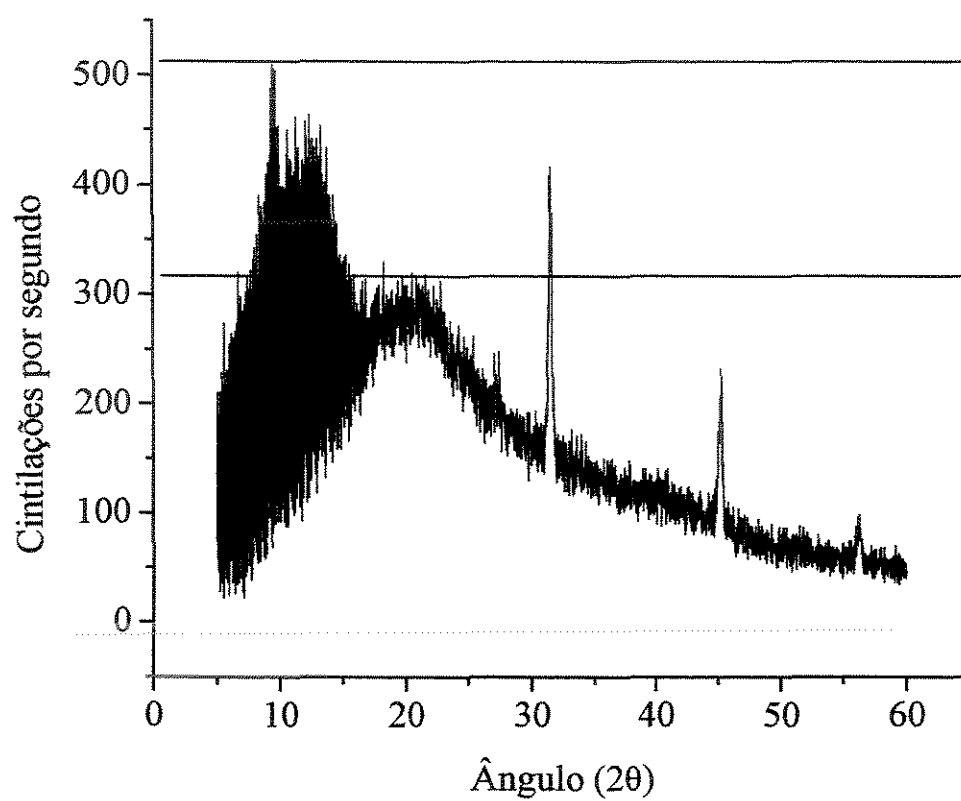
Foram feitas análises por difração de raios-X (Figuras 13, 14, 15 e 16) de uma amostra original e de amostras processadas de insulina suína, na tentativa de comprovar a mudança estrutural que poderia ter havido. Os resultados dessas análises são de difícil interpretação, já que a cristalinidade da insulina suína – de todas as amostras – era baixa. No entanto, uma pequena diferença entre os espectros da difração de raios-X das diferentes amostras pôde ser notada.



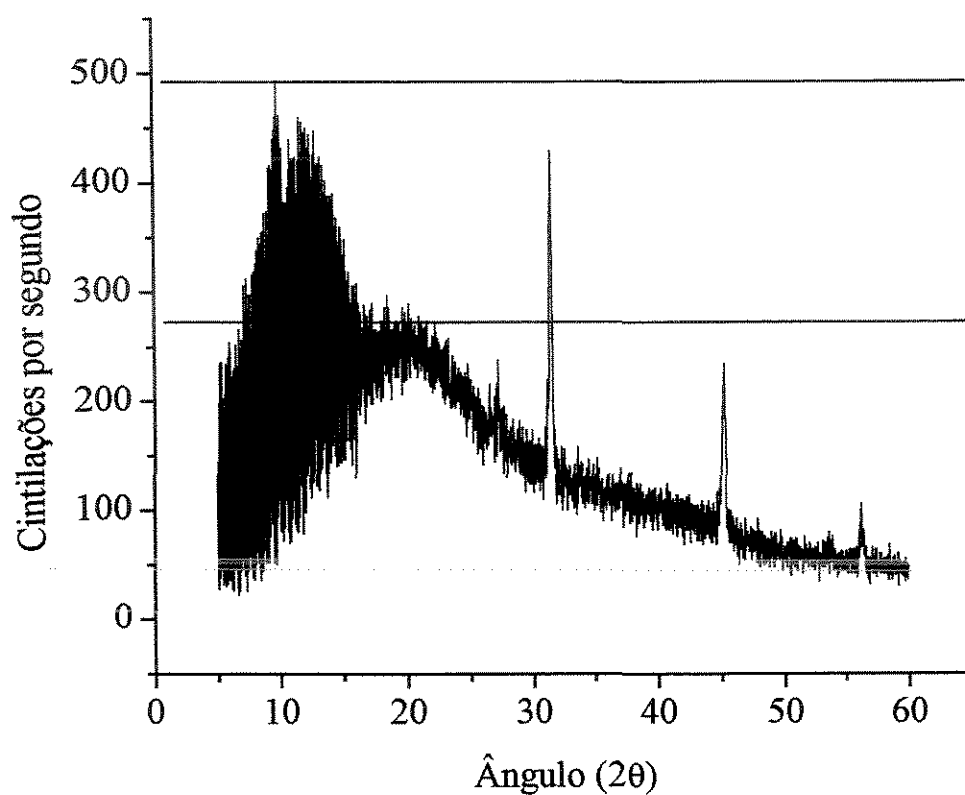
**Figura 13:** Análise por difração de raios-X da amostra original de insulina suína. A tensão e a corrente de varredura usada foram respectivamente 40 kV e 20 mA, e a rotação da amostra foi de 20 rpm.



**Figura 14:** Análise por difração de raios-X da amostra de insulina suína processada em pH 3,23. A tensão e a corrente de varredura usada foram respectivamente 40 kV e 20 mA, e a rotação da amostra foi de 20 rpm.



**Figura 15** Análise por difração de raios-X da amostra de insulina suína processada em pH 5,50. A tensão e a corrente de varredura usada foram respectivamente 40 kV e 20 mA, e a rotação da amostra foi de 20 rpm.



**Figura 16:** Análise por difração de raios-X da amostra de insulina suína processada em pH 6,59. A tensão e a corrente de varredura usada foram respectivamente 40 kV e 20 mA, e a rotação da amostra foi de 20 rpm.

A baixa cristalinidade que caracterizou as análises por difração de raios-X da insulina pôde ser verificada pelo alto ruído de fundo nas cintilações além da ausência de picos bem definidos na região que caracteriza a insulina (ângulo de incidência  $2\theta$  entre  $5^\circ$  e  $25^\circ$ ). A diferença mais perceptível entre as análises de difração de raios-X é a existência de picos bem definidos nas análises de difração de raios-X das amostras processadas de insulina. Estes picos são característicos do cloreto de sódio (existente no sistema solvente a uma concentração de 7%) e variam de intensidade nas diferentes condições de processamento, sugerindo que o cloreto de sódio está de alguma forma associado à insulina e não simplesmente incluso nos espaços vazios.

As diferenças de intensidade das respostas, tanto dos picos bem definidos quanto da região amorfa que caracteriza a insulina, nas diferentes análises de difração de raios-X são difíceis de serem percebidos. No entanto, é essa diferença que permite afirmar que as amostras original e processadas sejam avaliadas diferentemente.

Os resultados do processamento da insulina suína em diferentes níveis de pH (Figuras 10, 11 e 12), e das análises de raios-X (Figuras 13, 14, 15 e 16) sugerem a existência de comportamento polimórfico da insulina suína, e esta seria a explicação mais plausível para aumento rápido da concentração seguido de uma queda da concentração até um valor de equilíbrio na dissolução da insulina. O polimorfismo é a existência de diferentes estruturas cristalinas de uma mesma entidade química (vide Anexo 1). Ainda, o polimorfismo explicaria porque a variação da solubilidade com o pH tem um comportamento oposto ao esperado. Os diferentes valores de pH apresentariam a solubilidade de diferentes polimorfos, e não a variação da solubilidade de um único composto. Ainda a respeito da baixa cristalinidade observada nas análises de raios-X, Pikal et al. (1978) ressaltam a importância do polimorfismo para entender sistemas farmacêuticos e citam a cristalinidade parcial como uma classe especial de polimorfismo que pode ter efeitos significativos na taxa de dissolução e na estabilidade química. Esses autores afirmam que a magnitude da diferença observada na taxa de dissolução ou na estabilidade entre as fases cristalina e amorfa sugere que mesmo uma pequena quantidade de fase amorfa em uma amostra cristalina deferente é suficientes para alterar, de forma mensurável, propriedades físicas e químicas.

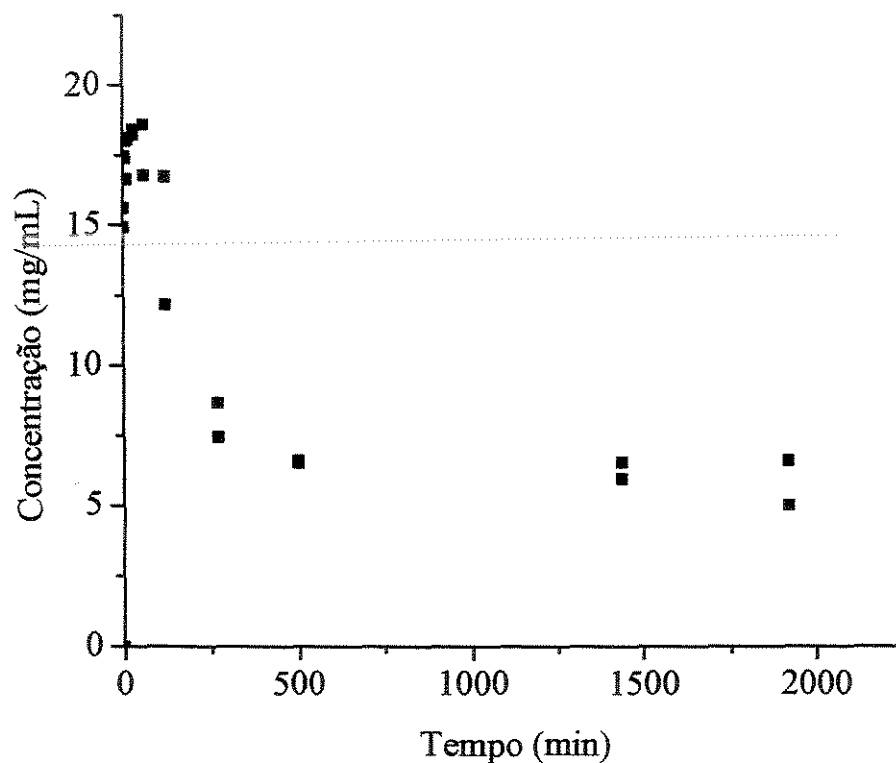
#### ***4.1.2. A dissolução da lisozima e a repetição do comportamento polimórfico***

Ao contrário do que ocorre para a insulina, há uma grande quantidade de artigos que relatam estudos de cristalização de proteínas utilizando a lisozima como proteína modelo (Pusey et al., 2001, Chayen e Saridakis, 2001). Em se tratando especificamente de dados de solubilidade, Howard et al. (1988) determinaram a solubilidade da lisozima em tampão acetato de sódio 0,05 M com diferentes concentrações de NaCl. Para determinar em quais valores de pH seriam feitos os ensaios de medida de tempo de indução, fez-se um ensaio de varredura de condições nas quais a lisozima cristalizaria. Em tampão acetato de sódio 0,05 M em vários níveis de pH (3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0), dissolveu-se em tubos de ensaio 20 mg de lisozima em 1,0 mL de tampão. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M com 20% de NaCl (m/v) de modo que a solução final tivesse 2,0 mL de volume, concentração de lisozima de 10 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,05 M com 10% de NaCl. Pôde-se observar que depois de cerca de uma hora e meia o tubo de ensaio com solução de pH 3,5 apresentava leve turvação. Depois de 18 horas, as soluções de pH 3,5 e 4,0 apresentavam alteração: a solução de pH 3,5 estava completamente turva e com partículas decantadas, e a solução de pH 4,0 apresentava várias partículas em suspensão, apesar de permanecer límpida. Simultaneamente, para verificar a validade dos dados de solubilidade descritos no artigo de Howard et al. (1988), foi feito um ensaio de dissolução de lisozima em tampão acetato 0,05 M pH 4,5 com 10% de NaCl utilizando agitação de frascos do tipo Eppendorf, segundo procedimento descrito no Capítulo 3 (Figura 17). A modificação no método de dissolução foi motivada pela pouca quantidade de lisozima disponível, uma vez que a suspensão em frascos do tipo Eppendorf consumiria menos lisozima.

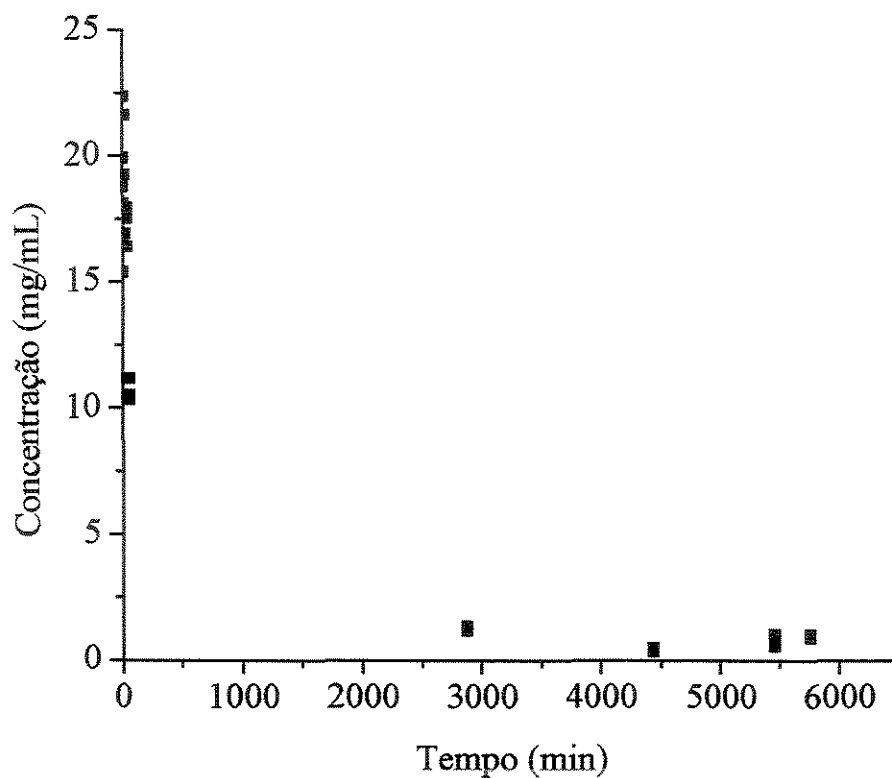
O resultado do ensaio de varredura das condições de cristalização levou à necessidade de determinar a solubilidade da lisozima em pH 3,5, já que em seu artigo Howard et al. (1988) variaram o pH de 4,0 a 7,5; o ensaio de verificação da validade dos dados de solubilidade não obteve o valor da solubilidade da lisozima, pois o tempo usado não foi suficiente para que se alcançasse o equilíbrio (a agitação por tombamento, menos intensa, acarreta uma transferência de massa menos eficiente se comparada à agitação por

auxílio de barra magnética). No entanto, pôde-se observar que a lisozima também apresentava pico de concentração no início da dissolução.

A determinação da solubilidade da lisozima em pH 3,5 foi feita utilizando o mesmo procedimento, porém com tempos maiores para que se alcançasse o equilíbrio (Figura 18). O valor obtido foi  $0,947 \pm 0,071$  mg/mL. Pôde-se observar a repetição do pico de concentração em pH 3,5. Com o valor obtido do ensaio da Figura 18 e dos dados disponíveis no artigo de Howard et al. (1988), pode-se construir uma tabela com os valores de solubilidade da lisozima a 25°C usados neste trabalho (Tabela III).



**Figura 17:** Cinética de dissolução da lisozima em tampão acetato 0,05 M pH 4,50 (com 10% de NaCl) a 25°C por agitação por tombamento.



**Figura 18:** Cinética de dissolução da lisozima em tampão acetato 0,05 M pH 3,50 (com 10% de NaCl) a 25°C por agitação por tombamento.

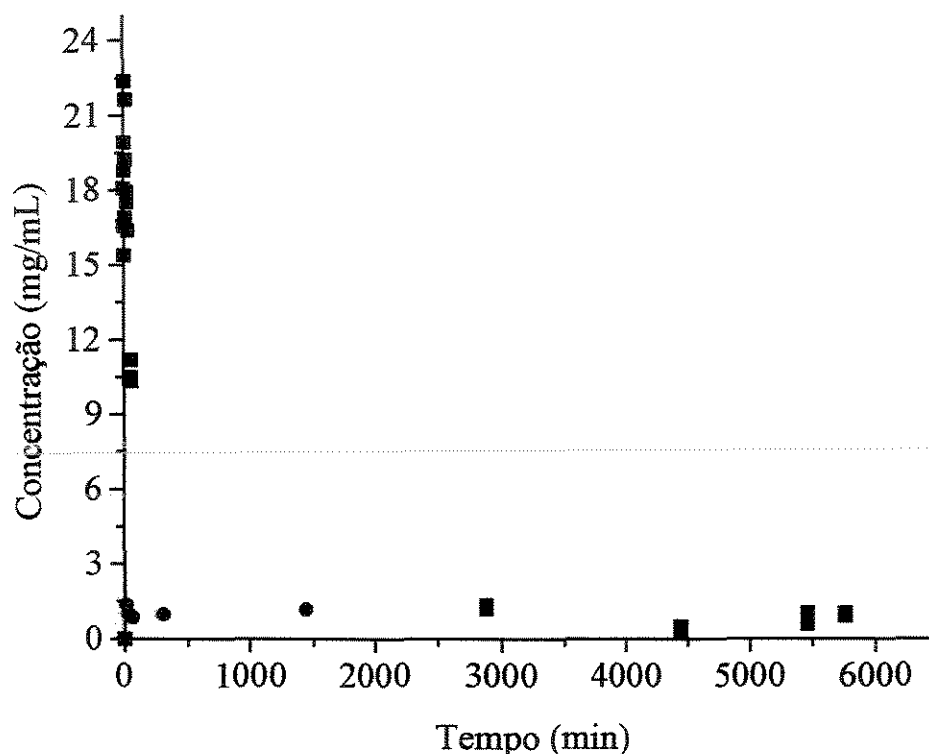
**Tabela III – Solubilidade da lisozima a 25°C em tampão acetato de sódio 0,05 M com 10% de NaCl.**

pH	C* (mg/mL)
3,50	0,947 ± 0,071 <sup>1</sup>
4,00	1,0 <sup>2</sup>

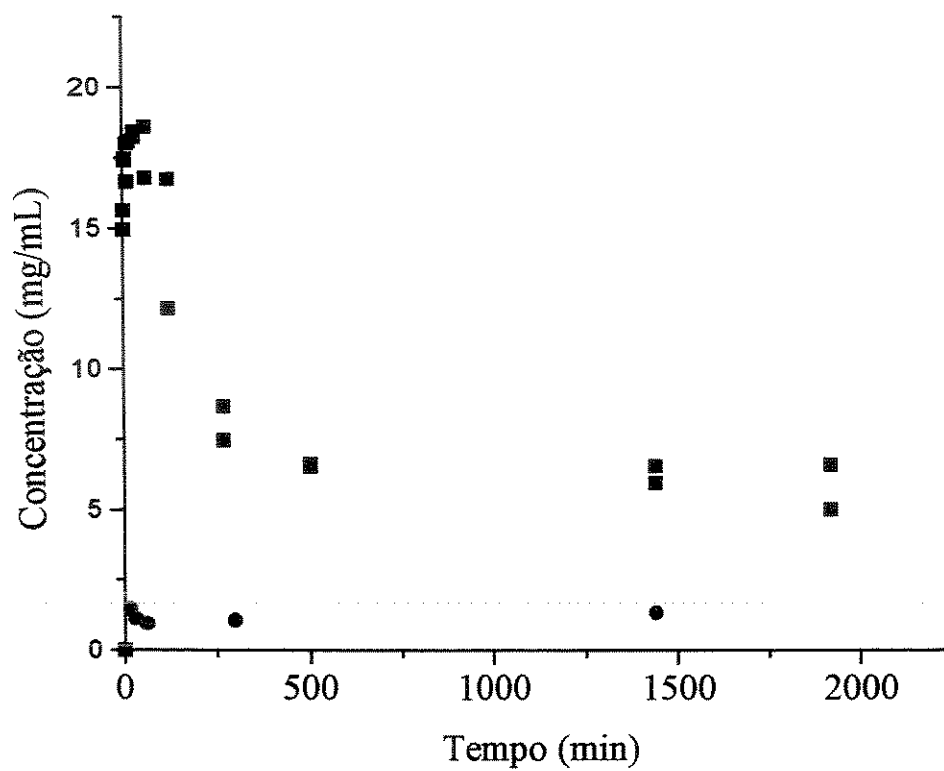
<sup>1</sup>dado obtido experimentalmente;

<sup>2</sup>Howard et al. (1988).

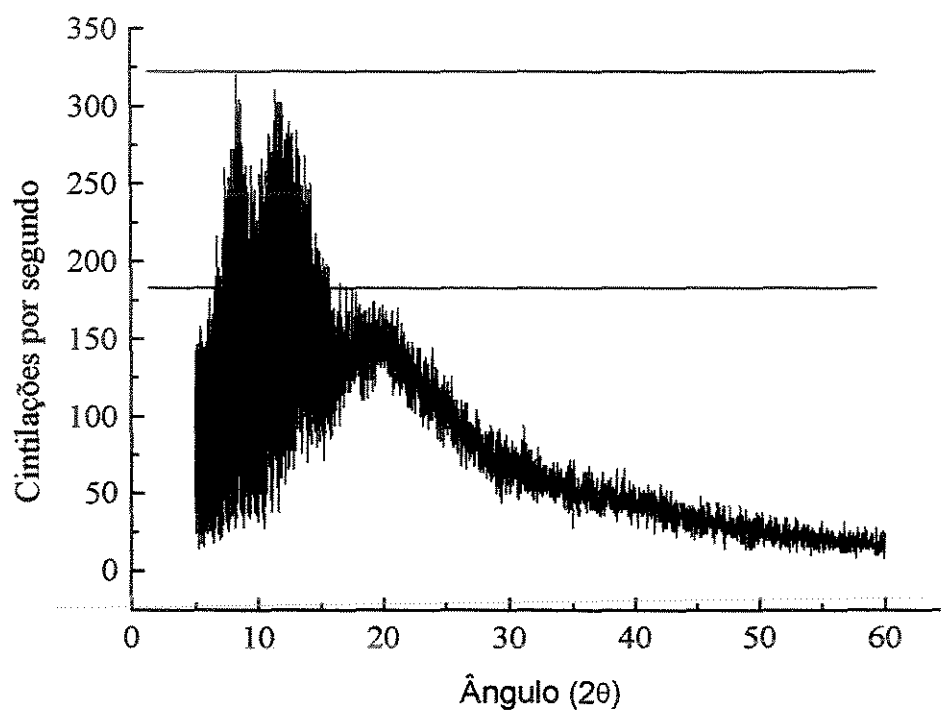
Visto que o pico de concentração também foi observado na dissolução da lisozima, foram feitos ensaios complementares, semelhantes aos feitos para a insulina suína: dissolução da proteína processada (Figuras 19 e 20) e análise por difração de raios-X das amostras de lisozima original e processada (Figuras 21, 22 e 23). Estes ensaios forneceriam mais subsídios para entender o problema. O processamento da lisozima por feito por agitação por tombamento por 48 horas.



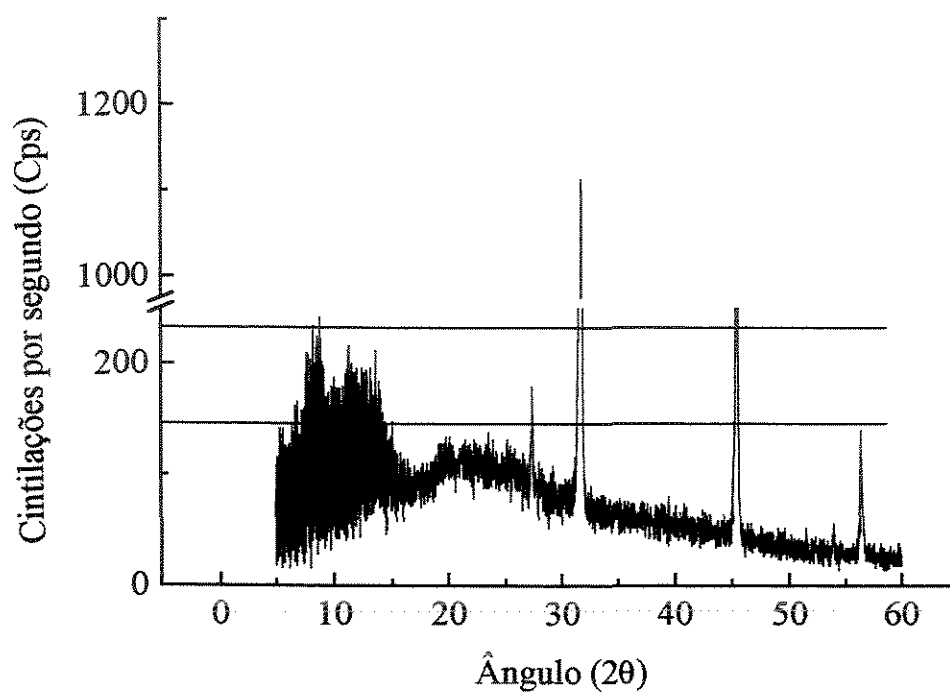
**Figura 19:** Comparação entre as cinéticas de dissolução em tampão acetato 0,05 M pH 3,50 com 10% de NaCl a 25°C da amostra de lisozima original e da amostra de lisozima processada. Os símbolos ■, ●, correspondem às amostras original e processada, respectivamente.



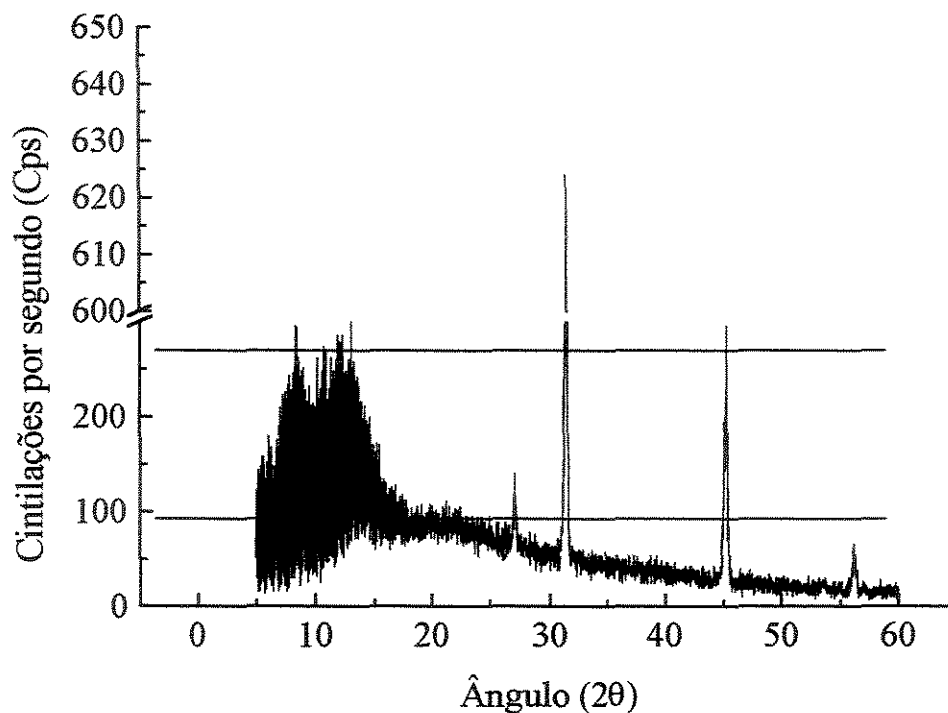
**Figura 20:** Comparação entre as cinéticas de dissolução em tampão acetato 0,05 M pH 4,50 com 10% de NaCl a 25°C da amostra de lisozima original e da amostra processada. Os símbolos ■ e ● correspondem às amostras tal qual e processada, respectivamente.



**Figura 21:** Análise por difração de raios-X da amostra lisozima original. A tensão e a corrente de varredura usada foram respectivamente 40 kV e 20 mA, e a rotação da amostra foi de 20 rpm.



**Figura 22:** Análise por difração de raios-X da amostra lisozima processada em pH 3,50. A tensão e a corrente de varredura usada foram respectivamente 40 kV e 20 mA, e a rotação da amostra foi de 20 rpm.



**Figura 23:** Análise por difração de raios-X da amostra lisozima processada em pH 4,50. A tensão e a corrente de varredura usada foram respectivamente 40 kV e 20 mA, e a rotação da amostra foi de 20 rpm.

As cinéticas de dissolução da lisozima processada em pH 3,5 e 4,5 (Figuras 19 e 20), além das análises por difração de raios-X das amostras de lisozima original e processada nos diferentes níveis de pH (Figuras 21, 22 e 23) permitem inferir que ocorre durante a dissolução da amostra original de lisozima uma mudança da estrutura cristalina ou do grau de cristalinidade. Tal mudança assemelha-se a um comportamento polimórfico das partículas de lisozima. A maneira, ou a intensidade, do comportamento polimórfico parece estar intimamente associada ao pH do ambiente no qual aquela ocorre. Exatamente como ocorre para a insulina.

## 4.2. O CRESCIMENTO CRISTALINO DA INSULINA E DA LISOZIMA

A partir dos dados mostrados na Figura 9 (efeito da temperatura na dissolução da insulina suína), foi possível não somente a determinação da solubilidade, mas também fazer uma estimativa da cinética de crescimento da insulina suína. Como a explicação mais provável para o pico de concentração na dissolução da insulina seria um comportamento polimórfico, pode-se assumir, por hipótese, que a diminuição da concentração de proteína em solução seria em função do crescimento do polimorfo mais estável. Neste caso, existe o compromisso entre dois mecanismos: crescimento da fase estável e dissolução da menos estável. Como a dissolução é rápida em comparação com o crescimento, considera-se que a partir do pico de concentração há apenas crescimento da fase mais estável.

O tratamento dos dados experimentais é explicitado para a curva correspondente à temperatura de 15°C (o tratamento para as demais temperaturas está descrito no Anexo 4). Assim, à temperatura de 15°C, a variação da massa de insulina (em miligramas) com o tempo (em min) a partir do pico de massa em solução de insulina é, de acordo com a equação empírica obtida com auxílio do programa Excel da Microsoft:

$$m = 194,88 - 49,295 \cdot \log(t) \quad (R^2 = 0,9632) \quad (14)$$

onde  $m$  é a massa em solução em miligramas e  $t$  é o tempo em minutos.

Pela hipótese feita acima, a diminuição da concentração corresponde ao aumento da massa do cristal ao longo do tempo é decorrência do crescimento. Portanto:

$$\dot{m}_c = -\frac{dm}{dt} = \frac{21,409}{t} \quad (15)$$

onde  $\dot{m}_c$  é a taxa de aumento da massa de cristal de insulina em mg/min.

Comumente, a cinética de crescimento linear (crescimento do comprimento característico do cristal) é definida como uma lei de potências em relação à supersaturação na qual a constante de proporcionalidade varia com a temperatura (que também influencia a solubilidade e, conseqüentemente, supersaturação) (Bermingham et al., 2000):

$$G = \frac{dL}{dt} = k_G(T) \cdot \sigma^g = k_G(T) \cdot \left( \frac{C - C^*}{C^*} \right)^g \quad (16)$$

onde  $\sigma$  é a supersaturação relativa definida como a razão entre a concentração em solução e a concentração de equilíbrio  $C^*$ ,  $k_G$  é uma constante de proporcionalidade,  $g$  a ordem de crescimento,  $T$  é a temperatura absoluta e  $L$  é a dimensão característica do cristal.

Deve-se relacionar a taxa de crescimento linear  $G$  com a taxa de decremento da insulina em solução:

$$\begin{aligned} \dot{m} = \frac{dm_c}{dt} &= -\frac{dm}{dt} = \frac{dm_c}{dL} \cdot \frac{dL}{dt} = \frac{d(\rho_c \cdot k_v \cdot L^3)}{dL} \cdot \frac{dL}{dt} \Leftrightarrow \\ &\Leftrightarrow \frac{dm_c}{dt} = 3 \cdot \rho_c \cdot k_v \cdot L^2 \cdot G \Rightarrow \\ &\Rightarrow G = \frac{1}{3 \cdot \rho_c \cdot k_v \cdot L^2} \cdot \left( -\frac{dm}{dt} \right) \end{aligned} \quad (17)$$

onde  $G$  é a taxa de crescimento,  $-dm/dt$  é a taxa de decremento da massa em solução,  $\rho_c$  é a densidade do cristal,  $k_v$  é o fator de forma que relaciona a dimensão característica  $L$  com o volume do cristal.

Utilizando como dimensão característica o comprimento médio da distribuição de tamanhos de partículas da amostra original de insulina suína (Anexo 5)  $L$  igual a 117,4  $\mu\text{m}$ ,  $\rho_c$  igual a 0,741 g/mL (Schlichtkrull, 1956) e  $k_v$  igual a 0,594 (medido com auxílio de um analisador de imagens Leica), tem-se que:

$$G = 54,9 \cdot \left( -\frac{dm}{dt} \right) \left[ \frac{\text{mm}}{\text{min}} \right] \quad (18)$$

Assim, com os valores experimentais de concentração e com o valor da solubilidade (Tabela II) determinam-se os valores de supersaturação ao longo do tempo. A equação (15) permite a determinação das taxas de decremento de massa correspondentes. Com as equações (16) e (17) é possível obter os parâmetros  $k_G$  (em função do fator de forma, da

densidade e da dimensão característica do cristal) e  $g$  da equação (16) interpolando os valores de  $\sigma$  e  $\dot{m}$  em uma equação linear:

$$\log(\dot{m}) = \log(0,01822 \cdot k_G) + g \cdot \log(S) \quad (19)$$

Utilizando a relação acima, tem-se que a cinética de crescimento da insulina suína a 15°C em solução de acetato 0,1 M com 7% de cloreto de sódio (m/v) é:

$$G = 8,99 \cdot \sigma^{1,2} \quad (\text{mm/min}) \quad (20)$$

A partir das equações obtidas para a cinética de crescimento nas diferentes temperaturas, pôde-se construir a Tabela IV, que resume os resultados das estimativas das cinéticas de crescimento a diferentes temperaturas.

**Tabela IV – Constantes da cinética de crescimento em função da temperatura**

Temperatura (°C)	$k_G$	$g$
15	8,99	1,2
25	10,3	0,6
35	6,68	1,5

A princípio, os valores apresentados na tabela acima poderiam parecer contraditórios. A constante  $k_G$  deveria variar monotonicamente, normalmente aumentando com a temperatura e o índice  $g$  deveria permanecer constante. É pouco provável que a natureza complexa da insulina seja a causa do desvio, já que diversos trabalhos (Judge et al, 1998, Saikumar et al., 1998, Shekunov e York, 2000) fazem coro ao afirmar que os fenômenos elementares da cristalização de proteínas (nucleação e crescimento) são essencialmente os mesmos de moléculas menores. A média dos valores da ordem de crescimento  $g$ , que deveria ser constante, tem um valor de  $1,1 \pm 0,4$ . A média dos valores da constante de crescimento  $k_G$  é  $8,69 \pm 1,84$ . Assumindo os valores médios como os mais próximos do valor verdadeiro, obtém-se uma taxa de crescimento da insulina suína (em mm/min) nas condições deste estudo de:

$$G = 8,69 \cdot \sigma^{1,1} \quad (21)$$

O fato de a constante de crescimento variar em torno de um valor médio sem uma tendência monotônica, implicando em uma energia de ativação é próxima de zero, além de o valor de  $g$  ser da ordem de um indicam que ocorreu limitação difusional no crescimento cristalino da insulina. A expressão para o crescimento cristalino controlado por difusão é:

$$G = k_d \cdot \sigma = \frac{D}{\delta} \cdot \sigma \quad (22)$$

onde:  $k_d$  é o coeficiente de transferência de massa,  $D$  é o coeficiente de difusividade e  $\delta$  a espessura da camada limite estagnante.

Pode-se corrigir a expressão (21) para uma ordem de crescimento igual a 1,0:

$$G = 8,28 \cdot \sigma^{1,0} \quad (23)$$

Assim, igualando as expressões (22) e (23) e utilizando o coeficiente de difusividade estimado segundo a equação de Stokes-Einstein (Anexo 4), pode-se obter a espessura da camada limite estagnante:  $\delta = 0,64 \mu\text{m}$ . Este valor equivale 0,55% do diâmetro médio da distribuição de tamanho de partícula da amostra original de insulina, que foi utilizado como comprimento característico do cristal.

Pode também estimar a cinética de crescimento linear da lisozima se forem assumidas a hipóteses de que o crescimento cristalino da lisozima é limitado por difusão; a espessura da camada limite estagnante para o crescimento da lisozima é 0,55% do comprimento característico do cristal de lisozima, o qual assume-se ser igual ao diâmetro médio da distribuição de tamanho de partícula da amostra original de lisozima (256  $\mu\text{m}$ ); o coeficiente de difusividade é calculado pela equação de Stokes-Einstein (Anexo 4). Assim, utilizando a equação (22) para a lisozima, obtém-se a seguinte expressão para a cinética de crescimento:

$$G = 6,59 \cdot \sigma \quad (24)$$

#### 4.3. O TEMPO DE INDUÇÃO

#### 4.3.1. Estudo da nucleação da insulina suína

Com os valores de solubilidade definidos (item 4.1.1), foi possível preparar soluções cujo grau de supersaturação fosse conhecido e medir o tempo de indução pela variação da absorbância em 320 nm ao longo do tempo.

**Tabela V – Tempo de indução da insulina suína em pH 5,50 e 25°C**

C (mg/mL)	$t_{ind}^1$ (s)	$t_{ind}^2$ (s)	$t_{ind}^3$ (s)	média (s)	desvio (s)
1,200	3075	3191	-	3133	82
1,566	2160	2296	3094	2517	505
1,652	2413	2413	2413	2413	20 <sup>4</sup>
1,835	2218	1148	1382	1583	563
1,839	1372	2218	2277	1956	506
2,293	720	817	876	804	79
2,999	272	311	-	292	28
3,737	229	282	180	230	51

<sup>1,2,3</sup> diferentes triplicatas;

<sup>4</sup> metade da menor divisão que, nesse caso, corresponde ao erro de leitura do gráfico.

**Tabela VI – Tempo de indução da insulina suína em pH 6,59 e 25°C**

C (mg/mL)	$t_{ind}^1$ (s)	$t_{ind}^2$ (s)	$t_{ind}^3$ (s)	média (s)	desvio (s)
1,878	1245	1245	1304	1265	34
2,622	1129	1148	1168	1148	20
4,007	1118	1099	915	1044	112
4,17	127	331	409	289	146
4,382	88	88	88	88	20 <sup>4</sup>

<sup>1,2,3</sup>diferentes triplicatas;

<sup>4</sup>metade da menor divisão que, nesse caso, corresponde ao erro de leitura do gráfico.

**Tabela VII – Tempo de indução da insulina suína em pH 5,50 e  $\sigma = 1$**

T (°C)	$t_{ind}^1$ (s)	$t_{ind}^2$ (s)	$t_{ind}^3$ (s)	média (s)	desvio (s)
15	2277	2413	-	2345	96
25	1323	1372	2491	1729	661
35	506	603	700	603	97

<sup>1,2,3</sup>diferentes triplicatas.

A variação do tempo de indução –  $t_{ind}$  – com a supersaturação pode ser usada para distinguir entre os dois mecanismos de nucleação primária, além de permitir estimar a tensão interfacial, usando as equações 11 e 12, supondo núcleo esférico ( $\beta = 16,755$ ) e volume molecular igual a  $7,80 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{mol}$  (Schlichtkrull, 1957).

$$\log(t_i) = A + \frac{B}{T^3 \cdot (\log S)^2} \quad (11)$$

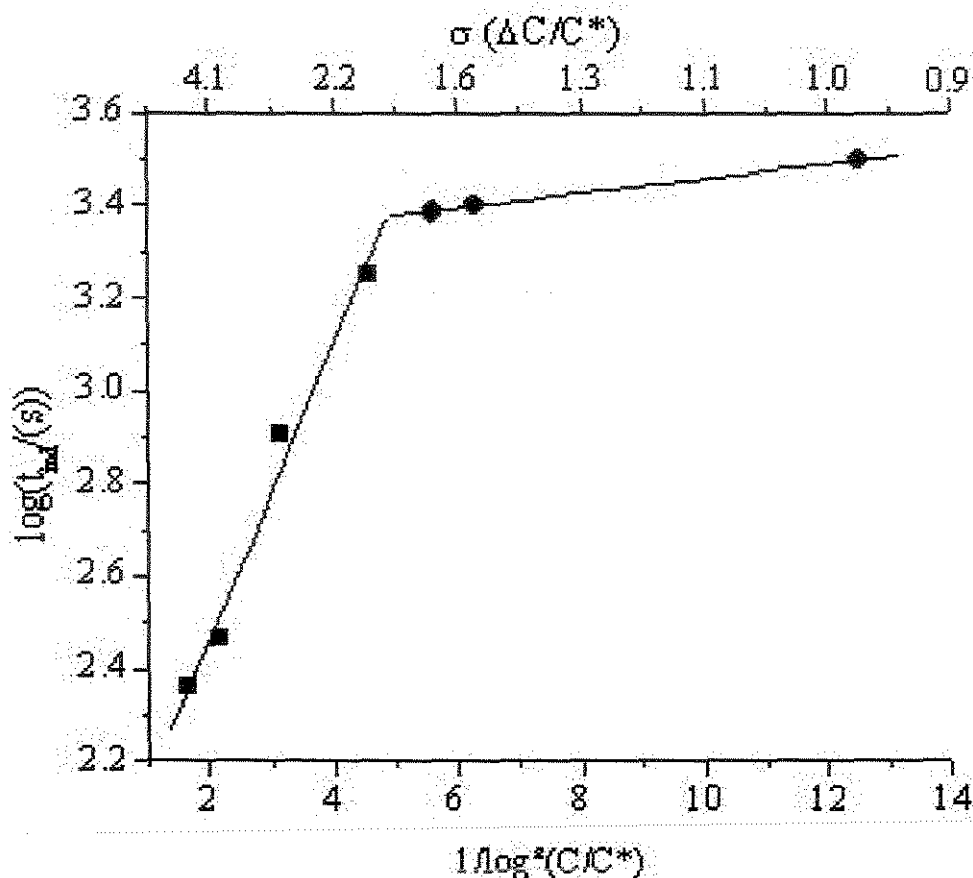
$$B = \frac{\beta \cdot \gamma_s^3 \cdot v^2 \cdot N_A \cdot f}{(2,3R)^3} \quad (12)$$

As Figuras 24 e 25 representam os cálculos descritos acima para a insulina suína a 25°C e valores de pH 5,50 e 6,59, respectivamente. Aos resultados provindos das figuras, referir-se-á como mecanismos homogêneo e heterogêneo. Outra abordagem possível é dizer que para valores maiores de supersaturação, o fenômeno mais significativo é a formação de uma nova superfície (que prevalece na nucleação homogênea), e para valores menores de supersaturação a entropia (ou ordenamento das moléculas) é preponderante (como ocorre na nucleação heterogênea). No entanto, deve-se fazer aqui uma ressalva: o sistema insulina-tampão a partir dos quais os resultados foram gerados era o mesmo para todos os pontos e, portanto, não pode gerar uma nucleação ora homogênea, ora heterogênea. Mais razoável é dizer que a nucleação era heterogênea (inevitável pela presença de superfícies sólidas da cubeta e de superfícies não identificáveis) e, em algumas condições, aproximava-se do mecanismo homogêneo.

Os resultados apresentados na Figura 24 permitiram a feitura da Tabela VIII que mostra os valores de tensão interfacial e do fator *f* (que mensura o grau de heterogeneidade do sistema).

**Tabela VIII – Variação da tensão interfacial da insulina com o pH a 25°C**

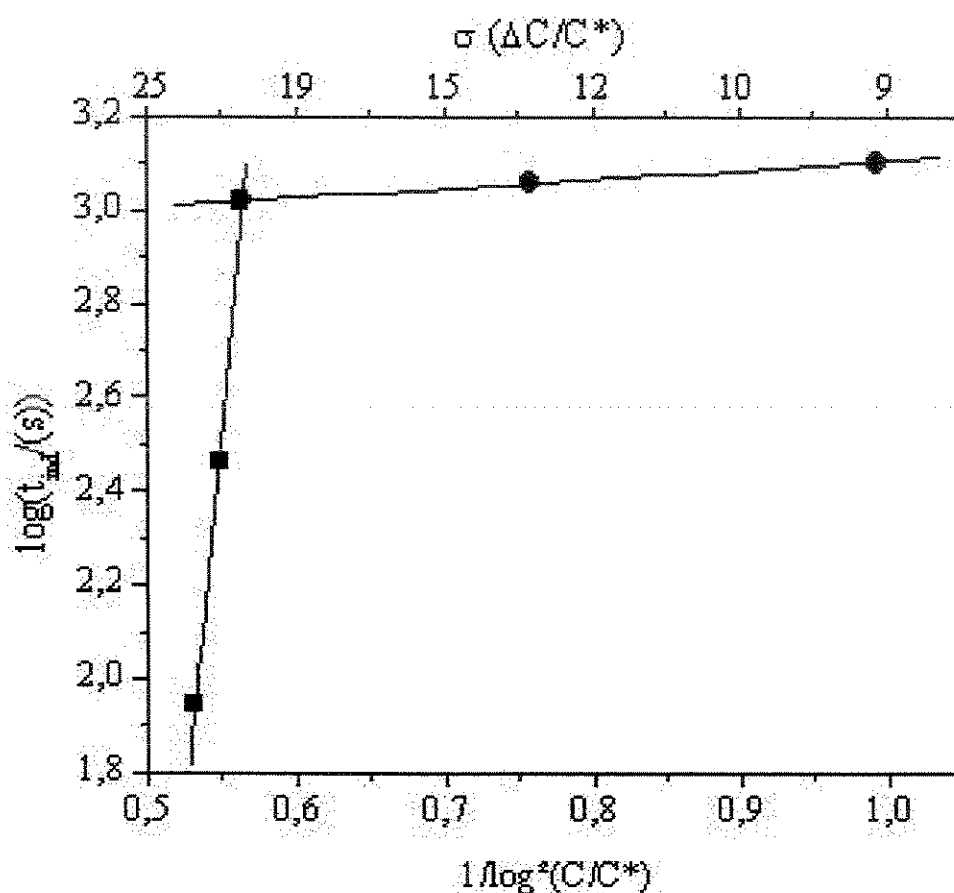
pH	$\gamma_s$ (μJ/m <sup>2</sup> )	<i>f</i>
5,50	457	0,051
6,59	2170	0,00567



**Figura 24:** Identificação dos mecanismos de nucleação da insulina suína a 25°C e pH 5,50. Os símbolos ■ e ● definem retas associadas, respectivamente, à nucleação homogênea e à heterogênea conforme definido no texto.

Pode-se observar na Tabela VIII que a tensão interfacial aumentou quase cinco vezes do pH 5,50 para o pH 6,59. Isso se deve muito provavelmente às interações eletrostáticas. O ponto isoelétrico da insulina é 5,50, o que significa que neste pH a carga elétrica líquida da molécula de proteína é nula. Acima do pI, a carga elétrica líquida da proteína é positiva e, portanto há uma repulsão de natureza eletrostática entre as moléculas de proteína. Como a tensão interfacial pode ser interpretada como uma resistência à formação de unidade de área (por meio da nucleação), a tensão interfacial maior para pH 6,59 indica uma maior resistência à introdução de incrementos de área. O fator  $f$  indica o grau de heterogeneidade da nucleação; quanto menor o fator  $f$ , “mais heterogênea” é a nucleação. No pH 6,59, a repulsão eletrostática implica que há uma maior necessidade da

interferência de superfícies alienígenas no ordenamento das moléculas que formam o núcleo. A Figura 40 mostra a variação do potencial zeta da insulina suína com o pH a 25°C mostra que o potencial zeta – uma indicação da magnitude do potencial no começo da dupla camada difusa ao redor partícula (Hunter, 1996) – é duas vezes maior em pH 6,59 do que em pH 5,50. Isto é mais uma indicação de que as interações eletrostáticas são preponderantes na nucleação da insulina em valores de pH próximos ao ponto isoeletrico, como os estudados neste trabalho.



**Figura 25:** Identificação dos mecanismos de nucleação da insulina suína a 25°C e pH 6,59. Os símbolos ■ e ● indicam, respectivamente, a nucleação homogênea e heterogênea conforme definidos no texto.

A variação do tempo de indução com a supersaturação também permite o cálculo da cinética de nucleação utilizando a abordagem mononuclear, segundo as equações 3 e 9, como mostram as Figuras 26 e 27.

$$t_{ind} = \frac{1}{J_{est} \cdot V} \quad (3)$$

$$J = k_N \cdot \sigma^n \quad (9)$$

Com os resultados expressos nas Figuras 26 e 27, pode-se construir uma tabela com as cinéticas de nucleação homogênea e heterogênea obtidas (Tabela IX).

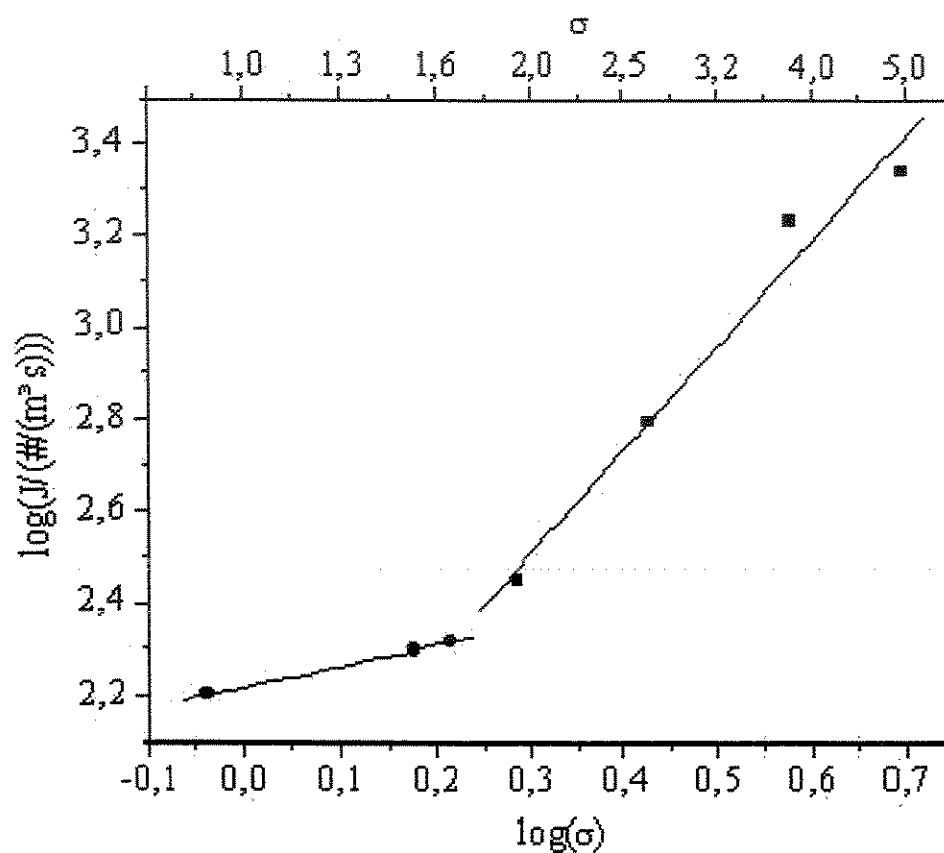
**Tabela IX – Taxas de nucleação da insulina suína a 25°C**

Taxa de nucleação	pH 5,50	pH 6,59
Homogênea (#/m³s)	$J = 67,9 \cdot \sigma^{2,3}$	$J = 0,19 \cdot \sigma^{3,0}$
Heterogênea (#/m³s)	$J = 162,2 \cdot \sigma^{0,5}$	$J = 220,5 \cdot \sigma^{0,3}$

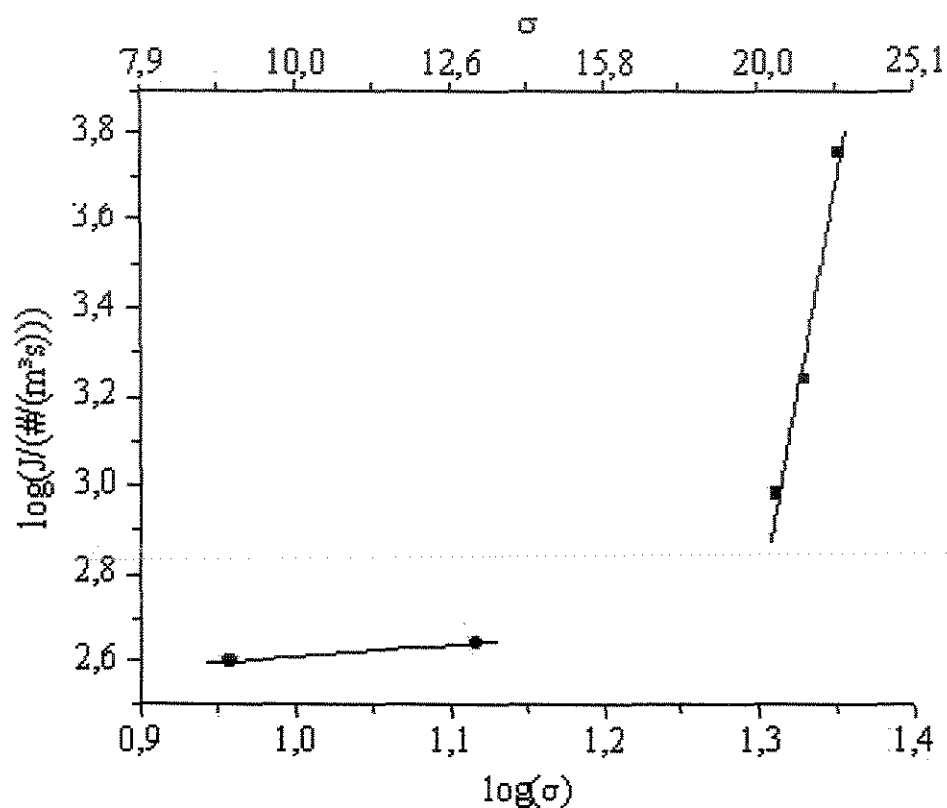
Pode-se observar, nas cinéticas apresentadas na Tabela IX, que, para os dois níveis de pH, a constante de nucleação é maior para a nucleação heterogênea e o índice de nucleação (que expressa a dependência com a supersaturação) é maior para a nucleação homogênea.

Calculou-se, também, a energia de ativação da nucleação, que expressa a dependência da cinética de nucleação com a temperatura. Admitiu-se, por hipótese, que a variação da nucleação com a temperatura segue uma equação do tipo Arrhenius, segundo a equação 10.

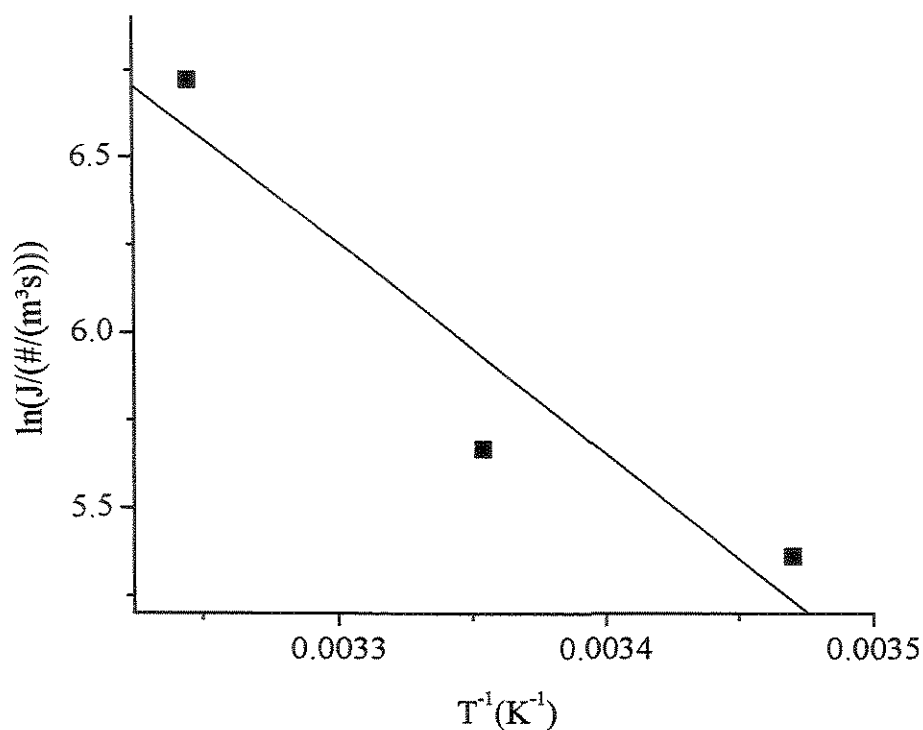
$$k_N = k_N^0 \cdot \exp\left(\frac{E_{att}}{RT}\right) \quad (10)$$



**Figura 26:** Cinética de nucleação da insulina suína em solução acetato 0,1M (com 7% de NaCl) pH 5,50 a 25°C. Os símbolos ■ e ● indicam, respectivamente, a nucleação homogênea e heterogênea conforme definido no texto.



**Figura 27:** Cinética de nucleação da insulina suína a 25°C em solução acetato 0,1M (com 7% de NaCl) pH 6,59. Os símbolos ■ e ● indicam, respectivamente, a nucleação homogênea e heterogênea conforme definido no texto.

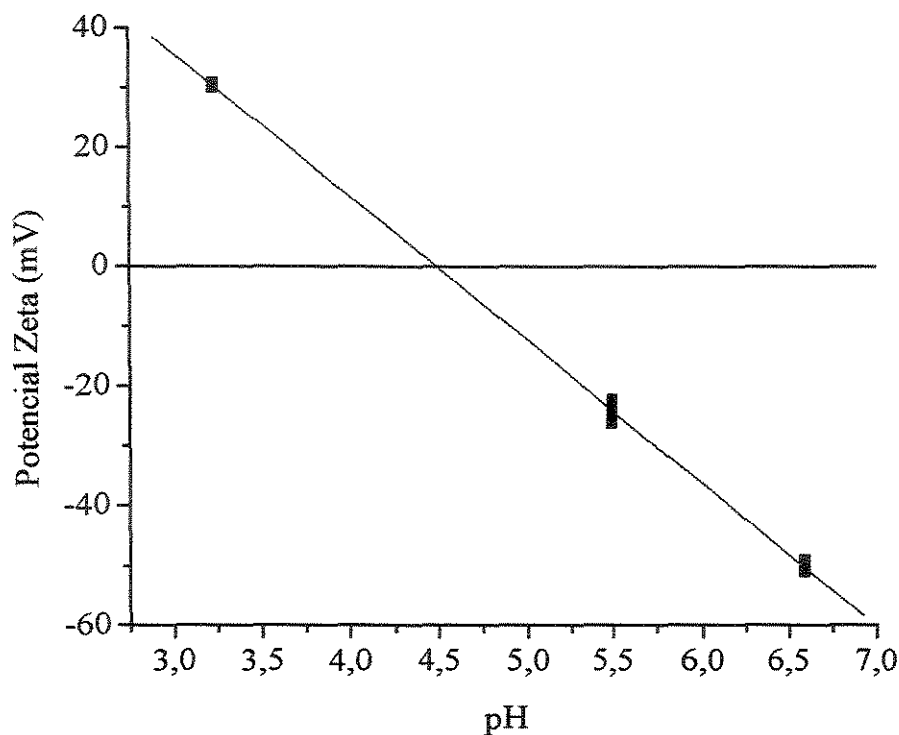


**Figura 28:** variação da taxa de nucleação com a temperatura em pH 5,50 e supersaturação  $\sigma$  igual a 1.

A partir dos resultados apresentados na Figura 28, utilizando a equação 10, obteve-se o valor da energia de ativação:

$$E_a = 49,806 \text{ kJ/mol}$$

A energia de ativação foi obtida a partir de medidas realizadas em um grau de supersaturação no qual a nucleação foi definida como heterogênea. Trata-se, portanto da energia de ativação da nucleação heterogênea. De posse da energia de ativação, é possível obter a variação com a temperatura da cinética de nucleação heterogênea obtida.



**Figura 29:** Variação com o pH a 25°C do potencial zeta da insulina suína em solução de 1mM de NaCl. O potencial zeta é nulo em pH 4,5.

Hunter (1996) define o potencial zeta como o potencial elétrico na camada limite estagnante, ou na dupla camada elétrica da partícula. A Figura 29 apresenta a variação do potencial zeta da insulina suína com o pH medido em solução 0,001 M de NaCl. O potencial zeta de uma dada partícula em um meio eletrólito diluído tende ao potencial zeta à diluição infinita  $\zeta_0$  que é uma propriedade intrínseca da partícula que está relacionada com a distribuição de cargas na superfície da partícula (Hunter, 1981). Da Figura 29, percebe-se que o potencial zeta em pH 5,50 é menor que em pH 6,59 indicando uma maior propensão à aglomeração em pH 5,50. Percebe-se também que o potencial zeta em pH 5,50, o ponto isoelétrico, é diferente de zero. Hunter (1996, 1981) descreve que esse fato é relativamente comum para proteínas e a principal causa para esse desvio a presença de traços de impurezas junto às partículas, pois a medida de potencial zeta é, segundo ele, muito suscetível à presença de impurezas.

### 4.3.2. Estudo da nucleação da lisozima

Com os valores de solubilidade definidos (item 4.1.2), foi possível preparar soluções cujo grau de supersaturação fosse conhecido e medir o tempo de indução pela variação da absorbância em 320 nm ao longo do tempo (Tabelas X, XI, XII e XIII). Mediu-se também o potencial zeta da lisozima nos níveis de pH em que se trabalhou (Tabela XIV).

**Tabela X – Tempo de indução da lisozima em pH 3,50 e 25°C**

C (mg/mL)	$t_{ind}^1$ (s)	$t_{ind}^2$ (s)	$t_{ind}^3$ (s)	média (s)	desvio (s)
12,0	5665	5968	6616	6083	486
12,5	4982	5371	5449	5267	250
13,0	4320	4631	4865	4605	273
13,5	2374	5215	6188	4592	1982
14,0	3542	3911	4340	3931	399
14,5	3152	3892	4203	3749	540

**Tabela XI – Tempo de indução da lisozima em pH 4,0 e 20°C**

C (mg/mL)	$t_{ind}^1$ (s)	$t_{ind}^2$ (s)	$t_{ind}^3$ (s)	média (s)	desvio (s)
9,0	4164	4281	5488	4644	733
12,0	3036	3289	3367	3231	173
14,0	2043	2102	2608	2251	311

**Tabela XII – Tempo de indução da lisozima em pH 4,0 e 25°C**

C (mg/mL)	$t_{ind}^1$ (s)	$t_{ind}^2$ (s)	$t_{ind}^3$ (s)	média (s)	desvio (s)
16,0	4748	4904	5565	5072	434
17,0	2918	3308	4047	3424	573
17,5	2257	2491	2783	2510	264
18,0	3852	4125	4514	4164	333
18,5	1790	1907	2218	1972	221
19,0	2160	2335	3152	2549	529
20,0	1440	1440	1965	1615	303

**Tabela XIII – Tempo de indução da lisozima em pH 4,0 e  $\sigma = 9,85$** 

T (°C)	$t_{ind}^1$ (s)	$t_{ind}^2$ (s)	$t_{ind}^3$ (s)	média (s)	desvio (s)
15	6538	6870	7491	6966	484
35	1086	1729	2970	1928	958

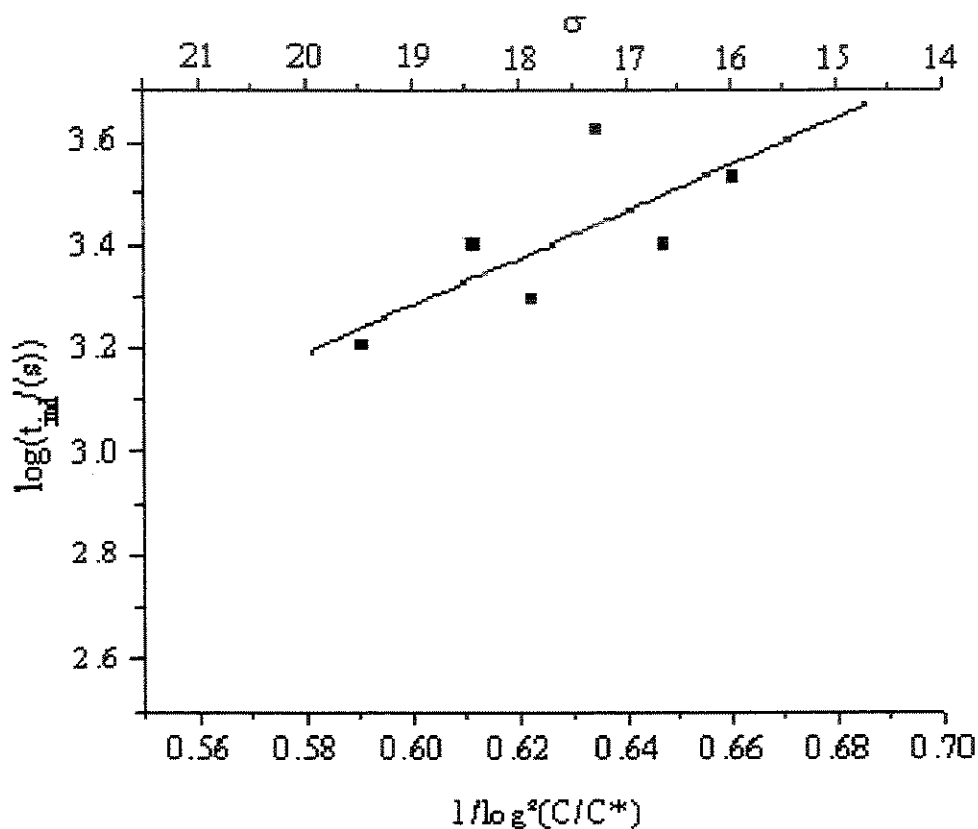
**Tabela XIV – Potencial zeta da lisozima em função do pH**

pH	média	Desvio
3,5	21,5	0,3
4	13,7	0,5
4,5	13,3	0,7

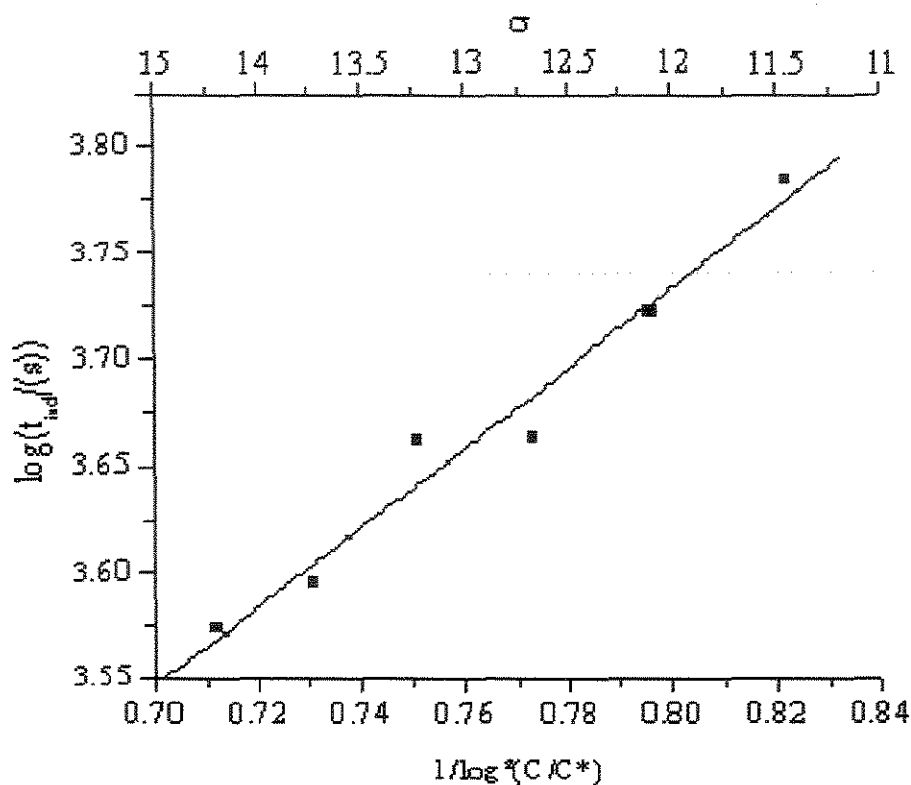
Para a lisozima, não foi possível distinguir dois mecanismos de nucleação. Por isso, utilizou-se as equações (11) e (12) apenas para calcular a tensão interfacial em pH 3,5 e pH 4,0 supondo o fator  $f$  igual a 1 (Figuras 30 e 31).

$$\log(t_i) = A + \frac{B}{T^3 \cdot (\log S)^2} \quad (11)$$

$$B = \frac{\beta \cdot \gamma_s^3 \cdot v^2 \cdot N_A \cdot f}{(2,3R)^3} \quad (12)$$



**Figura 30:** Variação do tempo de indução com a supersaturação que permite calcular a tensão interfacial da lisozima em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,00 com 10% de NaCl a 25°C.



**Figura 31:** Variação do tempo de indução com a supersaturação que permite calcular a tensão interfacial da lisozima em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 3,50 com 10% de NaCl a 25°C.

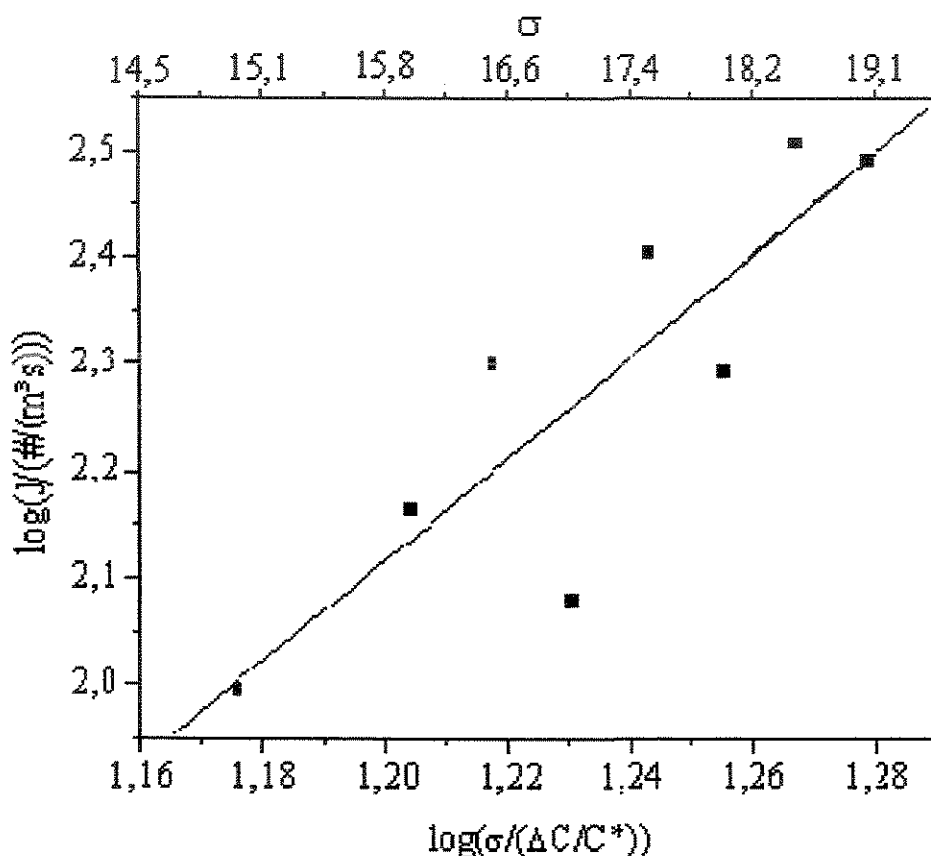
A Tabela XV lista os valores de tensão interfacial a 25°C em pH 3,50 e 4,00. Os valores de tensão interfacial foram calculados supondo núcleo esférico ( $\beta = 16,755$ ) e o volume molecular igual a  $6,66 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3/\text{mol}$  calculado a partir das dimensões da unidade de crescimento – a molécula de lisozima (Diamond, 1972).

**Tabela XV– Tensão interfacial da lisozima a 25°C**

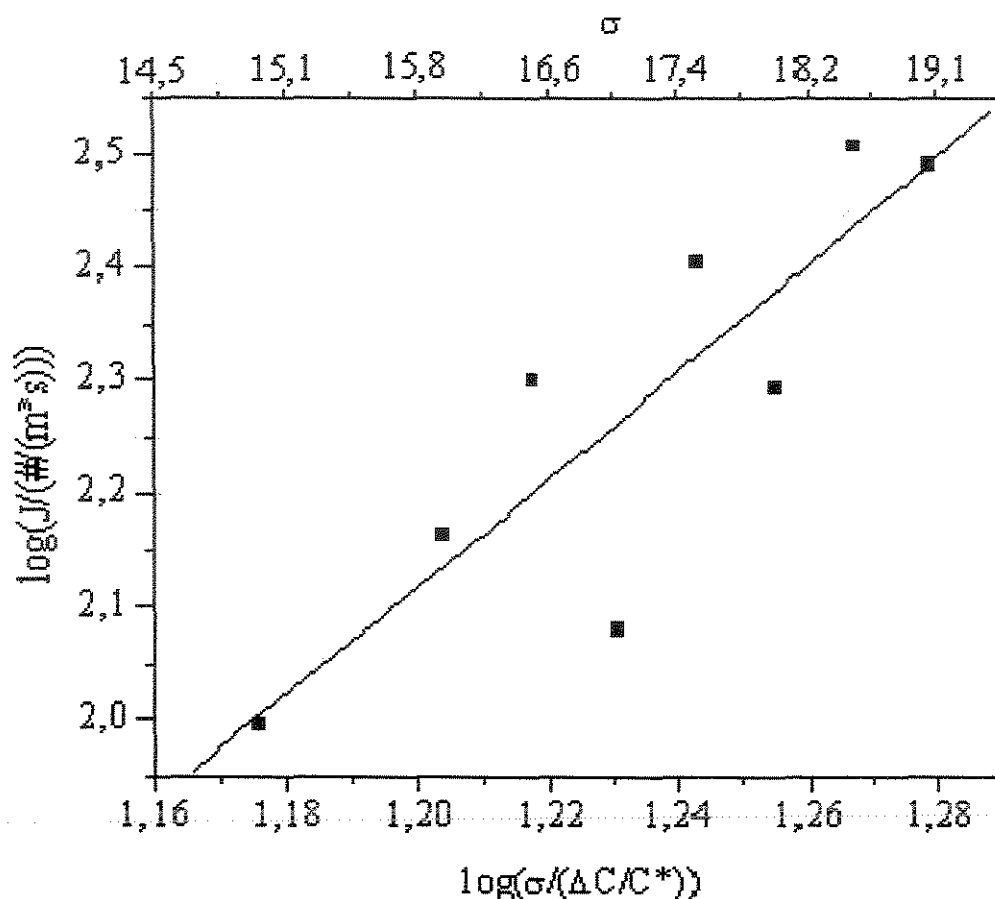
pH	$\gamma_s (\mu\text{J}/\text{m}^2)$
3,50	197
4,00	265

Os valores das tensões superficiais são da mesma ordem de grandeza que as da insulina. Para a lisozima o maior valor de tensão interfacial em pH 4,0 indica uma maior resistência à formação de núcleos neste pH.

Também foram calculadas as cinéticas de nucleação a 25°C, utilizando procedimento análogo ao anteriormente descrito para a insulina suína. A diferença é que para a lisozima não foi possível detectar duas regiões de nucleação primária (Figuras 32 e 33).



**Figura 32:** Cinética de nucleação da lisozima em tampão de acetato de sódio 0,05 M pH 4,0 com 10% de NaCl a 25°C.



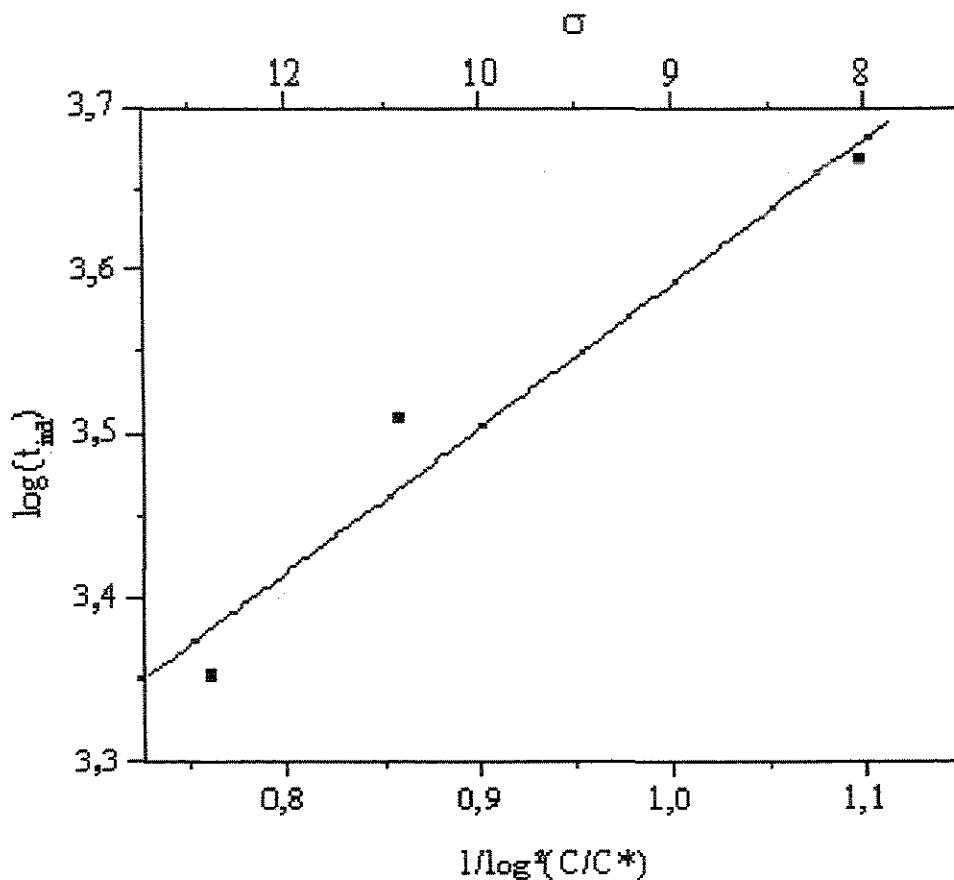
**Figura 33:** Cinética de nucleação da lisozima em tampão de acetato de sódio 0,05 M pH 3,50 com 10% de NaCl a 25°C.

Os resultados expressos nas Figuras 32 e 33 permitem a construção da Tabela XVI, com as cinéticas de nucleação da lisozima a 25°C. Há uma maior dependência da nucleação com a supersaturação em pH 4,0. As interações eletrostáticas, tal qual ocorre para a insulina, também preponderam na nucleação da lisozima. No entanto, a nucleação da lisozima é aparentemente menos reprodutível que a da insulina. Esta “falta de reprodutibilidade” fica mais clara ao analisar a nucleação da lisozima em pH 4,0. A 25°C (Figura 30), tempos de indução entre 1000 e 3500 segundos ocorrem pra valores de  $\sigma$  entre 14 e 20. A 20°C (Figura 34), supersaturações dessa ordem de grandeza estão na zona lábil e implicam em nucleação instantânea. O espalhamento dos valores do tempo de indução em pH 4,0 e 3,5 (Figuras 30 e 31) é outro indício desta maior complexidade. Há outra diferença essencial em relação à insulina: o menor valor de tensão interfacial (resistência à introdução

de uma nova superfície corresponde a um pH de maior potencial zeta (carga superficial). A diferença entre os valores de potencial zeta em pH 4,0 e 4,5 é muito pequena, e ambos são menores que o potencial zeta em pH 3,5, e, no entanto, não foi possível observar nucleação em pH 4,0 (item 4.1.2).

**Tabela XVI – Cinética de nucleação da lisozima a 25°C**

pH	J (#/(m <sup>3</sup> ·s))
3,50	$J = 0,29 \cdot \sigma^{2,3}$
4,00	$J = 0,00026 \cdot \sigma^{4,7}$

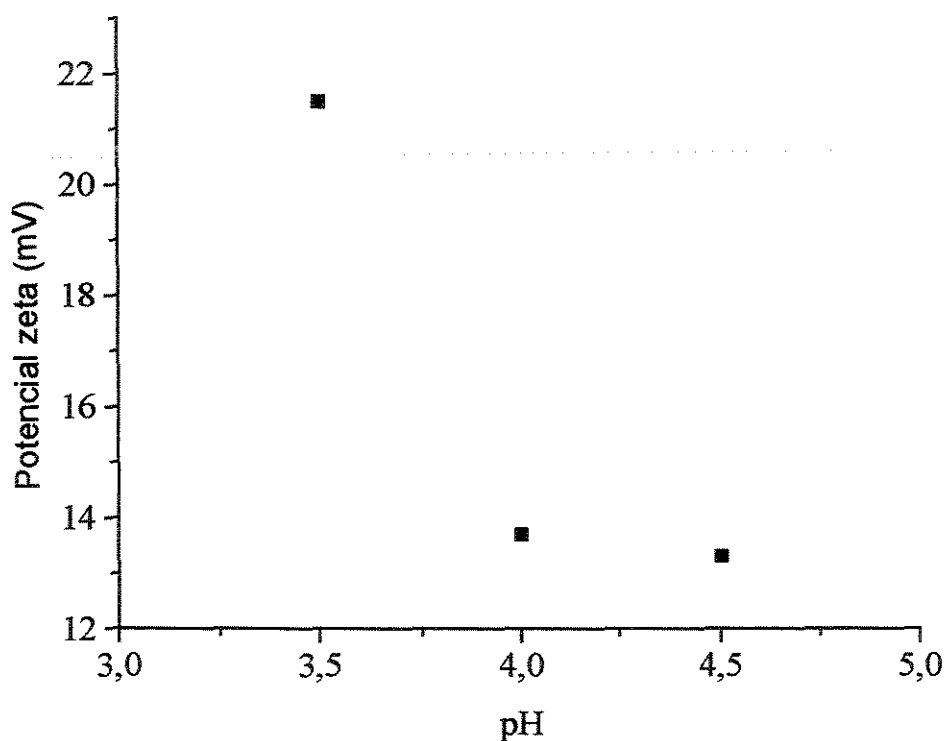


**Figura 34:** Variação do tempo de indução da lisozima com a supersaturação a 20°C em tampão acetato 0,05 M pH 4,0 com 10% de NaCl.

A variação da taxa de nucleação com a temperatura (energia de ativação da nucleação) foi calculada comparando os valores da Tabela XIII e utilizando a equação (10). Como resultado, a energia de ativação da nucleação da lisozima é 32,6 kJ/mol, valor da mesma ordem do obtido para a insulina.

$$k_N = k_N^0 \cdot \exp\left(\frac{E_{att}}{RT}\right) \quad (10)$$

A Figura 35 apresenta a variação do potencial zeta da lisozima em função do pH, nos níveis de pH estudados.



**Figura 35:** Variação do potencial zeta da lisozima com o pH a 25°C em solução de 1mM de NaCl.

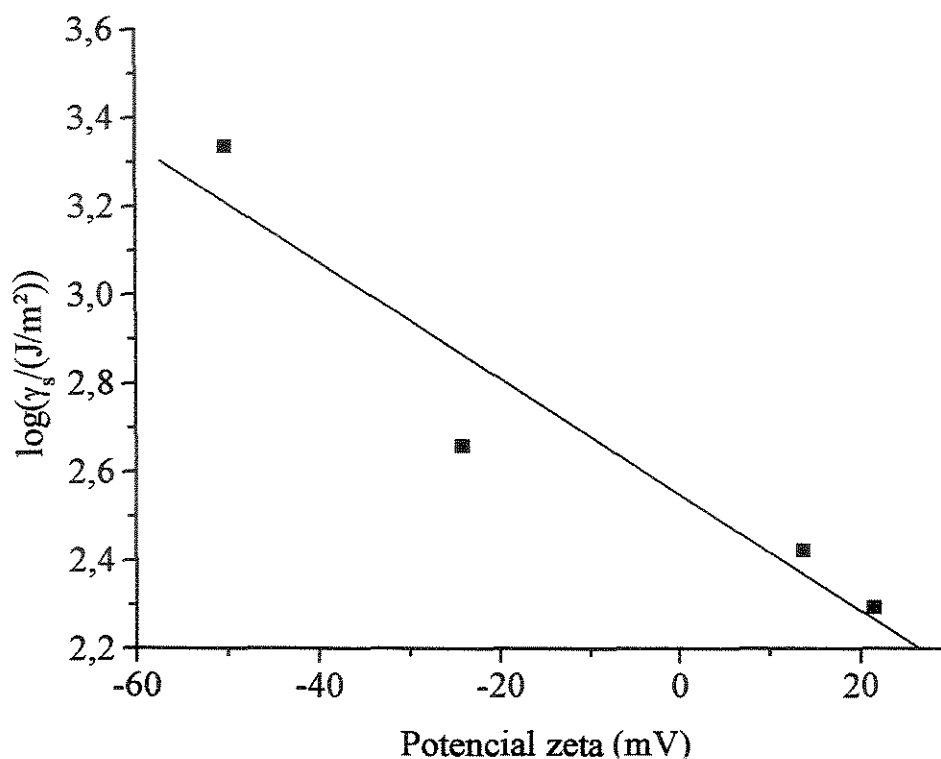
#### 4.4. A INFLUÊNCIA DAS INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS

A influência das atrações eletrostáticas mostrou-se determinante no desempenho da nucleação das proteínas estudadas. Isto pode ser facilmente percebido quando são comparadas as tensões superficiais calculadas com os potenciais zeta medidos nas várias condições para as duas proteínas. A Tabela XIX e a Figura 36 permitem visualizar esta comparação.

**Tabela XVII – Variação da tensão interfacial em função do potencial zeta**

Proteína	pH	$\zeta$ (mV)	$\gamma_s$ ( $\mu\text{J}/\text{m}^2$ )
Lisozima	3,50	21,5	197
Lisozima	4,00	13,7	265
Insulina	5,50	-24,2	457
Insulina	6,59	-50,2	2170

A relação entre a resistência à introdução de uma nova superfície (tensão interfacial) e a carga superficial das partículas (ou potencial zeta) parece não estar limitada à simples repulsão eletrostática. A lisozima em pH 3,5 e a insulina em pH 5,50 têm potenciais zeta muito próximos e tensões superficiais bem diferentes. A natureza da proteína deve ser levada em conta. Contudo, o sinal do potencial zeta – positivo ou negativo – parece ter alguma influência na magnitude da tensão interfacial.



**Figura 36:** Variação da tensão interfacial em função do potencial zeta para as duas proteínas.

Da Figura 36, pode-se extrair uma equação que relaciona a tensão interfacial com o potencial zeta das proteínas:

$$\log(\gamma_s) = 2,5497 - 0,0131 \cdot \zeta \quad R^2 = 0,9025 \quad (14)$$

A importância da equação 14 é evidenciar a importância das interações eletrostáticas na nucleação de proteínas. Embora essa equação tenha sido obtida a partir do resultado de apenas duas proteínas, a boa estimativa de um parâmetro termodinâmico por meio de uma técnica de medida simples e rápida é um incentivo para que se busquem relações como essa para a cristalização de proteínas, como as existentes para a cristalização de moléculas mais simples – a relação entre tensão interfacial e solubilidade de sais inorgânicos (Söhnel e Garside, 1992).

## *CAPÍTULO 5*

### *CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS*

#### *5.1. CONCLUSÃO*

A motivação deste trabalho era tratar a cristalização de proteínas, muito estudada como meio de analisar as estruturas protéicas, com uma ênfase nos aspectos físico-químicos de natureza quantitativa que permitam ao engenheiro de processos efetuar aplicações, ou seja, objetivando aquisição de conhecimentos que se apliquem ou auxiliem ao processo produtivo de proteínas, especificamente no projeto de cristalizadores de proteínas. Desta forma, os parágrafos seguintes sublinham os avanços em relação à motivação inicial do trabalho aqui apresentado.

É possível a obtenção de parâmetros cinéticos e termodinâmicos pertinentes à cristalização de proteínas utilizando a mesma abordagem empregada para moléculas menores, o que mais uma vez comprova que os fenômenos que regem a cristalização de proteínas são essencialmente os mesmos que regem a cristalização de moléculas menores e menos complexas, apesar de haver particularidades na cristalização de proteínas que diferem esta da cristalização de moléculas menores.

Entre as particularidades verificadas na cristalização das proteínas, pôde-se inferir que tanto a insulina suína quanto a lisozima de clara de ovo de galinha apresentam

comportamento polimórfico nos sistemas utilizados, evidenciado pela análise da cinética de dissolução e pelas análises de difração de raios-X dessas proteínas.

Outra particularidade da cristalização de proteína é a preponderância de interações eletrostáticas na nucleação. A resistência à nucleação representada pela tensão interfacial varia – nos casos estudados – exponencialmente com o potencial zeta, que pode ser tratado como uma medida indireta da disposição das cargas superficiais da proteína.

A carga superficial, como um dos aspectos da natureza complexa das proteínas, ressalta a importância do transporte difusional nos fenômenos de cristalização de proteínas. A taxa de crescimento da insulina nas condições estudadas foi limitada pelo transporte das células unitárias à superfície do cristal apesar da agitação vigorosa usada nos ensaios. Além disso, os altos valores de supersaturação necessários à obtenção de tempos de indução da ordem de horas (bastante evidente no caso da lisozima) são outro indicativo da importância da difusão na cristalização de proteínas. Observou-se também que a reprodutibilidade das medidas de tempo de indução da lisozima é menor que a da insulina.

A insulina tem solubilidade retrógrada (que diminui com o aumento da temperatura). O fato, pouco comum para moléculas menores, é relativamente comum para proteínas, ou seja, mais uma particularidade a ser levada em conta na cristalização de proteínas.

## **5.2. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS**

Sugere-se, a partir dos resultados desta dissertação:

- a) Realizar os mesmos ensaios de medida do tempo de indução feitos com a insulina e com a lisozima com outras proteínas para obter os mesmos parâmetros termodinâmicos e cinéticos para tais proteínas e verificar a abrangência da relação obtida entre tensão interfacial e potencial zeta;

- b) Medir as cinéticas de dissolução de outras proteínas e realizar as análises de difração de raios-X destas de modo a estudar o quão comum é o “comportamento polimórfico” das proteínas;
- c) Verificar como outras propriedades intrínsecas das proteínas (massa molecular, excentricidade, ponto isoelétrico, hidrofobicidade, etc.) influenciam nos valores de taxa de nucleação, tensão interfacial, solubilidade, ou na existência de polimorfismo;
- d) Estudar a influência da natureza do sistema solvente (temperatura, pH, composição) no polimorfismo das proteínas.

## CAPÍTULO 6

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ataka, M., Tanaka, S., The growth of large single crystals of lysozyme, *Biopolymers*, 25, 337-350, 1986.
2. Baird, J. K., Scott, S. C., Kim, Y. W., Theory of the effect of pH and ionic strength on the nucleation of protein crystals, *Journal of Crystal Growth*, 232, 50-62, 2001.
3. Bermingham, S., Bruinsma, D., Kramer, H, van Rosmalen, G. D., Witkamp, G. J., Derenzo, S., Giulietti, M., Seckler, M. M., *Industrial Crystallization and Precipitation*, IPT-TU DELFT, São Paulo, 2000.
4. Berglund, K. A., LeCaptain, D. J., The applicability of second harmonic generation for in situ measurement of induction time of selected crystallization systems, *Journal of Crystal Growth*, 203, 564-569, 1999.
5. Bishop, J. B., Fredericks, W. J., Howard, S. B., Sawada, T., *Journal of Crystal Growth*, 122, 41-49, 1992.

6. Blundell, T. L., Dodson, G. G., Hodgkin, D. M., Mercola, D., Insulin: The Structure In The Crystal and Its Reflection in Chemistry and Biology, in: *Advances in Protein Chemistry*, Eds. Anfinsen Jr., C. B., Edsall, J. T., Richards, F. M., Academic Press, New York, 1972.
7. Boistelle, R., Astier, J. P., Crystallization mechanisms in solution, *Journal of Crystal Growth*, 90, 14-30, 1988.
8. Brange, J., Andersen, L., Laursen, E. D., Meyn, G., Rasmussen, E., Toward understanding insulin fibrillation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 5, 517-525, 1997.
9. Calmanovici, C. E., *Contribution à l'étude des phénomènes de dissolution et de cristallisation du procédé dihydrate de production d'acide phosphorique*. Institut National Polytechnique de Toulouse, 1994. (Tese de doutorado).
10. Chayen, N.E., Saridakis, E., Is lysozyme real ideal model protein?, *Journal of Crystal Growth*, 232, 262-264, 2001.
11. Christopher, G. K., Phillips, A. G., Gray, R. J., Temperature-dependent solubility of selected proteins, *Journal of Crystal Growth*, 191, 820-826, 1998.
12. Crosio, M. P., Julien, M., *Journal of Crystal Growth*, 122, 66-70, 1992.
13. Diamond, R., Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme, *Journal of Molecular Biology*, 82, 371, 1974.
14. Fredericq, E., Neurath, H., The interaction with thiocyanate and other anions. The minimum molecular weight of insulin, *Journal of American Chemical Society*, 72, 2684-2691, 1950.

15. Gehle, D., Schügerl, K., Protein recovery by continuous flotation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20, 133-138, 1984.
16. Giegé, R., Mikol, V., Vincendon, P., Eriani, G., Hirsch, E., *Journal of Crystal Growth*, 110, 195-200, 1991.
17. Haas, C., Drenth, J., Understanding protein crystallization of the basis of the phase diagram, *Journal of Crystal Growth*, 196, 388-394, 1999.
18. Howard, S. B., Twigg, P.J., Baird, J. K., Meehan, E. J., The solubility of hen egg-white lysozyme, *Journal of Crystal Growth*, 90, 94-104, 1988.
19. Hunter, R. J., *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*, 1<sup>st</sup> edition, Academic Press, Orlando, 1981.
20. Hunter, R. J., *Introduction to Modern Colloid Science*, 1<sup>st</sup> edition, Oxford Science, New York, 1996.
21. Hvidt, S., Insulin association in neutral solutions studied by light scattering, *Biophysical Chemistry*, 39, 205-213, 1991
22. Jacobsen, C., Garside, J., Hoare, M., Nucleation and growth of microbial lipase crystals from clarified concentrated fermentation broths, *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 666-674, 1998.
23. Judge, R. A., Johns, M. R., White, E. T., Protein purification by bulk crystallization: the recovery of ovalbumin, *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 316-323, 1995.
24. Judge, R. A., Forsythe, E. L., Pusey, M. L., The effect of protein impurities on lysozyme crystal growth, *Biotechnology and Bioengineering*, 56, 776-785, 1998.

25. Kadima, W., Ógendal, L., Bauer, R., Kaarsholm, N., Brodersen, K., Hansen, J. F., Porting, P., The influence of ionic strength and pH on the aggregation properties of zinc-free insulin studied by static and dynamic laser light scattering, *Biopolymers*, 33, 1643-1657, 1993.
26. Kam, Z., Shore, H. B., Feher, G., On the crystallization of proteins, *Journal of Molecular Biology*, 123, 539-555, 1978.
27. Kawashima, Y., Saita, M., Takenaka, H., Improvement of solubility and dissolution rate of poorly water-soluble salicylic acid by a spray-drying technique, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 27, 1-5, 1975.
28. Lancia, A., Musmarra, D., Prisciandaro, M., Measuring induction period for calcium sulfate dihydrate precipitation, *AIChE Journal*, 45, 390-397, 1999.
29. Littke, W., Auersch, A., Lang, P., Burchard, W., *Journal of Crystal Growth*, 110, 201-207, 1991.
30. Littlechild, J. A., Protein crystallization: magical or logical: can we establish some general rules?, *Applied Physics*, 24, 111-118, 1991.
31. Michinomae, M., Mochizuki, M., Ataka, M., Electron microscopic studies on the initial process of lysozyme crystal growth, *Journal of Crystal Growth*, 197, 257-262, 1999.
32. *Martindale: the extra pharmacopoeia*, edited by James E.F. Reynolds, Pharmaceutical Press, London, 1993.
33. Pellegrini, M., Wukovitz, S. W., Yeates, T. O., Simulation of proteins crystal nucleation, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 28, 515-521, 1997.

34. Pikal, M. J., Lukes, A. L., Lang, J. E., Gaines, K., Quantitative crystallinity determinations for  $\beta$ -lactam antibiotics by solution calorimetry: correlations with stability, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 767-773, 1978.
35. Pusey, M. L., Burke, M. W., Judge, R. A., The effect of solution thermal history on chicken egg white lysozyme nucleation, *Journal of Crystal Growth*, 232, 301-307, 2001.
36. Rosenberger, F., Vekilov, P. G., Muschol, M., Thomas, B. R., Nucleation and crystallization of globular proteins – what we know and what is missing, *Journal of Crystal Growth*, 168, 1-27, 1996.
37. Saikumar, M. V., Glatz, C. E., Larsos, M. A., Lysozyme crystal growth and nucleation kinetics, *Journal of Crystal Growth*, 187, 277-288, 1998.
38. Schlichtkrull, J., The minimum mole fraction of metal in insulin crystals prepared with  $Zn^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Mn^{++}$ , or  $Fe^{++}$ , *Acta Chemica Scandinavica*, 10, p. 1455-1458, 1956.
39. Schlichtkrull, J., Shape of rhombohedral zinc-insulin crystals in relation to species and crystallization media, *Acta Chemica Scandinavica*, 10, 1459-1464, 1956.
40. Schlichtkrull, J., The nucleation and growth of insulin crystals, *Acta Chemica Scandinavica*, 11, p. 439-460, 1957.
41. Schlichtkrull, J., The growth of insulin crystals, *Acta Chemica Scandinavica*, 11, p. 1248-1256, 1957.
42. Schlichtkrull, J., Nöring, I. M. .U. S. Patent 2819999, 1958.

43. Schwartz, A. M., Berglund, K. A., In situ monitoring and control of lysozyme concentration during crystallization in a hanging drop, *Journal of Crystal Growth*, **203**, 599-603, 1999
44. Shekunov, B. Yu., York, P., Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery, *Journal of Crystal Growth*, **211**, 122-136, 2000.
45. Shenoy, B., Wang, Y., Shan, W., Margolin, A. L., Stability of Crystalline Proteins, *Biotechnology and Bioengineering*, **73**, 5, 358-369, 2001.
46. Slursky, V., Klibanov, A. M., Langer, R., Mechanism of insulin aggregation and stabilization in agitated aqueous solutions, *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 895-903, 1992.
47. Smith, E. L., Hill, R. L., Lehman, I. R., Lefkowitz, R. J., Handler, P., White, A., *Principles of Biochemistry – Mammalian Biochemistry*, 7<sup>th</sup> edition, MacGraw-Hill, Baskerville, 1985.
48. Söhnel, O., Garside, J., *Precipitation: Basic principles and industrial applications*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992.
49. van Rosmalen, G. D., Witkamp, G. J., *Curso de Processos de Cristalização e Precipitação Industriais*, IPT, São Paulo, 1992.
50. Wilson, L. J., Hu, H., Hale, T., Yang, X., A spectrophotometer-based method for crystallization induction time period measurement, *Journal of Crystal Growth*, **232**, 86-92, 2001.

## ANEXOS

### A.1. POLIMORFISMO

Uma substância pode existir no estado sólido, líquido ou gasoso em função das condições de temperatura e de pressão. Da mesma forma, um sólido pode cristalizar a partir de uma solução, sólido fundido ou de um gás sob diferentes estruturas possíveis, em função das condições de cristalização. O fenômeno segundo uma substância, de composição química definida, pode cristalizar sob diferentes estruturas cristalinas é chamado polimorfismo. As diferentes estruturas possíveis para uma mesma substância de composição química constante são chamadas polimorfos ou variedades polimórficas. Dois polimorfos apresentam propriedades químicas similares, mas as propriedades físicas podem ser muito diferentes. Do ponto de vista mineralógico ou cristalográfico, o termo polimorfismo ou modificação polimórfica só pode ser empregado neste caso.

No caso de cristais de proteína, o termo polimorfo raramente corresponde estritamente a esta definição. Em alguns casos, a composição do cristal difere somente pelo número de moléculas de solvente presentes. Solvatos são fases nas quais a razão entre soluto e moléculas de solvente é constante. Hidratos são os solvatos mais comuns. Em alguns casos, especialmente quando uma fase amorfa precipita, o número de moléculas de solvente no precipitado não é claramente definida e muda quando a cristalinidade aumenta com o tempo.

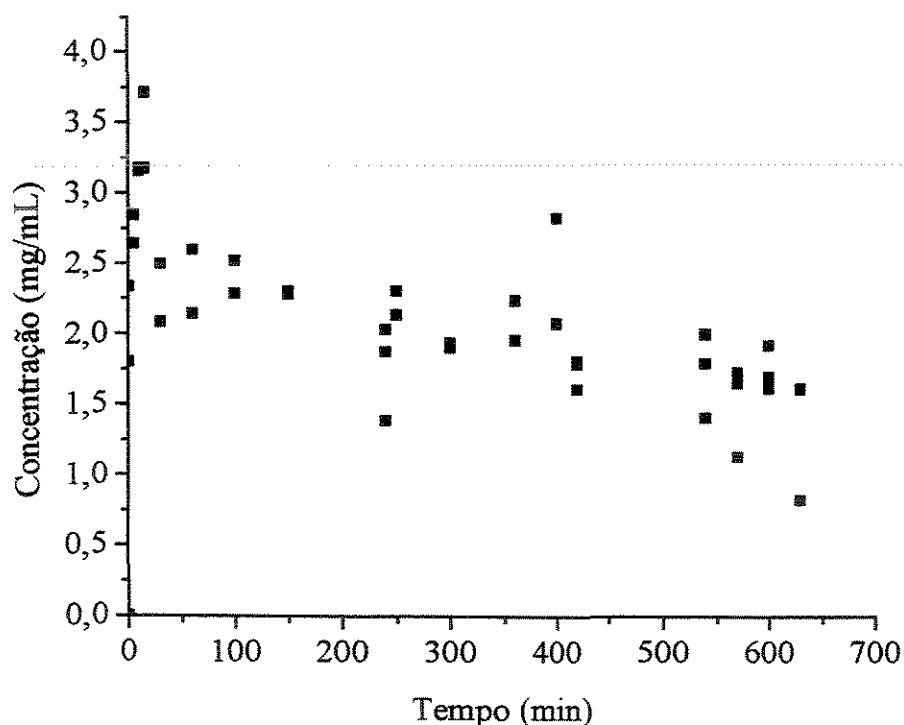
Em solução, quando algumas fases coexistem, a única fase estável é aquela de solubilidade mais baixa. Entretanto, de acordo com a regra de estágios sucessivos de Ostwald, raramente é a fase mais estável que nucleia primeiro. Pelo contrário, se uma solução é supersaturada com respeito a duas fases ao mesmo tempo, é freqüentemente a

fase de maior solubilidade, isto é, a menos supersaturada, que cristaliza primeiro. Quando o crescimento continua, a concentração de soluto decresce até alcançar a curva de solubilidade da fase cristalizada. Neste momento, a solução é supersaturada somente com respeito à fase de menor solubilidade. Se não se formarem cristais desta última fase, então a primeira fase precipitada permanece em um estado metaestável. Por outro lado, quando se forma um cristal da nova fase, a concentração de soluto decresce uma vez mais e a primeira fase se torna instável. Esta se dissolve mais ou menos rápido, gerando soluto que contribui para o crescimento da fase estável (Boistelle e Astier, 1988).

Em um processo de cristalização, a etapa de nucleação determina se uma determinada estrutura polimórfica se formará ou não. A forma polimórfica de maior taxa de nucleação é geralmente observada ( $J_{II} > J_I$  ou  $J_I > J_{II}$ ). Quando as taxas de nucleação são da mesma ordem de magnitude ( $J_I \sim J_{II}$ ), ambas estruturas são formadas simultaneamente (polimorfos concomitantes). As taxas de nucleação competitivas são controladas principalmente pela supersaturação e pela energia interfacial. A energia interfacial é um fator importante na nucleação e no crescimento porque é diferente para as diferentes faces de todas as formas polimórficas. A solubilidade da forma instável é maior e, portanto, a supersaturação é menor, indicando uma menor taxa de nucleação. No entanto, as energias interfaciais podem ser menor, indicando uma maior taxa de nucleação. Qual forma cristaliza, depende do balanço entre supersaturação e energia interfacial. Como o solvente tem muita importância na energia interfacial, diferentes solventes podem provocar a ocorrência de diferentes polimorfos (Shekunov e York, 2000).

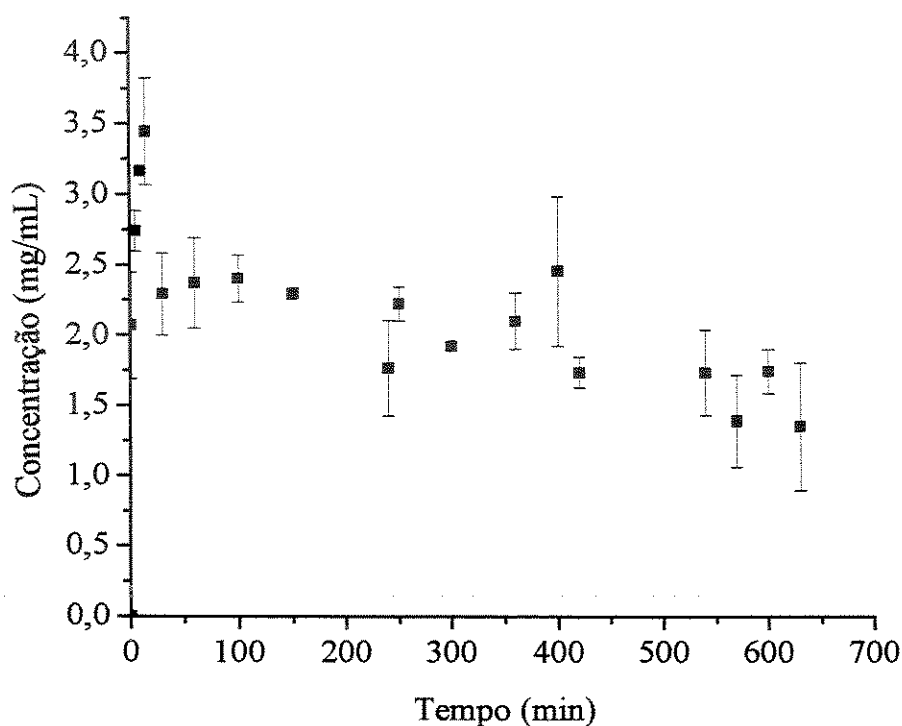
## A.2. EFEITO DA AGITAÇÃO E DA ADIÇÃO DE ZINCO NA DISSOLUÇÃO DA INSULINA

Considerou-se a possibilidade de a diminuição da concentração de insulina após o rápido aumento (com a formação de um pico de concentração) poderia ser devido à desnaturação das moléculas pelo cisalhamento durante a agitação. Por isso, a dissolução por agitação por tombamento em frascos do tipo Eppendorf foi testada. Esta permite a sobrevida da suspensão com pouco cisalhamento, por ser uma agitação pouco intensa. Esse ensaio foi conclusivo para descartar a intensidade da agitação como causa para o comportamento observado na dissolução da insulina suína, pois neste ensaio o pico de concentração também apareceu.



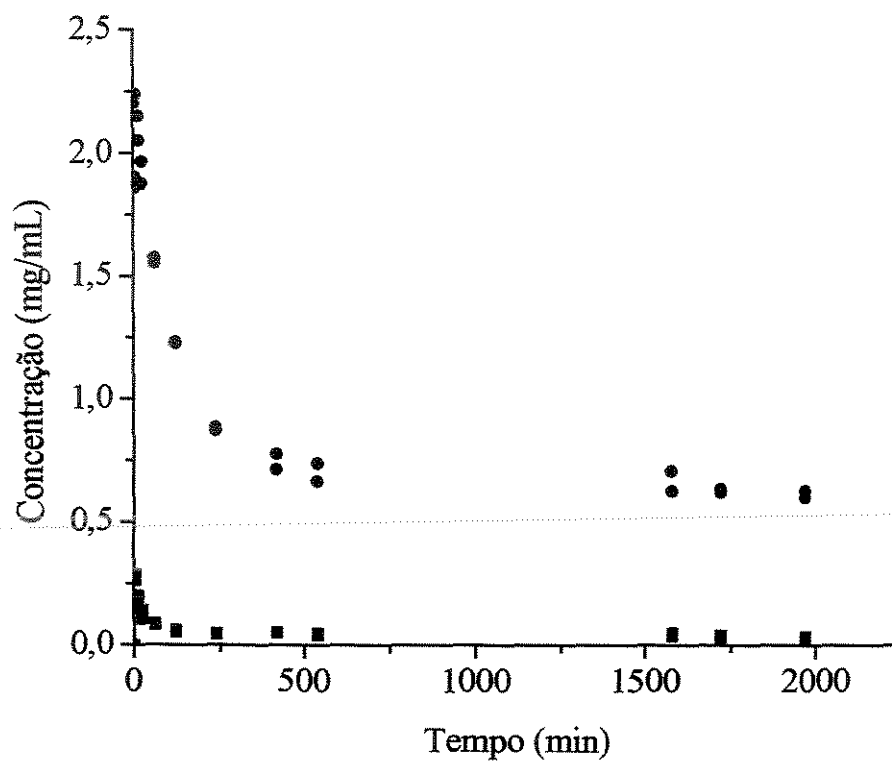
**Figura A.1:** Ensaio de dissolução da insulina suína em tampão acetato 0,1 M pH 5,50 (com 7% de NaCl) a 25°C por agitação por tombamento em frascos do tipo Eppendorf. Os diferentes valores de ordenada para um mesmo valor de abscissa representam diferentes replicatas de um mesmo tempo de dissolução.

O grande número de pontos pode não permitir a boa visualização do comportamento cinético da dissolução. Por isso, construiu-se um gráfico com as médias das replicatas e seus respectivos erros (Figura A.2).



**Figura A.2:** Ensaio de dissolução da insulina suína em tampão acetato 0,1 M pH 5,50 (com 7% de NaCl) a 25°C por agitação por tombamento em frascos do tipo Eppendorf. Os pontos representam as médias de diferentes replicatas de um mesmo tempo de dissolução; as barras representam o desvio-padrão da respectiva média.

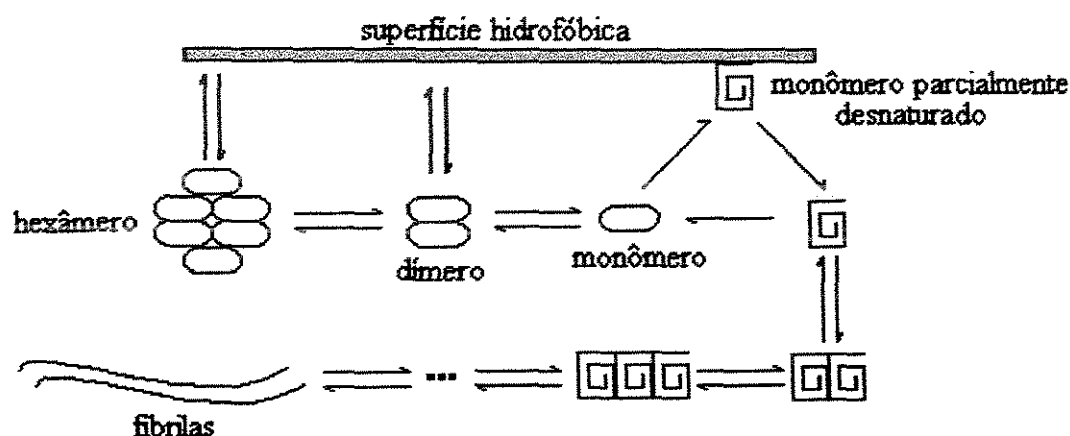
Para verificar a influência do zinco na dissolução da insulina, fez-se o ensaio de dissolução por agitação por barra magnética com e sem adição de zinco (Figura A.3). A adição de zinco foi feita com a intenção de estabilizar os hexâmeros de insulina da suspensão e, eventualmente, observar uma dissolução com o comportamento esperado – o que não ocorreu. A quantidade de zinco adicionada, na forma de sulfato de zinco heptahidratado, foi suficiente para que houvesse oito átomos de zinco por seis moléculas de insulina (hexâmero) em solução (Schlichtkrull, 1956).



**Figura A.3:** Ensaio de dissolução da insulina suína em tampão acetato 0,1 M pH 5,50 (com 7% de NaCl) a 25°C por agitação com barra magnética, com (■) e sem adição (●) de zinco.

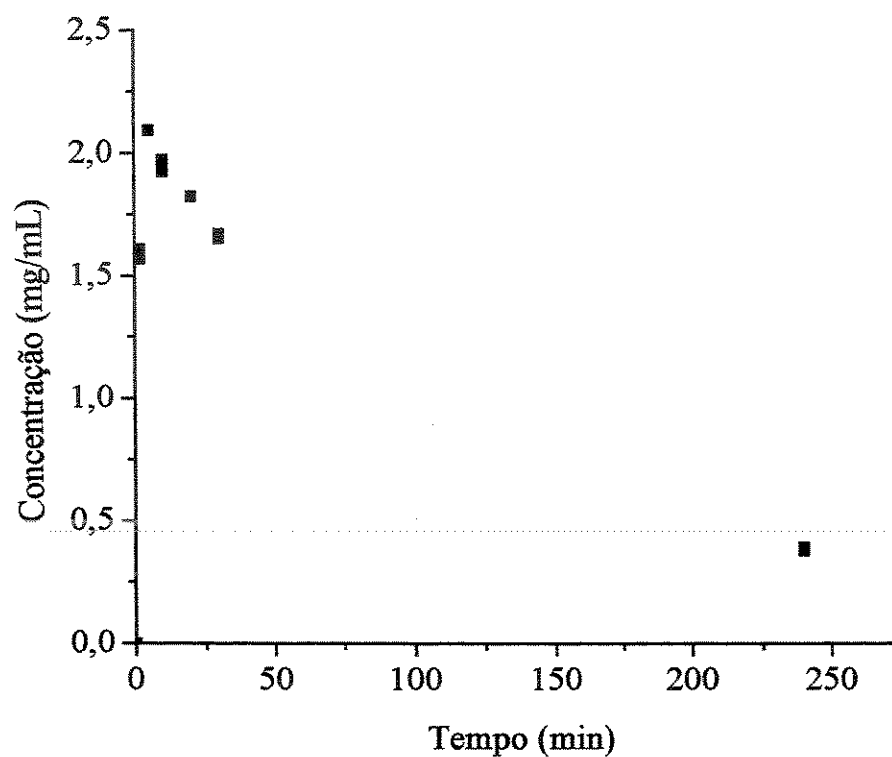
### A.3. FIBRILAÇÃO DE INSULINA

A formação de fibrilas de insulina é um processo físico pelo qual moléculas de insulina parcialmente desnaturadas interagem com outras para formar agregados lineares. O modelo que melhor descreve a fibrilação é baseado na adsorção e destruição parcial da estrutura conformacional do monômero de insulina por superfícies ou interfaces hidrofóbicas. Valores de pH menores do que 3,0 (o que favorece a predominância de monômeros e dímeros de insulina em solução), temperaturas acima de 37°C (o que favorece a exposição de resíduos hidrofóbicos da insulina), alta agitação e a presença de ar ou superfícies poliméricas aceleram a fibrilação (Brange et al., 1997, e Slursky et al., 1992). Uma representação esquemática do modelo de fibrilação pode ser visto abaixo:



**Figura A.4:** Representação esquemática do modelo de fibrilação da insulina (adaptado de Slursky et al, 1992).

Para verificar se o pico de concentração não era devido à desnaturação da proteína por fibrilação, mediu-se a dissolução da insulina em condições nas quais não haveria fibrilação, ou seja, ausência de ar e de superfícies hidrofóbicas (Figura A.5). Como nessas condições verificou-se que a cinética de dissolução da insulina mantinha o pico de concentração, a fibrilação e, conseqüentemente, a desnaturação (por cisalhamento ou fibrilação) foi descartada como explicação para o comportamento da dissolução da insulina.



**Figura A.5:** Dissolução da insulina suína em tampão acetato 0,1 M pH 5,50 com 7% de NaCl em tubo de vidro agitado com esferas de vidro por tombamento com quase ausência de ar – condições nas quais a possibilidade de fibrilação é bastante remota.

#### ***A.4. CÁLCULOS DETALHADO PARA AS ESTIMATIVAS DE CRESCIMENTO CRISTALINO DAS PROTEÍNAS ESTUDADAS***

Para as diferentes temperaturas, a variação da concentração (em mg/mL) de insulina com o tempo (em min) a partir do pico de concentração de insulina é, de acordo com as equações empíricas obtidas com auxílio do programa Excel da Microsoft:

Temperatura (°C)	$m(t)$	$R^2$
15	$m = 194,88 - 49,295 \cdot \log(t)$	0,9632
25	$m = 135,35 - 35,81 \cdot \log(t)$	0,9518
35	$m = 122,82 - 41,55 \cdot \log(t)$	0,9439

onde  $m$  é a massa em solução em mg e  $t$  é o tempo em minutos.

Temperatura (°C)	$\dot{m}(t)$
15	$\dot{m} = \frac{21,409}{t}$
25	$\dot{m} = \frac{21,409}{t}$
35	$\dot{m} = \frac{21,409}{t}$

Temperatura (°C)	$\dot{m}(t)$	$R^2$
15	$G = \frac{0,164}{3 \cdot \rho_c \cdot \beta \cdot L} \cdot \sigma^{1,2}$	0,8532
25	$G = \frac{0,188}{3 \cdot \rho_c \cdot \beta \cdot L} \cdot \sigma^{0,6}$	0,8061
35	$G = \frac{0,122}{3 \cdot \rho_c \cdot \beta \cdot L} \cdot \sigma^{1,5}$	0,8330

Temperatura (°C)	$k_G$	g
15	8,99	1,2
25	10,3	0,6
35	6,68	1,1

A expressão para o crescimento cristalino controlado por difusão é:

$$G = k_d \cdot \sigma = \frac{D}{\delta} \cdot \sigma$$

O coeficiente de transferência de massa  $k_d = \frac{D}{\delta}$  pode ser estimado utilizando a lei de Stokes-Einstein para estimar a difusividade média D nas três temperaturas em que se trabalhou. A difusividade, segundo a lei de Stokes-Einstein é dada por:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_{hex}}$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta,  $\eta$  a viscosidade da solução (utilizou-se a viscosidade da água),  $d_{hex}$  é o diâmetro hidrodinâmico do hexâmero de insulina: 5,6 nm (Kadima et al., 1993).

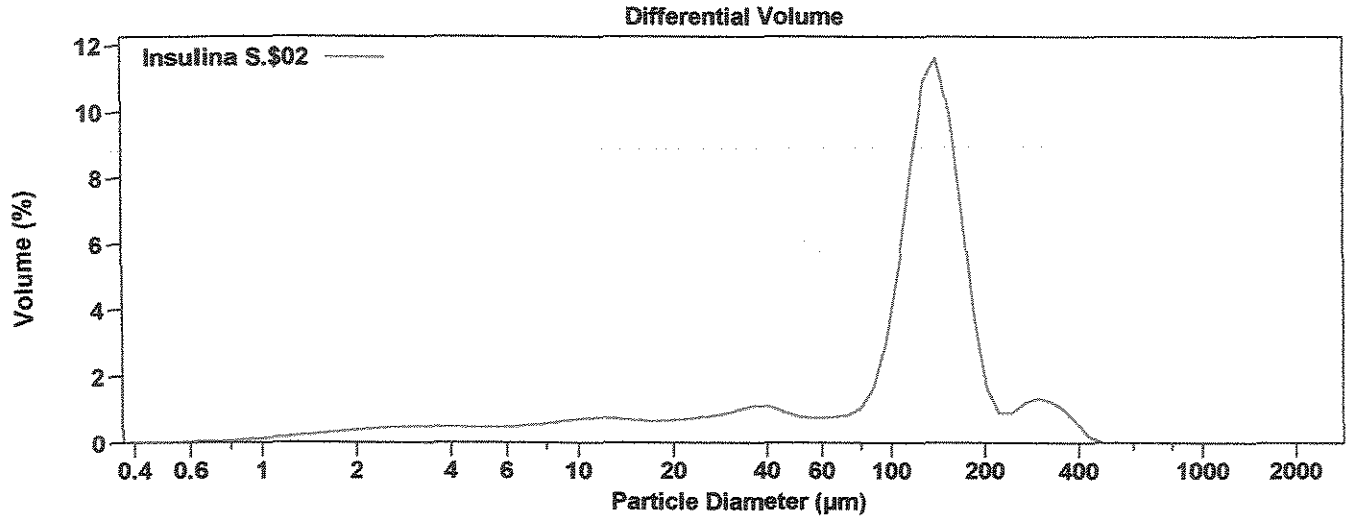
Temperatura (°C)	$\eta$ (cP)	D ( $10^7 \cdot \text{cm}^2/\text{s}$ )
15	1,1404	6,610
25	0,8937	8,727
35	0,7225	11,157

O coeficiente de difusividade da insulina utilizado na estimativa da espessura da camada limite estagnante é a média dos valores da tabela acima:  $D = 8,831 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s} = 5,299 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{min}$ .

Para a lisozima pode-se fazer uma estimativa semelhante utilizando como diâmetro hidrodinâmico da molécula de lisozima 3,2 nm (Baird et al., 2001):  $D = 1,545 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} = 9,273 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ .

File name: Insulina S.\$02  
Sample ID: Insulina Suina  
Run number: 2  
Comments: dispersante água  
Optical model: Fraunhofer.rfd  
LS 230 Small Volume Module

Group ID: IPT - UNICAMP  
Operator: Rafa



Volume Statistics (Arithmetic) Insulina S.\$02

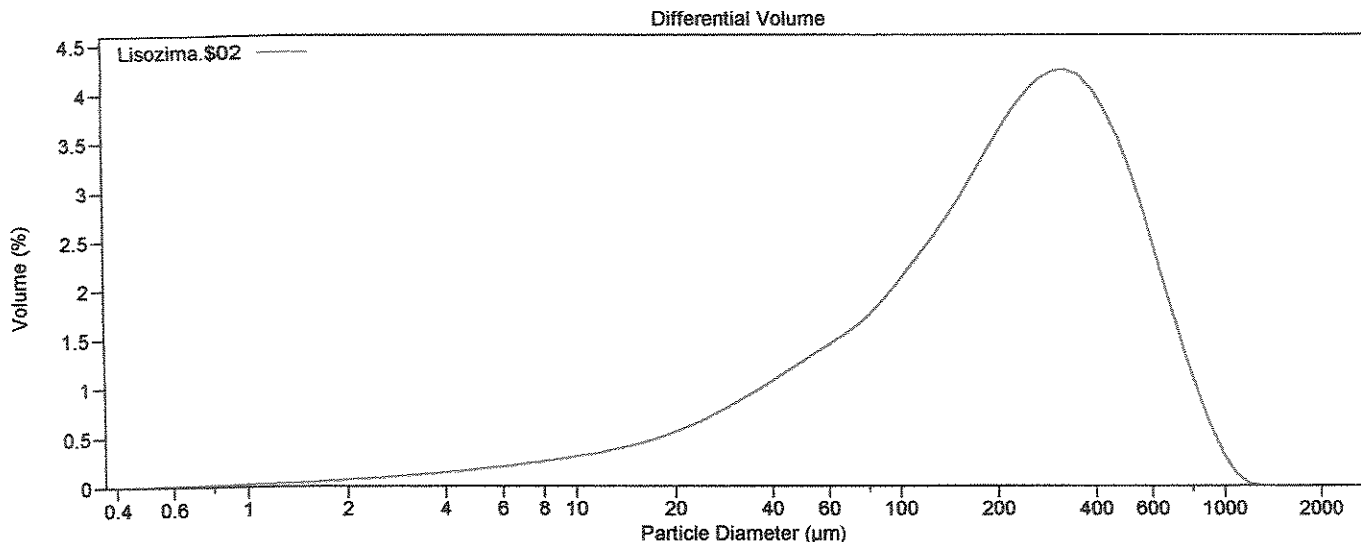
Calculations from 0.375 µm to 2000 µm

Volume:	100%		S.D.:	78.53 $\mu\text{m}$	
Mean:	117.4 $\mu\text{m}$		Variance:	6167 $\mu\text{m}^2$	
Median:	124.5 $\mu\text{m}$		Skewness:	0.763 Right skewed	
Mean/Median Ratio:	0.943		Kurtosis:	1.442 Leptokurtic	
Mode:	140.1 $\mu\text{m}$				
d <sub>10</sub> :	9.125 $\mu\text{m}$				
d <sub>50</sub> :	124.5 $\mu\text{m}$				
d <sub>90</sub> :	190.6 $\mu\text{m}$				
% <	10	25	50	75	90
$\mu\text{m}$	9.125	52.07	124.5	153.8	190.6
$\mu\text{m}$	1	10	100	1000	
% <	0.39	10.7	33.4	100	

Channel	Cum. >	Channel	Cum. >	Channel	Cum. >
Diameter	Volume	Diameter	Volume	Diameter	Volume
(Lower)	%	(Lower)	%	(Lower)	%
µm		µm		µm	
0.375	100	6.760	91.8	121.8	52.5
0.412	99.997	7.421	91.3	133.7	41.5
0.452	99.99	8.147	90.8	146.8	29.9
0.496	99.98	8.943	90.1	161.2	19.9
0.545	99.97	9.818	89.5	176.9	13.0
0.598	99.9	10.78	88.8	194.2	9.20
0.656	99.9	11.83	88.0	213.2	7.52
0.721	99.9	12.99	87.3	234.0	6.62
0.791	99.8	14.26	86.6	256.9	5.71
0.868	99.8	15.65	85.9	282.1	4.51
0.953	99.7	17.18	85.2	309.6	3.17
1.047	99.6	18.86	84.6	339.9	1.92
1.149	99.4	20.71	83.9	373.1	0.87
1.261	99.2	22.73	83.2	409.6	0.21
1.384	99.0	24.95	82.5	449.7	0.013
1.520	98.8	27.39	81.7	493.6	0
1.668	98.5	30.07	80.8	541.9	0
1.832	98.2	33.01	79.9	594.8	0
2.011	97.8	36.24	78.8	653.0	0
2.207	97.4	39.78	77.7	716.8	0
2.423	97.0	43.67	76.6	786.9	0
2.660	96.6	47.94	75.7	863.9	0
2.920	96.1	52.62	74.9	948.3	0
3.205	95.6	57.77	74.2	1041	0
3.519	95.1	63.41	73.4	1143	0
3.863	94.7	69.61	72.7	1255	0
4.240	94.2	76.42	71.8	1377	0
4.655	93.7	83.89	70.8	1512	0
5.110	93.3	92.09	69.2	1660	0
5.610	92.8	101.1	66.2	1822	0
6.158	92.3	111.0	60.9	2000	0

File name: Lisozima.\$02  
Sample ID: Lisozima  
Run number: 2  
Comments: óleo mineral  
Optical model: Fraunhofer.rfd  
LS 230 Small Volume Module

Group ID: Unicamp  
Operator: Rafa



#### Volume Statistics (Arithmetic)

Lisozima.\$02

Calculations from 0.375 µm to 2000 µm

Volume:	100%	S.D.:	205.6 $\mu\text{m}$		
Mean:	256.2 $\mu\text{m}$	Variance:	42250 $\mu\text{m}^2$		
Median:	210.9 $\mu\text{m}$	Skewness:	1.050 Right skewed		
Mean/Median Ratio:	1.215	Kurtosis:	0.866 Leptokurtic		
Mode:	324.4 $\mu\text{m}$				
d <sub>10</sub> :	32.67 $\mu\text{m}$				
d <sub>50</sub> :	210.9 $\mu\text{m}$				
d <sub>90</sub> :	547.8 $\mu\text{m}$				
% <	10	25	50	75	90
$\mu\text{m}$	32.67	91.12	210.9	372.5	547.8
$\mu\text{m}$	1	10	100	1000	
% <	0.12	3.24	27.0	99.7	

Lisozima.\$02

Channel Diameter (Lower) µm	Cum. > Volume %	Channel Diameter (Lower) µm	Cum. > Volume %	Channel Diameter (Lower) µm	Cum. > Volume %	Channel Diameter (Lower) µm	Cum. > Volume %
0.375	100	4.240	98.7	47.94	85.6	541.9	10.3
0.412	99.998	4.655	98.6	52.62	84.4	594.8	7.55
0.452	99.995	5.110	98.4	57.77	83.0	653.0	5.27
0.496	99.99	5.610	98.2	63.41	81.5	716.8	3.45
0.545	99.98	6.158	98.1	69.61	80.0	786.9	2.08
0.598	99.97	6.760	97.8	76.42	78.4	863.9	1.11
0.656	99.96	7.421	97.6	83.89	76.7	948.3	0.48
0.721	99.9	8.147	97.4	92.09	74.8	1041	0.15
0.791	99.9	8.943	97.1	101.1	72.7	1143	0.025
0.868	99.9	9.818	96.8	111.0	70.5	1255	0.0018
0.953	99.9	10.78	96.5	121.8	68.1	1377	0
1.047	99.9	11.83	96.2	133.7	65.6	1512	0
1.149	99.8	12.99	95.8	146.8	62.8	1660	0
1.261	99.8	14.26	95.4	161.2	59.8	1822	0
1.384	99.8	15.65	95.0	176.9	56.6	2000	0
1.520	99.7	17.18	94.6	194.2	53.2		
1.668	99.7	18.86	94.1	213.2	49.6		
1.832	99.6	20.71	93.5	234.0	45.7		
2.011	99.6	22.73	92.9	256.9	41.7		
2.207	99.5	24.95	92.3	282.1	37.6		
2.423	99.4	27.39	91.6	309.6	33.3		
2.660	99.3	30.07	90.8	339.9	29.1		
2.920	99.2	33.01	89.9	373.1	24.9		
3.205	99.1	36.24	89.0	409.6	20.9		
3.519	99.0	39.78	87.9	449.7	17.0		
3.863	98.9	43.67	86.8	493.6	13.5		