

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

PRECIPITAÇÃO DE LISOZIMA E INSULINAS BOVINA E SUÍNA
POR “SALTING OUT” COM O USO DE ELETRÓLITOS VOLÁTEIS

Autor: Leonardo Henrique França de Lima, Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos pré-requisitos exigidos ao
título de Mestre em Engenharia Química

Campinas – São Paulo

Fevereiro de 2006

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

L628p

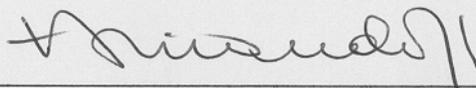
Lima, Leonardo Henrique França de
Precipitação de lisozima e insulinas bovina e suína por
“Salting Out” com o uso de eletrólitos voláteis / Leonardo
Henrique França de Lima.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Everson Alves Miranda
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Precipitação (Química). 2. Operações unitárias
(Engenharia química). 3. Proteínas – Separação. 4.
Eletrólitos. 5. Solubilidade. I. Miranda, Everson Alves. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Precipitation of lysozime and bovine and porcine's
insulines by “Salting Out” with volatiles electrolytes
Palavras-chave em Inglês: Precipitation (Chemistry) Proteins separations,
Electrolytes, Solubility, Downstream processing
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos
Titulação: Mestre em Engenharia Química
Banca examinadora: Sônia Maria Alves Bueno, Pedro Alcântara Pessoa
Filho, Ljubica Tasic e Gustavo Paim Valença
Data da defesa: 23/02/2006

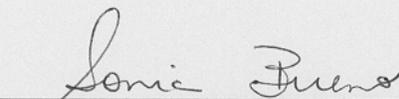
Dissertação de mestrado defendida por Leonardo Henrique França de Lima e aprovada em 23 de fevereiro de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Everson Alves Miranda – Orientador



Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho



Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Leonardo Henrique França de Lima em 23 de Fevereiro de 2006.



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

A meus pais, Arcanjo Jacinto de Lima e
Maria José França Magalhães, minha fortaleza.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais e meus irmãos, pela compreensão, pelo carinho, incentivo e auxílio em todos os momentos. A minha avó, meu tio Eurico e minha tia Márcia por toda a ajuda. Sou muito grato a Deus por ter vocês como família. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda, orientador, professor, conselheiro..., amigo. Obrigado por ter me aberto as portas de seu laboratório, pela confiança, incentivo, paciência e, acima de tudo, por, além de ajudar na formação do pesquisador, ter se preocupado em participar na formação do homem.

Ao Prof. Dr. Raoma Zadeg (*in memoriam*), que iniciou esta linha de pesquisa

Ao Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho minha sincera gratidão pela atenção dispensada, estando sempre disponível quando solicitado. Obrigado por suas sugestões, por sua paciência e por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos do Laboratório Nacional de Luz Síncronon, por ter, gentilmente, deixado à disposição tanto o espaço e os equipamentos de seu laboratório quanto sua experiência profissional para os ensaios de dicroísmo circular.

À Prof^a. Dr^a. Ljubica Tasic, do Instituto de Química da UNICAMP, por ter ajudado na análise dos espectros de Dicroísmo Circular.

À Prof^a Dr^a Helena Coutinho F. de Oliveira, do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo empréstimo do aparelho de liofilização, e ao aluno de doutorado Alessandro Salerno, do mesmo laboratório, pela disponibilidade e pelo auxílio empregado.

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin, do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massa, do Instituto de Química da UNICAMP, por ter disponibilizado o espaço e os equipamentos de seu laboratório para os ensaios de verificação de pureza das

amostras por espectrometria de massa, e aos pesquisadores Rodrigo Ramos Catharino e Leonardo S. Santos, do mesmo laboratório, pela assessoria e por terem acompanhado a execução destes ensaios.

À Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno e ao Prof. Dr. Gustavo Paim Valença, pelas sugestões dadas no exame de qualificação que muito colaboraram na continuidade e finalização da tese.

Aos professores membros da banca examinadora: Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho, Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno, Prof. Dr. Gustavo Paim Valença e Prof^a. Dr^a. Ljubica Tasic.

À Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno e à Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes por disponibilizarem seus laboratórios para a execução de experimentos.

Aos colegas de laboratório: Alexandre, Ana Paula, Christiane, Érika, Fabiana, Geórgia, Goran, Igor, Isa, Mariana, Moysés, pela ajuda e pelo ambiente de trabalho. Ao amigo Alexandre Tashima por seus conselhos e sugestões e pelas conversas. Ao Igor Bresolini e à Ana Paula, por terem, tantas e tantas vezes, “quebrado o galho” em problemas de “aplicativo” no computador.

Aos alunos de iniciação científica: Marina, Paloma, Alexandre, Leonardo, Francine.

Aos demais colegas da FEQ: Édler, Elaine, Èrika Koroishi, Ivana, Ivanildo, João Paulo, Lucas, Carlo, Mardoni, Paulo, Roberto, Ronaldo, Rafaela, Sérgio, Uiram.

Aos amigos, irmãos e mestres: à família T.A.S.G. UNICAMP, ao Pablo y Castro (“Pico”), Shifu e Mestre Cai.

Ao meu grande irmão Moysés, que esteve ao lado em momentos de risos e de lágrimas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse possível, meu muito obrigado.

“Nada a temer senão o correr da luta,
Nada a fazer senão esquecer o medo”.
de “Caçador de Mim”
Sérgio Magrão/Luís Carlos Sá.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
NOMENCLATURA.....	xv
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVO.....	3
1.2. ETAPAS EXECUTADAS.....	4
CAPÍTULO 2.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	5
2.1.1. <i>Modelagem da precipitação de proteínas por “salting out”</i>	8
2.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM O USO DE ELETRÓLITOS VOLÁTEIS.....	13
2.2.1. <i>Equilíbrio entre as espécies carbamato, amônia, dióxido de carbono</i>	14
2.3. CARBAMATO DE AMÔNIO – BREVE HISTÓRICO E PRINCIPAIS APLICAÇÕES.....	17
2.4. CARACTERÍSTICAS DA LISOZIMA E DA INSULINA PERTINENTES A ESTUDOS DE SOLUBILIDADE.....	18
2.4.1. <i>Lisozima</i>	18
2.4.2. <i>Insulina</i>	19

CAPÍTULO 3.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. MATERIAIS.....	22
3.1.1. Reagentes.....	22
3.1.2. Equipamentos.....	23
3.2. PROCEDIMENTOS.....	23
3.2.1. Determinação da concentração das proteínas.....	23
3.2.1.1. Verificação da influência do sal volátil no coeficiente de absorção da lisozima.....	24
3.2.1.2. Curvas padrão de insulina bovina e suína.....	24
3.2.2. Preparo das soluções de sal volátil.....	25
3.2.3. Condições comuns a todos os ensaios de precipitação.....	25
3.2.4. Cinética de precipitação de lisozima.....	26
3.2.5. Curvas de solubilidade de lisozima.....	27
3.2.6. Análise microscópica de cristais de lisozima.....	27
3.2.7. Solubilização de insulina suína e bovina.....	28
3.2.8. Cinéticas de precipitação e curvas de solubilidade para as insulinas bovina e suína.....	28
3.2.9. Modelagem da precipitação (gráficos de Cohn).....	29
3.2.10. Balanços de massa.....	29
3.2.11. Avaliação de modificação estrutural pós-precipitação de insulina bovina pela técnica de dicroísmo circular.....	29

CAPÍTULO 4.	32
RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1. ENSAIOS PRELIMINARES.....	32
4.1.1. <i>Determinação da concentração de proteínas</i>	32
4.1.1.1. <i>Curvas padrão de lisozima</i>	32
4.1.1.2. <i>Curvas padrão de insulina bovina e suína</i>	36
4.2. PRECIPITAÇÃO DE LISOZIMA COM SAIS VOLÁTEIS.....	37
4.2.1. <i>Determinação do tempo de equilíbrio para a precipitação de lisozima com sais voláteis</i>	37
4.2.2. <i>Curvas de solubilidade de lisozima em solução de carbamato de amônio</i>	40
4.2.3. <i>Curvas de solubilidade de lisozima em solução de sal volátil</i> <i>R_{N/C} = 2,5</i>	45
4.2.4. <i>Análise microscópica de cristais de lisozima obtidos em R_{N/C} igual a 2,5</i>	49
4.2.5. <i>Balanço de massa para a precipitação de lisozima com sais voláteis</i>	51
4.3. PRECIPITAÇÃO DE INSULINAS BOVINA E SUÍNA COM SAIS VOLÁTEIS.....	53
4.3.1. <i>Cinética de precipitação e curvas de solubilidade de insulina bovina em soluções com sais voláteis</i>	54
4.3.2. <i>Balanço de massa para a precipitação de insulina bovina com sais voláteis</i>	58
4.3.3. <i>Cinética de precipitação e curvas de solubilidade de insulina suína em sais voláteis</i>	60

4.3.4. <i>Balanço de massa para a precipitação de insulina suína com sais voláteis</i>	65
4.4. AVALIAÇÃO POR DICROÍSMO CIRCULAR DE MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS EM INSULINA BOVINA CAUSADAS PELA PRECIPITAÇÃO POR SAL VOLÁTIL.....	67
CAPÍTULO 5	73
CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	73
5.1. CONCLUSÕES.....	73
5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
CAPÍTULO 6	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO	85
DICROÍSMO CIRCULAR E ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE PROTEÍNAS – FUNDAMENTOS BÁSICOS	85

RESUMO

A precipitação de proteínas através da adição de sais (por exemplo, o sulfato de amônio e cloreto de sódio) é uma técnica comumente utilizada em recuperação e purificação de proteínas. Contudo, a remoção de sais do precipitado e tratamento da solução remanescente contendo altas concentrações de sal são etapas limitantes, devido ao custo do processo e a regulamentação ambiental. O uso de eletrólitos voláteis é uma alternativa aos sais convencionais neste tipo de processo, visto permitirem um fácil processamento e redução do custo do tratamento de efluentes: os sais voláteis podem ser removidos com a redução de pressão ou elevação da temperatura. Neste trabalho foram determinadas as curvas de solubilidade para a lisozima e insulinas bovina e suína em soluções aquosas de sais voláteis, em sistema vedado contendo carbonato, carbamato e bicarbonato de amônio em equilíbrio com CO_2 e NH_3 . Estas curvas de equilíbrio foram determinadas como função da concentração salina ($1,00$ a $7,00 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), da temperatura ($5,0$ a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$), e razão nitrogênio por carbono ($R_{N/C}$) ($2,0$ e $2,5$) das soluções. O aumento do conteúdo de nitrogênio aumentou a solubilidade das proteínas que, de uma forma geral, apresentaram um comportamento de solubilidade retrógrada em relação à temperatura. Espectros de dicroísmo circular sugeriram uma pequena desnaturação causada pela precipitação.

ABSTRACT

Protein precipitation induced by salt addition (e.g., ammonium sulfate and sodium chloride) is a commonly used technique in the downstream processing of proteins. However, salt removal from the precipitate and disposal of the salt containing liquid phase are key steps of the process due to cost and environmental concerns. Volatile salts are alternatives to conventional salts in this process since they can allow easy processing and reduce the cost of waste disposal: the volatile salt can be removed by pressure reduction and temperature increase. In this work we reported the solubility curves for lysozyme and swine and bovine insulins in aqueous solutions of the volatile salts of the system comprised of ammonium carbonate, carbamate, and bicarbonate in equilibrium with CO₂ and NH₃. These equilibrium curves were determined as function of the salt concentration (1.0-7.0 mol/kg), temperature (5.0-25.0 °C), and N/C ratio (2.0 and 2.5) of the solutions. The increase of the N content of the solutions increased the proteins solubility that in general had a retrograde solubility. Circular dichroism spectra suggested some denaturation caused by the precipitation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Valores da razão $R_{N/C}$ para soluções de diferentes eletrólitos voláteis $\text{CO}_2 - \text{NH}_3$	16
Tabela 4.1. Parâmetros das curvas padrão de lisozima em soluções com diferentes concentrações de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$	34
Tabela 4.2. Parâmetros β' e K'_s , respectivos erros destes parâmetros com intervalo de confiança de 95% e correlação linear (R^2) da equação de Cohn para a lisozima em solução de carbamato de amônio ($R_{N/C} = 2,0$) a diferentes temperaturas.....	42
Tabela 4.3. Parâmetros β' e K'_s , respectivos erros destes parâmetros com intervalo de 95% de confiança e correlação linear (R^2) da equação de Cohn para a lisozima em solução de sal volátil com $R_{N/C} = 2, 5$ a diferentes temperaturas.....	48
Tabela 4.4. Parâmetros β' e K'_s , respectivos erros destes parâmetros com intervalo de 95% de confiança e coeficiente de correlação linear (R^2) da equação de Cohn para a insulina bovina em solução de carbamato de amônio e sal volátil com $R_{N/C}$ igual a 2,5.....	56
Tabela 4.5. Parâmetros β' e K'_s , erros destes parâmetros com intervalo de confiança de 95% e coeficiente de correlação linear (R^2) da equação de Cohn para a insulina suína em sal volátil com $R_{N/C}$ igual a 2,0 e 2,5.....	62
Tabela 4.6. Parâmetros do espectro de CD para amostras de insulina precipitadas com $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ $4 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ com diferentes tempos de envelhecimento.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Curvas padrão de absorção a 280 nm para a lisozima a pH 9,8 com diferentes molalidades de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$	33
Figura 4.2. Influência da concentração de carbamato de amônio no coeficiente de absorção a 280 nm para soluções de lisozima em pH 9,8.....	35
Figura 4.3. Correlação linear entre a concentração molal de carbamato de amônio e o coeficiente de absorção a 280 nm da lisozima em pH 9,8.....	35
Figura 4.4. Curvas padrão de insulina suína e bovina em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8.....	36
Figura 4.5. Cinética de precipitação de lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ (solução com $R_{N/C} = 2,0$ e pH 9,8) com concentrações de sal de 7,00 e 8,50 $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	38
Figura 4.6. Cinética de precipitação de lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ (solução com $R_{N/C} = 2,00$ e pH 9,8) com concentrações de sal de 4,0 $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ e 4,5 $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$	38
Figura 4.7. Cinética de precipitação de lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ (solução com $R_{N/C} = 2,0$ e pH 9,8) com concentrações de sal de 4,00 $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ e 5,00 $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$..	39
Figura 4.8. Solubilidade de lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ ($R_{N/C} = 2,0$) a: 5,0 °C, 15,0 °C, 17,5 °C, 20,0 °C, e 25,0 °C.....	41
Figura 4.9. Solubilidade de lisozima a diferentes temperaturas em solução de carbamato de amônio $R_{N/C}$ igual a 2,0 expressa segundo o gráfico de Cohn. Solubilidades a: 5,0 °C; 15,0 °C; 17,5 °C; 20,0 °C e 25,0 °C.....	42
Figura 4.10. Variação do parâmetro razão entre as quantidades totais de nitrogênio e carbono ($R_{N/C}$) do sal volátil na precipitação de lisozima a diferentes temperaturas.....	47

Figura 4.11. Solubilidade de lisozima a diferentes temperaturas em solução de sal volátil R_{NC} igual a 2,5 expressa segundo o gráfico de Cohn. solubilidade a 5 °C; solubilidade a 15 °C; solubilidade a 20 °C; solubilidade a 25 °C.....	48
Figura 4.12. Cristais de lisozima obtidos em solução de sal volátil com R_{NC} igual a 2,5, a 25 °C, concentração inicial de proteína em solução de 15 mg·ml ⁻¹ , concentração molal de sal volátil de 4 mol·kg ⁻¹	50
Figura 4.13. Balanço de massa de ensaio de precipitação de lisozima.....	52
Figura 4.14. Solubilidade de insulina bovina em soluções de sal volátil em diferentes tempos de envelhecimento.....	55
Figura 4.15. Solubilidade de insulina bovina em soluções de sal volátil com R_{NC} igual a 2,0 e 2,5 expressa segundo o gráfico de Cohn.....	56
Figura 4.16. Balanço de massa da insulina bovina precipitada com sais voláteis. Concentrações de 1,00 e 2,00 mol·kg ⁻¹ , tempo de envelhecimento de 13,5 horas e concentração inicial de proteína em solução de 5,00 mg·ml ⁻¹	59
Figura 4.17. Curvas de solubilidade de insulina suína em sal volátil a diferentes valores de R_{NC} , temperatura e tempo de envelhecimento.....	61
Figura 4.18. Curvas de solubilidade de insulina suína em sais voláteis expressadas segundo a equação de Cohn.....	62
Figura 4.19. Balanço de massa da precipitação de insulina suína com sais voláteis.....	66
Figura 4.20. Espectros de CD no ultravioleta distante de amostras de insulina precipitadas com NH ₄ NH ₂ CO ₂	68
Figura A. Espectros de dicroísmo circular de luz síncronon para proteínas com diferentes estruturas secundárias.	86

NOMENCLATURA

RPB – Recuperação e purificação de bioprodutos;

R – Número de resíduos de aminoácidos;

$R_{N/C}$ – Razão entre as molalidades totais de nitrogênio e carbono total;

m – Molalidade de sal em solução ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$);

m(i) – Molalidade da espécie i em solução ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$);

t – Tempo (h);

C – Concentração da proteína ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$);

A – Absorbância: medida da intensidade de luz absorvida pela solução;

l – Caminho ótico: distância percorrida pela luz em uma solução (cm);

a – Coeficiente de absorção específico na faixa linear ($\text{cm}^2\cdot\text{mg}^{-1}$);

$a_{\text{mg/ml}}^{280}$ – Coeficiente de absorção para o comprimento de onda de 280 nm ($\text{cm}^2\cdot\text{mg}^{-1}$);

ϵ - Coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$);

$\epsilon_{25^\circ\text{C}}^{280\text{ nm}}$ – Coeficiente de extinção molar para o comprimento de onda de 280 nm ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$);

S – Solubilidade da proteína em solução ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$);

S_0 – Solubilidade da proteína em água pura aos mesmos valores de temperatura e pressão ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$);

K_s – Constante de “salting-out” para curva logarítmica neperiana;

K_s' – Constante análoga a K_s , adaptada à curva logarítmica com base decimal;

Λ - Termo relacionado ao “salting-in” intrínseco em K_s , oriundo do modelo de Kirkwood para a solubilização de um dipolo neutro;

M - Momento dipolo da proteína;

T – Temperatura em Kelvin;

R – Constante universal dos gases ideais ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$);

D – Constante de proporcionalidade para determinação de Λ ; dependente da proteína;

β - Constante relacionada ao logaritmo neperiano da solubilidade da proteína, normalizada por sua solubilidade em água pura. É associada ao modelo de Debye-Hückel para a solubilização de espécimes iônicas em soluções salinas concentradas;

β' – Constante análoga a β , porém não normalizada e adaptada para logaritmo de base decimal;

Ω – Termo relacionado ao “salting-out” intrínseco em K_s ; dependente da área hidrofóbica superficial da proteína (Φ) e inversamente proporcional à temperatura (T);

Φ – Área hidrofóbica superficial da proteína;

σ – Incremento na tensão superficial da solução com o aumento da molalidade do sal;

$\gamma_{\text{Superf.}}$ – Tensão superficial da solução;

γ_{PS} – Tensão interfacial proteína solvente;

μ_s – Potencial químico da proteína em solução;

μ_c – Potencial químico da proteína na fase sólida;

$\Delta G_{e.s.}$ - Variação da energia livre de Gibbs na dissolução de um soluto a partir de uma fase gasosa devido à variação das interações eletrostáticas em solução;

$\Delta G_{cav.}$ - Variação da energia livre de Gibbs devido à formação de cavidade para “acomodar” o soluto;

$\Delta G_{lat.}$ - Variação da energia livre de Gibbs na dissolução de uma espécie em solução saturada;

ΔG_{vdw} - Variação da energia livre de Gibbs na dissolução de um soluto a partir de uma fase gasosa devido à variação das interações de van der Waals em solução;

GRAVY – “Grand average of hydropathicity” (índice médio de Hidropatia);

CD – “Circular dichroism” – dicroísmo circular;

θ - Elipcidade dicróica (mdeg);

$[\theta]$ – Elipcidade molar (mdeg·cm⁻¹·M⁻¹);

π - Orbital molecular pi - ligante;

π^* - Orbital molecular pi – antiligante;

n – Orbital molecular não ligante;

$n \rightarrow \pi^*$ - Transição eletrônica do orbital n para π^* ;

$\pi \rightarrow \pi^*_{\parallel}$ – Transição eletrônica paralela do orbital π para π^* ;

$\pi \rightarrow \pi^*_{\perp}$ - Transição eletrônica antiparalela do orbital π para π^* .

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A utilização de proteínas na indústria abrange um amplo leque de aplicações, de insumos industriais a especialidades farmacêuticas de alto valor agregado. Contudo, estas moléculas não são obtidas puras, independente da sua forma de produção, mas sim em uma mistura e uma extensa seqüência de etapas de separação é necessária para que se obtenha o produto desejado no nível de pureza requerido. Estas operações seqüenciais, conhecidas como Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB) ou “Downstream Processing”, constituem uma das etapas mais difíceis e caras em um bioprocessamento. No caso específico de fármacos, o custo da RPB no processo produtivo pode atingir até 80% do custo de produção (Narayanan *et al.*, 1994).

Dentre as etapas comumente utilizadas em RPB, a precipitação de proteínas com o uso de sais é freqüentemente encontrada, devido a sua alta capacidade de concentrar a molécula de interesse e pelo seu baixo custo, estando presente em mais da metade dos processos de purificação, segundo Bonnerjea *et al.* (1986). Neste contexto, a precipitação se insere como uma etapa intermediária entre a separação inicial e uma pré-purificação, ocorrendo, geralmente, entre uma primeira etapa de separação sólido-líquido, realizada por centrifugação ou filtração, e a purificação final utilizando-se adsorção ou cromatografia (Ladish, 2001).

Apesar das vantagens inerentes à técnica, a necessidade de um tratamento da fase precipitada, para a retirada do sal e obtenção do produto desejado em maiores graus de pureza (sobretudo no caso de aplicações farmacêuticas), e tratamento da fase sobrenadante, para a recuperação do sal para sua reutilização e/ou descarte da fase líquida (de forma a evitar a contaminação ambiental), limita

em parte as aplicações do processo de precipitação por “salting-out” devido ao custo destes tratamentos.

O uso de eletrólitos voláteis (também referidos neste trabalho como sais voláteis) se apresenta como uma alternativa a este tipo de processo, aumentando a sua viabilidade e diminuindo o custo de produção. Os eletrólitos voláteis compreendem sais, bases e ácidos como o ácido sulfídrico (H_2S), ácido clorídrico (HCl), ácido cianídrico (HCN), além de uma série de compostos cujas soluções podem ser obtidas a partir da dissolução em água de dióxido de carbono (CO_2) e/ou amônia (NH_3) em diferentes proporções, como o ácido carbônico (H_2CO_3), o hidróxido de amônio (NH_4OH), o bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), o carbonato de amônio ($(NH_4)_2CO_3$) e o carbamato de amônio (NH_4NH_2COO). Com o aumento da temperatura ou abaixamento da pressão do sistema, altera-se o equilíbrio entre as espécies para a formação de gases que passam para a fase vapor, podendo estes gases, a princípio, serem recuperados (por adsorção, ou outro processo similar) e os eletrólitos reutilizados. Neste trabalho o sistema de espécies em equilíbrio – dióxido de carbono, amônia, carbamato de amônio, carbonato de amônio e bicarbonato de amônio – são referidos como eletrólitos voláteis $CO_2 - NH_3$.

Não se encontrou na literatura consultada um único relato de precipitação de proteínas por “salting-out” com eletrólitos voláteis, exceto o trabalho pioneiro de nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos em parceria com o Prof. Dr. Pedro Alcântara Pessoa Filho do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo - SP (Watanabe, 2004). Neste trabalho, uma única proteína (tripsina bovina) foi precipitada a 4 °C. Para que a precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis seja realmente uma alternativa viável em processos de purificação, é necessário avaliá-la em detalhe através de estudos sistemáticos com diferentes proteínas e diferentes condições de precipitação, realizando-se também ensaios que permitam inferir sobre a influência da técnica na qualidade do produto recuperado, e é essa necessidade que justifica o presente trabalho.

1.1. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é a investigação sistemática da precipitação de proteínas por “salting-out” com o uso de eletrólitos voláteis $\text{CO}_2 - \text{NH}_3$, com enfoque em purificação de proteínas. A abordagem do estudo foi a determinação da cinética de precipitação e das curvas de solubilidade para as diferentes proteínas, analisando-se o efeito da temperatura e da proporção de NH_3 total no sistema (razão $R_{N/C}$). Estudou-se também a recuperação do precipitado e foi realizado um experimento que permitiu inferir sobre possíveis alterações estruturais no produto recuperado (alterações estas que podem vir a ser relevantes na recuperação da atividade biológica). As proteínas estudadas foram a lisozima, insulina bovina e insulina suína. Embora estas três proteínas tenham sido inicialmente escolhidas por se encontrarem em boa disponibilidade e pureza em nosso laboratório, elas também proporcionam em conjunto com a tripsina bovina, cujos estudos já foram realizados por Watanabe (2004), uma variedade de propriedades físico-químicas (massa molecular, pI , distribuição de grupos carregados e hidrofóbicos) (dados disponíveis na literatura) suficientemente grande para que se possa inferir sobre a eficiência dos eletrólitos voláteis CO_2 - NH_3 como agentes indutores de “salting-out” em proteínas.

1.2. ETAPAS EXECUTADAS

Ensaio preliminares foram realizados para se verificar o efeito do sal na determinação da concentração de proteínas por absorvância a 280 nm. Também foram realizados ensaios preliminares para a verificação da pureza das proteínas utilizadas em espectrômetro de massa e em HPLC (dados não apresentados).

Posteriormente, foram determinados: a cinética de precipitação das três proteínas com o sal volátil, as respectivas curvas de solubilidade, o efeito da temperatura e da razão nitrogênio por carbono ($R_{N/C}$) e os balanços de massa.

Os dados relativos à solubilidade das diferentes proteínas foram modelados conforme a equação de Cohn e os parâmetros K'_s e β' desta equação devidamente comparados.

Finalmente, foi realizado um estudo de modificação estrutural da insulina bovina decorrente da precipitação com o carbamato de amônio ($R_{N/C} = 2,00$), através da técnica de dicroísmo circular.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

A precipitação de proteínas como operação unitária é projetada baseando-se tanto em sua solubilidade, um fator de equilíbrio termodinâmico, quanto em fatores cinéticos que regem a nucleação (tempo de indução) e o crescimento das partículas (cinética de crescimento e sedimentação) (Arakawa e Timasheff, 1985).

As técnicas de precipitação de proteínas em soluções aquosas, com posterior recuperação do precipitado, constituem uma das mais importantes operações unitárias de processos de recuperação e purificação destas moléculas (Hoare, 1982). Proteínas podem ser precipitadas ou cristalizadas a partir de uma variedade de sistemas de solventes, co-solventes, aditivos e modificações do ambiente físico-químico da solução (Blundell e Johnson, 1976). Dentre os métodos utilizados pode-se citar: adição de sais, mudança de pH, adição de solventes ou polímeros orgânicos e desnaturação seletiva. Na adição de sais, a precipitação ocorre pela diminuição da solubilidade ocasionada pela dissolução do sal, chamada de “salting-out”. Em um modelo mais simples, diz-se que os íons salinos competem com a proteína pelas moléculas de água; uma vez parcialmente removida a camada de hidratação, as interações proteína-proteína, com destaque para as interações hidrofóbicas, se tornam relevantes. Um modelo mais refinado do fenômeno de “salting out” leva em consideração o aumento da tensão superficial do líquido, devido à adição de sal, e o conseqüente aumento na energia livre da formação de uma cavidade para a dissolução da molécula de proteína (ver ítem 2.1.1). O sulfato de amônio é o sal mais utilizado em “salting-out” devido a sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções, à posição favorável deste íon na série de Höffmeister, à ausência de efeitos desnaturantes e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução (Deutscher, 1990). O

uso de “salting-out” com sulfato de amônio é, por exemplo, comum na purificação de proteínas do plasma sanguíneo (Nair *et al.*, 1999).

A precipitação de proteínas pode ser feita também por ajuste de pH, a chamada precipitação isoeletrica: adicionam-se ácidos ou bases até que o pH do meio seja igual ao ponto isoeletrico da proteína. Neste pH, a carga líquida da molécula é nula e a repulsão eletrostática entre as moléculas é mínima, prevalecendo as interações hidrofóbicas proteína-proteína. Como exemplo de operação industrial que possui etapas de precipitação isoeletrica pode-se citar o processo de purificação da insulina (McGregor, 1983). A precipitação ocasionada pela adição de eletrólitos, seja por “salting-out”, seja por ajuste de pH, produz um sistema bifásico que contém a proteína precipitada e uma suspensão concentrada em eletrólito. A presença do sal na fração (principalmente na fração precipitada) que contém a proteína alvo é muitas vezes deletéria às etapas de recuperação e purificação de bioprodutos que seguem, sendo necessário removê-lo (por exemplo, por diálise ou diafiltração antes de cromatografia de troca iônica). Após a separação da proteína, esta solução mãe pode ser processada para que os eletrólitos sejam recuperados e reutilizados no processo, enquanto os demais remanescentes da mistura em que se encontrava a proteína são tratados para disposição final.

Na precipitação de proteínas em soluções aquosas por adição de solventes orgânicos, a atividade química da água é reduzida conforme se aumenta a concentração do cosolvente apolar, devido principalmente ao deslocamento e à imobilização parcial das moléculas de água pela hidratação do solvente orgânico, diminuindo a capacidade de solvatação da proteína pela água. Além disto, neste tipo de sistema a atração entre as cargas opostas das moléculas de proteína é intensificada devido à redução da constante dielétrica do meio. Com o deslocamento da estrutura ordenada de água ao redor das áreas superficiais hidrofóbicas da proteína pelo solvente orgânico, ocorre uma maior interação entre estas macromoléculas que tendem a se agregar e precipitar. Diferente dos processos de precipitação por “salting-out” e da precipitação isoeletrica, a precipitação por adição de solventes orgânicos parece ser mais direcionada pelas interações eletrostáticas entre as moléculas de proteína que pelo chamado efeito

hidrofóbico. Dentre os solventes orgânicos utilizados, os mais citados na literatura são a acetona e o etanol por sua completa miscibilidade na água e por não reagirem com a proteína (Scopes, 1988). Como exemplos de aplicação, tem-se o uso de acetona na purificação de proteínas do sangue (Moure *et al.*, 2003) e a sua utilização industrial para a produção de bromelina de pedúnculo de abacaxi (citado em Watanabe, 2004).

Na desnaturação seletiva impõem-se condições de temperatura ou pH em que a proteína desejada não é totalmente desnaturada (perde-se no máximo 10 a 20% de sua atividade biológica), enquanto que os outros componentes da solução são extensivamente desnaturados e, por conseqüência precipitam. A desnaturação por aquecimento é utilizada na purificação de enzimas que são relativamente estáveis com o calor como a xantina oxidase (Maia *et al.*, 2002). Como exemplo de aplicação da desnaturação seletiva por pH, tem-se a purificação (com finalidade de caracterização) de polipeptídeos que se ligam ao sítio central do vírus Moloney murino, indutor de leucemia (Wang e Speck, 1992).

A precipitação por adição de solventes orgânicos, que têm forte interação com as regiões hidrofóbicas, bem como por meios desnaturantes, é evitada devido a possível perda parcial ou total na atividade biológica do produto. Assim, o uso de solventes e aditivos orgânicos é limitado a concentrações relativamente baixas e a desnaturação seletiva, como já mencionado, é restrita para proteínas que possuam uma estabilidade estrutural relativamente alta e para condições onde a perda de estrutura (com conseqüente perda de atividade) seja mínima (Arakawa e Timasheff, 1985).

A utilização de polímeros de alta massa molecular e solúveis em água, para a precipitação fracionada de proteínas foi introduzida por Polson *et al.* (1964). O mecanismo de precipitação de proteínas utilizando-se polímeros é similar à precipitação com uso de solventes orgânicos. O polímero mais utilizado é o polietilenoglicol devido à variedade de graus de polimerização, sendo freqüentemente utilizados os de massa molecular de 6.000 e 20.000 Da, embora o de massa molecular de 4.000 Da seja considerado o mais efetivo para a precipitação de proteínas. O polietilenoglicol juntamente com outro composto

orgânico – hexileno glicol (2-metil-2,4-pentanediol, MPD) – têm sido identificados como agentes fortemente precipitantes de proteína (King *et al.*, 1956; Juckes, 1971) sem, no entanto, serem desnaturantes nas condições usadas para cristalização (Pittz e Timasheff, 1978; Atha e Ingham, 1981), embora eles possam desestabilizar a estrutura nativa de proteínas em condições extremas (Arakawa e Timasheff, 1985). Como exemplos de aplicação, a adição de polímeros é utilizada na purificação de proteínas do plasma sanguíneo humano (Ryzewski, 1993) e na purificação de enzimas de tecido animal (Ozturk-Urek e Tarhan, 2001).

2.1.1. Modelagem da precipitação de proteínas por “salting-out”

O “salting out” de proteínas pode ser relacionado ao balanço de dois efeitos antagônicos (Melander e Horváth, 1977): um devido às forças de interação eletrostáticas, que têm o efeito de *umentar* a solubilidade da proteína (o chamado efeito “salting in”), e o outro devido às interações hidrofóbicas que têm o efeito de *diminuir* a solubilidade da proteína ocasionando o efeito “salting out” propriamente dito. Estes dois efeitos antagônicos são representados na equação 2.1:

$$\ln(S/S_0) = \beta + \Lambda m - \Omega \sigma m \quad (2.1)$$

Nesta equação, S é a solubilidade da proteína no sistema em $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; S_0 é a solubilidade da proteína em água pura aos mesmos valores de temperatura e pressão; m é a concentração molal de sal em $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (é utilizada, preferencialmente, uma escala molal, ao invés de outras escalas de concentração, uma vez que a molalidade é independente da temperatura). Os termos Λ , β , Ω e σ , são explicados mais detalhadamente no texto que se segue.

O efeito de “salting-in” é descrito pelos termos β e Λ da equação 2.1, que estão relacionados com a variação de energia livre de Gibbs na dissolução de um soluto a partir de uma fase gasosa devido às interações eletrostáticas entre o soluto e o solvente ($\Delta G_{e.s.}$). O termo Λ é um coeficiente de “salting in”, oriundo do

modelo de Kirkwood (Melander e Horváth, 1977) para a variação de energia livre na dissolução de um dipolo neutro. O valor de Λ é dado pela fórmula:

$$\Lambda = DM/RT \quad (2.2)$$

onde M é o momento dipolo da proteína, R é a constante universal dos gases ideais ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T é a temperatura em Kelvin e D é uma constante.

A constante β da equação 2.1 está associada com o modelo de Debye – Hückel (Melander e Horváth, 1977) para a variação de energia livre na dissolução de um íon. Em baixas forças iônicas, é assumido que a proteína, devido à sua carga líquida, se comporte como um íon simples e a teoria de Debye-Hückel pode ser aplicada, sendo a solubilidade protéica proporcional à carga líquida da macromolécula e à força iônica do meio. Contudo, conforme a concentração salina aumenta, a distância média entre as espécies carregadas se torna cada vez menor, ocorrendo uma “nuvem” iônica que circunda a molécula protéica carregada e uma conseqüente “blindagem” de sua carga superficial, fazendo com que esta macromolécula se comporte como um dipolo neutro. Desta forma, em concentrações salinas suficientemente altas, o termo de Debye-Hückel tende a uma constante (aqui chamada de β) e o modelo de Kirkwood passa a ser o mais aplicável para o “salting-in”, com uma dependência linear da solubilidade protéica em relação à força iônica (Λm). Uma vez que a constante β está associada à carga líquida da proteína, ela é fortemente dependente do pH (sendo, a princípio, próxima a zero no ponto isoelétrico), devendo também ser influenciada pela temperatura, visto que este parâmetro também afeta a distribuição de cargas na superfície protéica (Melander e Horváth, 1977). Também, implícitos nesta constante, se encontram termos dependentes de características físico-químicas intrínsecas à proteína, como o número de resíduos ácidos e básicos (que regem a carga líquida em baixas forças iônicas e o ponto isoelétrico).

O “salting-out” propriamente dito é regido pelo coeficiente $-\Omega\sigma$ da equação 2.1, que está relacionado à variação de energia livre de Gibbs na formação de uma cavidade no solvente para “acomodar” a molécula de soluto (ΔG_{cav}). O termo

σ é o incremento na tensão superficial da solução com o aumento da molalidade do sal. O termo Ω é diretamente proporcional à área superficial hidrofóbica da proteína (ϕ) (que é, a princípio, a área da superfície protéica dessolvatada quando esta molécula passa da fase solúvel para a fase sólida) e do volume molar do solvente (este último, elevado a 2/3) e, para um mesmo valor de ϕ , é inversamente proporcional à temperatura (deve-se frisar, contudo, que a temperatura via de regra também afeta a distribuição de resíduos hidrofóbicos na superfície da proteína, afetando, portanto, o valor de ϕ) (Melander e Horváth, 1977).

A natureza dos parâmetros Λ , β e $\Omega\sigma$ é utilizada na descrição do comportamento de solubilidade de proteínas conforme se varia a força iônica: em faixas de baixa concentração salina, o efeito das forças eletrostáticas se sobrepõe ao das interações hidrofóbicas e o logaritmo da solubilidade aumenta com a força iônica. Para concentrações salinas maiores, contudo, os efeitos de “salting in” se tornam desprezíveis em face ao “salting out” e o logaritmo da solubilidade da proteína começa a decrescer linearmente com a concentração de sal. Assim, para concentrações salinas significativas, a precipitação de proteínas por “salting-out” é usualmente descrita por meio de um rearranjo simplificado da equação 2.1 de forma a se obter a constante de “salting-out” (K_s) formulada por Cohn (1925):

$$\ln(S/S_0) = \beta - K_s m \quad (2.3)$$

sendo que:

$$K_s = \frac{-d \ln S}{dm} \quad (2.4)$$

Esta constante constitui a base teórica para a série de Höfmeister e do chamado efeito liotrópico (Melander e Horváth, 1977; Bull e Breese, 1980). Das equações 2.1 e 2.4, obtem-se que a constante de “salting-out” é dada por:

$$K_s = \Omega\sigma - \Lambda \quad (2.5)$$

e, portanto, a constante K_s é composta de um coeficiente de “salting-out” intrínseco ($\Omega\sigma$) e de um coeficiente de “salting-in” ($-\Lambda$), que estão correlacionados às interações hidrofóbicas e eletrostáticas, respectivamente. Assim, é esperado que sais que confirmam um alto valor de σ apresentem maiores eficiências no “salting-out” de proteínas, com um maior valor da constante K_s . De forma análoga, espera-se que proteínas com maiores áreas superficiais hidrofóbicas ϕ (e, conseqüentemente, maiores valores de Ω) e/ou menores momentos dipolos M (menores valores de Λ) sejam mais facilmente precipitáveis por “salting-out”, apresentando, igualmente, maiores valores de K_s para concentrações significativas de um determinado sal.

Já Bull e Breese (1980) encontraram, experimentalmente, melhores correlações lineares entre a constante K_s e a tensão interfacial proteína - solvente (γ_{PS}), que entre a tensão superficial da solução ($\gamma_{\text{superf.}}$). O valor de γ_{PS} , em teoria, é uma medida da maior organização das moléculas de solvente que circundam e solvatam a superfície da proteína em comparação às moléculas no seio da solução. Embora γ_{PS} também varie com a concentração salina e com a tensão superficial da solução e contribua para as interações hidrofóbicas proteína - proteína, uma redefinição de K_s a partir da variação deste parâmetro poderia exigir um formalismo matemático mais elaborado que o desenvolvido por Melander e Horváth (1977).

A equação 2.3 é capaz de descrever, de maneira geral, a solubilidade de proteínas em soluções salinas, e é especialmente adequada para soluções de alta concentração salina; entretanto, seus parâmetros são difíceis de serem relacionados a outras variáveis do sistema, e seus coeficientes têm de ser obtidos e analisados empiricamente.

A equação 2.3 também pode ser expressa de modo mais conveniente em uma escala logarítmica com base decimal:

$$\log S = \beta' - K'_s m \quad (2.6)$$

em que K'_s é uma constante específica do sal e da proteína, análoga a K_s , e β' é uma constante que depende da temperatura, do pH e da proteína utilizada (β' é o logaritmo da solubilidade da proteína em baixas concentrações salinas, mas aos mesmos valores de pH e temperatura). Em β' , na equação 2.6, estão intrínsecos tanto o parâmetro β das equações 2.1 e 2.3 quanto o logaritmo da solubilidade em água ($\log S_0$). Assim, além dos fatores limitantes de β , estão intrínsecos em β' dois parâmetros relacionados à solubilidade da proteína e que não são afetados nem pela força iônica e nem pelo pH do meio, mas que são dependentes da proteína e do solvente: a variação de energia livre de Gibbs devido à dissolução de uma espécie em uma solução saturada (ΔG_{lat}) e a variação de energia livre de Gibbs devido às interações de van der Waals entre o soluto e o solvente (ΔG_{vdw}).

No trabalho de Howard *et al.* (1988) os parâmetros que regem a solubilidade de proteínas em soluções salinas (representados por K'_s e β') são correlacionados à diferença entre os valores de potencial químico da proteína em solução (μ_s) e na fase sólida (μ_c). Desta forma, os autores justificam a maior solubilidade de sólidos protéicos amorfos em comparação a proteínas no estado cristalino, visto os valores de potencial químico para as formas cristalinas serem, via de regra, menores que os valores para materiais amorfos. Também é explicado por este modelo o fenômeno de algumas proteínas que apresentam diferentes hábitos cristalinos quando submetidas a diferentes condições de supersaturação (no trabalho de Howard *et al.*, 1988, são citadas como exemplo a lisozima e a aldolase de músculo esquelético de coelho) apresentarem comportamentos de solubilidade diferentes quando cristalizadas em suas diferentes formas: uma mudança de hábito cristalino implica em uma variação no valor de μ_c . No mesmo trabalho, a força iônica é apontada como o parâmetro dominante na determinação da solubilidade da lisozima em meio aquoso, seguida pela temperatura e, por último, o pH.

As correlações e os parâmetros das equações acima mencionados são generalizações. Devido à complexidade estrutural das proteínas, não é esperado que estes modelos sejam completamente adequados à descrição do

comportamento de solubilidade para todo e qualquer sistema proteína – solvente – sal (Melander e Horváth, 1977).

2.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM USO DE ELETRÓLITOS VOLÁTEIS

As dificuldades relacionadas à necessidade de um tratamento posterior à precipitação para remoção e recuperação do sal das fases precipitado e sobrenadante são um atenuante quanto à atratividade dos processos de precipitação com o uso de sais convencionais. Diante disso, o uso de sais voláteis, que podem migrar à fase vapor com aumento de temperatura ou abaixamento da pressão da solução, pode aumentar a viabilidade do processo de precipitação na purificação de proteínas pela diminuição do custo de operação.

Em soluções aquosas os eletrólitos voláteis coexistem nas formas iônica e molecular (não dissociada), mas na fase vapor somente a forma molecular é encontrada (Prausnitz *et al.*, 1999). Por elevação de temperatura ou abaixamento de pressão, a solubilidade da forma molecular em água reduz-se drasticamente, diminuindo também a concentração das formas iônicas. Assim, o eletrólito converte-se à forma molecular gasosa e tem o potencial de ser diretamente reutilizado, sem necessidade de purificação adicional.

A eficiência dos sais voláteis em um processo de precipitação por “salting-out” foi primariamente sugerida pela formação de sistemas aquosos bifásicos em substituição ao fosfato de potássio relatado por van Berlo *et al.* (2000): Tanto o mecanismo de formação de sistemas aquosos bifásicos quanto o de indução de “salting – out” por um dado sal são baseados no chamado efeito liotrópico (ver tópico 2.1.1).

A precipitação isoeletrica com ácidos ou bases voláteis é apenas recente, e estudos sistemáticos foram conduzidos somente sobre o uso de um ácido volátil, o dióxido de carbono, na precipitação isoeletrica de caseína (Tomasula *et al.*, 1997) e de proteínas de soja (Hofland *et al.*, 2000). Ao nosso conhecimento, um único estudo foi realizado sobre o uso de eletrólitos voláteis para indução do “salting out” de proteínas em solução (Watanabe *et al.*, 2004). Neste estudo, foram utilizados os eletrólitos voláteis CO₂ – NH₃ com R_{N/C} igual a 2,0 (carbamato de amônio) e 2,5

para a precipitação de tripsina bovina, a temperatura de 4 °C. Estudos sistemáticos com diferentes proteínas a diferentes temperaturas ainda não foram realizados. Nos estudos de Watanabe *et al.* (2004) a remoção do sal volátil foi realizada com abaixamento de pressão e a retirada total do sal foi observada, bem como a completa ressolubilização da proteína, o que demonstrou que o método é factível e, portanto, é possível a utilização do carbamato de amônio na precipitação de proteínas. Apesar de no trabalho de Watanabe *et al.* (2004) terem sido observadas alterações significativas na atividade enzimática da tripsina decorrentes da precipitação com o sal (cerca de 30%), ainda não foram realizados estudos refinados visando constatar possíveis alterações estruturais em proteínas precipitadas com o uso de sais voláteis.

2.2.1. Equilíbrio entre as espécies carbamato, amônia, dióxido de carbono

A descrição termodinâmica destes sistemas contendo eletrólitos voláteis tem recebido bastante atenção na literatura, mesmo nos estudos concentrados na determinação experimental de condições de equilíbrio. Os primeiros estudos realizados por Edwards *et al.* (1975) visavam a estabelecer uma modelagem termodinâmica de soluções diluídas contendo eletrólitos voláteis (soluções aquosas de amônia, dióxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, dióxido de enxofre e cianeto de hidrogênio) comumente encontrados na indústria química.

Nos sistemas que envolvem diversas espécies iônicas, o equilíbrio é calculado através de reações de dissociação. Para a amônia, o equilíbrio a ser considerado é:



e na dissolução de dióxido de carbono:



Na dissolução simultânea de amônia e dióxido de carbono, deve-se levar em conta o equilíbrio de formação do íon carbamato:



Investigações experimentais de soluções aquosas de amônia e dióxido de carbono foram realizadas por Göppert e Maurer (1988) comparando-se os dados obtidos com o modelo apresentado por Edwards *et al.* (1978). Esse artigo mostra que a pressão em equilíbrio com uma solução de amônia e dióxido de carbono é mínima para uma razão entre nitrogênio e carbono próxima a 2,0 – razão correspondente ao carbamato de amônio. De maneira geral, os dados permitem inferir que a condução dos experimentos de precipitação pode ser realizada como na precipitação com outros sais (como sulfato de amônio), sendo necessária apenas a preocupação de vedar os recipientes em que ocorrerá a precipitação: embora a quantidade de eletrólitos voláteis eventualmente perdida na forma de CO₂ e NH₃ seja muito pequena, a manutenção contínua de uma condição de não-equilíbrio pode levar a uma perda significativa.

Além do estudo do equilíbrio líquido-vapor de soluções aquosas de amônia e dióxido de carbono, Kurz *et al.* (1995) investigaram a precipitação de bicarbonato de amônio sólido. Essa precipitação corresponde a uma limitação da quantidade de sal que se pode dissolver. Outras determinações experimentais foram obtidas por Rumpf *et al.* (1998). As informações obtidas por estes autores podem ser sintetizadas em função da razão entre as concentrações totais de nitrogênio e carbono no sal. Essa razão foi definida por van Berlo *et al.* (2000):

$$R_{NC} = \frac{m(NH_3^{(l)}) + m(NH_4)^+ + m(NH_2COO^-)}{m(CO_2^{(l)}) + m(HCO_3^-) + m(CO_3^{2-}) + m(NH_2COO^-)} \quad (2.7)$$

em que m(i) é a molalidade da espécie i.

A tabela 2.1 lista, de acordo com as reações de dissociação e a definição da razão $R_{N/C}$ (Equações 2.3-2.7), os valores desta razão para soluções de quatro espécimes de eletrólitos voláteis $\text{CO}_2 - \text{NH}_3$

Tabela 2.1. Valores da razão $R_{N/C}$ para soluções feitas a partir de diferentes eletrólitos voláteis $\text{CO}_2 - \text{NH}_3$

Composto	Fórmula	$R_{N/C}$
Bicarbonato de Amônio	NH_4HCO_2	1,0
Carbonato de Amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	2,0
Carbonato de Amônio Comercial (P.A.)	$\text{NH}_4\text{HCO}_2 + \text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ (30% de NH_3)	1,4
Carbamato de Amônio	$\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$	2,0

O carbonato de amônio analítico comercial (P.A.) não corresponde ao sal da fórmula $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, mas a uma mistura de bicarbonato e carbamato de amônio cuja fração de amônia é de aproximadamente 30% em massa (Daí o valor da razão $R_{N/C}$ de uma solução feita a partir deste sal ser menor que 2,0, ao contrário do que poderia ser erroneamente concluído através da análise de sua fórmula molecular). A obtenção de cristais dos sais com fórmula molecular $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (carbonato de amônio) ou $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ (carbamato de amônio) em graus de pureza significativos são procedimentos difíceis, o que torna o seu custo oneroso. Contudo, o estado de equilíbrio de uma solução depende da quantidade de solutos adicionados e da razão $R_{N/C}$, mas não do estado em que o soluto é adicionado à solução. Assim, uma solução de carbamato de amônio (ou de carbonato de amônio em alto grau de pureza) é idêntica a uma solução preparada a partir de bicarbonato de amônio e hidróxido de amônio, ou de carbonato de amônio analítico comercial (P.A.) e hidróxido de amônio que possua a razão $R_{N/C}$ igual a 2,0 (uma vez alcançado o estado de equilíbrio). Desse modo, neste trabalho, assim como no trabalho de Watanabe *et al.* (2004), soluções de $R_{N/C}$ igual a 2,0 serão tratadas como soluções de carbamato de amônio, apesar do

complexo equilíbrio químico que se estabelece. Também em alguns casos, elas serão referenciadas pela fórmula molecular do sal: $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$.

Neste trabalho, o sal volátil será referenciado pela razão entre o nitrogênio e carbono ($R_{N/C}$) conforme definida pela Equação 2.5. Como exemplo da importância desse parâmetro, van Berlo *et al.* (2000) sugerem que somente sais voláteis com $R_{N/C}$ maior ou igual a 2,0 são efetivos para a separação de duas fases aquosas. Além disto, em nosso grupo de pesquisas, alguns experimentos preliminares com albumina bovina (BSA), quimotripsina e insulina suína em bicarbonato de amônio ($R_{N/C}$ igual a 1,0) e carbonato de amônio comercial ($R_{N/C}$ igual a 1,4) evidenciaram que estes dois sais não apresentaram efeito de “salting out” para estas proteínas, sendo a solubilidade das mesmas em soluções significativamente concentradas destes sais muito próximas à sua solubilidade em água (incluindo um ensaio com BSA em solução de carbonato de amônio próximo à saturação deste sal) (dados não publicados de Watanabe, *et al.*, 2004). Por último, no trabalho de Watanabe *et al.* (2004) verificou-se que soluções com $R_{N/C}$ igual a 2,5 apresentaram um menor efeito de precipitação de proteínas por “salting out” que soluções análogas com $R_{N/C}$ igual a 2,0. Esta razão também influencia bastante a solubilidade dos sais em água. De acordo com dados fornecidos pela BASF (1998, 1999, 2000), a solubilidade a 25°C do carbamato de amônio é de 790 g/L e do bicarbonato de amônio é de 220 g/L.

2.3. CARBAMATO DE AMÔNIO – BREVE HISTÓRICO E PRINCIPAIS APLICAÇÕES

A primeira obtenção do sal carbamato de amônio se deu no início do século XIV em mistura com bicarbonato de amônio e carbonato de amônio a partir da destilação de chifres, casco e couro de animais. Esta mistura era utilizada como fermento para massas devido à sua decomposição em produtos gasosos e pela facilidade de manuseio (Gerhartz, 1985). Hoje, com o desenvolvimento industrial da síntese da amônia, o carbamato de amônio tem sido preparado a partir de reagentes gasosos (amônia e dióxido de carbono) (Brooks, 1946).

Dentre as utilizações industriais deste sal, as mais citadas são: produção de inseticidas, agente neutralizador e produção de carbonato de amônio (na maioria dos processos, estes dois sais são obtidos em misturas com outras espécies, sendo a obtenção destes dois compostos em suas formas puras procedimento difícil e oneroso (ver ítem 2.2.1)) (Gerhartz, 1985).

Em pesquisa, o carbamato de amônio tem sido utilizado em estudos para aumentar a estabilidade operacional da lipase em síntese enantioseletiva (Du *et al.*, 2003), na síntese de glicosaminas a partir da reação de hexoses, pentoses ou dissacarídeos (Likhosherstov *et al.*, 2002), em sistemas aquosos bifásicos na partição de aminoácidos (van Berlo *et al.*, 2002) e na produção de uréia (Claudel *et al.*, 1986).

2.4. CARACTERÍSTICAS DA LISOZIMA E DA INSULINA PERTINENTES A ESTUDOS DE SOLUBILIDADE

2.4.1. Lisozima

A lisozima é uma enzima de massa molecular igual a 14.400 Da e ponto isoelétrico 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 certos microrganismos. 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).

A lisozima tem os grupos carregados distribuídos de forma relativamente uniforme sobre a superfície da molécula. Por isso, o potencial dos grupos hidrofóbicos para a formação de oligômeros é substancialmente reduzido. A baixa hidrofobicidade da lisozima é refletida em seu índice médio de hidropatia (“Grand Average of Hydropathicity” - GRAVY) fortemente negativo (-0,415), típico de uma proteína hidrofílica (índice estimado através do programa “ProtParam Tool”, a partir da seqüência primária da proteína).

Estudos de crescimento cristalino de resolução molecular sugerem que a unidade de crescimento do cristal é uma molécula (revelam degraus de crescimento cristalino de altura monomolecular) (Rosenberger *et al.*, 1996).

2.4.2. Insulina

A insulina é um hormônio pancreático envolvido na regulação da concentração de glicose sanguínea, assim como tem importância no metabolismo de proteínas e lipídeos. Esta proteína 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 (com massa molecular de 5.777,6 Da) difere da insulina humana (massa molecular de 5.807,7 Da) em apenas um aminoácido na cadeia B (Martindale, 1993). Já a insulina bovina (massa molecular 5.747,0 Da) difere da insulina humana em três aminoácidos – dois na cadeia A e um na cadeia B – e difere da insulina suína em dois aminoácidos na cadeia A (Murray *et al.*, 1993). Ambas as insulinas apresentam o ponto isoelétrico próximo a 5,4.

Em solução aquosa, a insulina pode formar agregados diméricos, mas em concentrações fisiológicas provavelmente estará na forma monomérica. Em concentrações elevadas na presença de Zn^{+2} ou outros cátions divalentes, três dímeros ligam-se formando uma estrutura hexamérica (dois átomos de Zn para cada seis moléculas de insulina). A estrutura hexamérica apresenta forma romboédrica, e tende a precipitar em solução. A insulina sódica se associa na forma de hexâmeros em superfícies hidrofóbicas, porém, em menor proporção que a insulina zíncica. A formação de hexâmeros ocorre porque a forma monomérica da insulina é instável e, portanto, responsável pela inicialização da agregação na presença de interfaces hidrofóbicas (Slusky *et al.*, 1992). Os resíduos hidrofóbicos na região terminal da cadeia B são os principais atuantes na dimerização desta molécula.

Uma população predominante de hexâmeros de moléculas de insulina 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 - a). Com o 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 molecular 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 de insulina é o mesmo encontrado em solução (Schlichtkrull, 1956).

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 μm). Os cristais de insulina suína eram romboédricos, enquanto que os cristais de insulina bovina tinham a forma de estrela. Além disto, a concentração de proteína no sobrenadante dos cristais romboédricos de insulina suína era maior que a concentração no sobrenadante dos cristais em forma de estrela da insulina bovina, indicando, portanto, uma maior solubilidade para a insulina suína que para a insulina bovina nestas condições. Utilizando uma solução supersaturada de insulina bovina de concentração inicial 2,42 mg/ml em tampão acetato 0,1 M, pH 5,5, com 7% de NaCl, Schlichtkrull determinou uma concentração de insulina em solução igual a 0,085 mg/ml (Schlichtkrull, 1957 - a).

Como diversas proteínas globulares, a insulina tende a adotar e manter sua estrutura tridimensional. Alterações na conformação nativa da proteína são

comuns e podem ser causadas por uma série de fatores, os principais deles relacionados à exposição de resíduos hidrofóbicos e interação e adsorção com superfícies hidrofóbicas (Murray *et al.*, 1993).

Ambas as insulinas, bovina e suína, possuem índices médios de hidropatia (GRAVY) positivos relativamente altos, típicos de proteínas hidrofóbicas. Contudo, a insulina bovina possui um índice médio significativamente maior que o da suína (0,310 e 0,267), respectivamente, o que está em concordância com a maior solubilidade encontrada para a insulina suína em relação à bovina por Schlichtkrull em 1956.

Estas informações acerca da hidrofobicidade e do potencial de oligomerização das moléculas de lisozima e de insulina bovina e suína são relevantes no presente trabalho, para uma posterior correlação com os dados de solubilidade para estas moléculas, visto serem as interações hidrofóbicas entre as proteínas o principal fator limitante para o efeito “salting out” (Cohn, 1925, Melander e Horváth, 1977; Bull e Breese, 1980; Curtis *et al.*, 2002). É importante frisar que os valores de índice médio de hidropatia (GRAVY) aqui apresentados para a lisozima e insulinas bovina e suína são estimados levando em consideração apenas a estrutura primária destas proteínas. O “salting-out” está mais relacionado à hidrofobicidade superficial das proteínas (Melander e Horváth, 1977), que é um parâmetro mais difícil de se medir ou estimar. Desta forma, o valor de GRAVY deve ser tomado apenas como um indicativo, mas não como uma medida da hidrofobicidade protéica real, envolvida no fenômeno de precipitação por “salting-out”.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

A lisozima de clara de ovo de galinha utilizada foi obtida da Sigma, EUA (chloride; L-2879) (EC 3.2.1.17) com pureza de aproximadamente 90%, segundo o fabricante. As insulinas zíncicas, bovina e suína, utilizadas foram gentilmente doadas pela Biobrás, Brasil, com pureza maior que 95%, segundo o fabricante. Para a preparação da solução de carbamato de amônio foram utilizados carbonato de amônio e solução de hidróxido de amônio obtidos da LabSynth, Brasil. Para a preparação das soluções de Tris foi utilizado Trisma-HCl da Sigma, EUA. Para preparação da solução de carbamato de amônio e de sal volátil com R_{NC} 2,5 foram utilizados carbonato de amônio e hidróxido de amônio obtidos da LabSynth, Brasil. Para análise microscópica dos cristais de lisozima foi utilizado um corante de cristais macromoleculares Izt (código HR4 – 710) da Hampton Research, EUA. O tampão fosfato com cloridrato de guanidina foi feito utilizando-se fosfato monobásico também da LabSynth, Brasil, e cloridrato de guanidina da Sigma, EUA. Todas as soluções foram feitas com água ultrapura obtida com a utilização do aparelho Milli-Q da Millipore, EUA. Todos os reagentes utilizados possuíam qualidade analítica certificada.

3.1.2. Equipamentos

Durante a precipitação, a temperatura foi mantida constante através de um banho termostático Tecnal TE-2000, Brasil, com precisão de 0,2 °C. Uma centrífuga 5804 R da Eppendorf, Alemanha, com ajuste de temperatura, foi utilizada para separação das fases precipitado e sobrenadante após a precipitação das proteínas estudadas. Para a determinação da concentração das proteínas presentes em cada fase foi utilizado um espectrofotômetro Beckman modelo DU650, EUA. Para análise microscópica do precipitado foi utilizado um microscópio biológico trinocular modeloTIM-108 da Anatomic, Brasil, com aumento de 40X até 1600X e adaptador para câmera de vídeo, bem como uma câmera digital Sony MVC-FD75, Japão. A remoção dos vestígios de sal volátil do precipitado de insulina bovina para o experimento de dicroísmo circular foi feita utilizando-se sistema Speed Vack Eppendorf-Concentrator 5301, Alemanha, do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, Instituto de Biologia, UNICAMP (Campinas, SP). Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) foram obtidos em um aparelho Jasco J-810, Japão, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, SP).

3.2. PROCEDIMENTOS

3.2.1. Determinação da concentração das proteínas

A determinação da concentração de proteína em solução foi feita através de medidas de absorvância a 280 nm. Para tal, os valores dos coeficientes de absorção (a_{280}^{280} mg/ml) para cada proteína foram determinados previamente em solução tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8.

3.2.1.1. Verificação da influência do sal volátil no coeficiente de absorção da lisozima

Para a lisozima foi feito um estudo de influência da concentração molal de sal volátil no coeficiente de absorção obtendo-se uma equação do tipo:

$$a_{mg/ml}^{280} = m(sal) \cdot \alpha + a_0 \quad (3.1)$$

que é válida nas faixas de valores de concentração de sal volátil e concentração de proteína estudadas. Nesta equação, $a_{mg/ml}^{280}$ é o coeficiente de absorção em $mg \cdot ml^{-1}$, para uma dada concentração molal de sal volátil ($m(sal)$) em $mol \cdot kg^{-1}$, α é o acréscimo no valor do coeficiente de absorção por unidade molal de sal volátil e a_0 é o coeficiente de absorção em concentração zero de sal volátil. É pertinente frisar que a solução utilizada como branco nestes estudos foi o tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8, mesmo quando as amostras de proteína se encontravam dissolvidas em soluções contendo sal volátil. Assim, os parâmetros α e a_0 da equação acima não se destinam a evidenciar possíveis modificações estruturais na proteína decorrentes do acréscimo do sal. Destinam-se, sim, a serem fatores de correção para que se possa determinar a concentração de lisozima em soluções contendo diferentes concentrações de sal volátil (por absorbância a 280 nm) sem, contudo, que se faça necessário variar a concentração deste sal na célula de referência.

3.2.1.2. Curvas padrão de insulina bovina e suína

Para as soluções de insulina bovina e suína não foram realizados estudos de influência da concentração de sal volátil na absorção a 280 nm, o que será discutido posteriormente (item 4.3), tendo sido determinados apenas os respectivos coeficientes de absorção em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8.

Embora os ensaios de precipitação posteriores tenham sido realizados em diferentes temperaturas no banho térmico, as medidas da concentração nas fases precipitado e sobrenadante por absorção a 280 nm, bem como as curvas padrão para a determinação dos $a_{mg/ml}^{280}$ para as respectivas proteínas foram realizadas sempre a 25 °C.

3.2.2. Preparo das soluções de sal volátil

O sal carbamato de amônio foi preparado a partir do sal carbonato de amônio em forma sólida e hidróxido de amônio de tal modo que a razão entre nitrogênio e carbono (equação 2.5) fosse igual a 2,0. Fixou-se uma massa de carbonato de amônio de 10 g e calculou-se a quantidade de amônio e dióxido de carbono presente no carbonato. Como o carbonato de amônio utilizado não corresponde ao sal da fórmula $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, mas a uma mistura de bicarbonato e carbamato de amônio cuja fração de amônia é 30% em massa, para se alcançar a razão $R_{\text{N/C}}$ igual a 2,0 hidróxido de amônio teve de ser adicionado. Sabendo-se ainda a quantidade de água contida na solução de hidróxido de amônio e que a solubilidade do carbamato de amônio em água é de 790 g/L (~ 10 mol de sal volátil por quilograma de água) (BASF A. G., 2002), determinou-se a quantidade de água a ser acrescida à solução de modo a produzir uma solução saturada. O recipiente contendo o sal era perfeitamente vedado e o carbamato de amônio era preparado cerca de 10 h antes do uso e mantido a temperatura ambiente. Posteriormente, preparou-se de modo análogo uma solução de sal volátil de razão $R_{\text{N/C}}$ igual a 2,5.

3.2.3. Condições comuns a todos os ensaios de precipitação

Para os ensaios de precipitação, inicialmente foram preparadas soluções estoque das amostras de proteína em Tris-HCl 0,01 M pH 9,8 (para a lisozima a solução estoque era de $75 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ enquanto que, para as insulinas bovina e suína, era de $18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Esta solução foi escolhida por ser o valor de 9,8 aproximadamente o valor de pH da solução saturada de carbamato. A baixa concentração de Tris (0,01 M) proporciona uma fraca força iônica, de forma a que não é esperado que este sal altere significativamente os efeitos decorrentes dos eletrólitos voláteis $\text{CO}_2 - \text{NH}_3$ em solução (após a adição da solução de sal volátil). Adicionava-se, então, a um frasco tipo Eppendorf de capacidade 1,5 ml, uma alíquota da solução estoque de proteína, uma alíquota de solução de sal volátil 10

molal e completava-se o volume para 1,0 ml com o próprio tampão acima mencionado. As alíquotas de proteína eram adicionadas de forma a se obter sempre uma mesma concentração inicial de proteína em solução (que não era a mesma para a lisozima e para as insulinas bovina e suína, como se verá mais adiante). Já as alíquotas de solução de sal volátil variavam, de forma a se obter um conjunto de dados para diferentes concentrações deste sal. A seguir, os frascos eram mantidos em repouso em banho termostático até que se alcançasse o tempo de equilíbrio, após o qual separou-se o sobrenadante e o precipitado por centrifugação a 8000 g. A concentração de proteína na fase sobrenadante, após as devidas diluições, foi determinada por absorvância a 280 nm. A fase precipitado foi dissolvida em 1,0 ml de tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8 sob agitação e, assim como a fase sobrenadante teve a sua concentração de proteína medida por absorção a 280 nm. Esse procedimento foi realizado para a determinação das cinéticas de precipitação e para a determinação das curvas de solubilidade das três proteínas a diferentes temperaturas, tanto em solução com $R_{N/C}$ igual a 2,0 ($\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$) quanto para a solução de sal volátil com $R_{N/C}$ igual a 2,5.

A determinação da curva de solubilidade constituiu-se de um gráfico de concentração de proteína na fase sobrenadante em miligramas por mililitro de solução em função da concentração de sal em mol de sal volátil por quilograma de água. Só foram incluídos nesta curva, pontos em que se observava a presença de precipitado.

3.2.4 Cinética de precipitação da lisozima

Estudos de cinética de precipitação de lisozima foram realizados a 25 °C com sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,0 (razão correspondente ao carbamato de amônio) a fim de se determinar o tempo para que se alcançasse o equilíbrio de fases (tempo que inclui o tempo de indução e crescimento das partículas). A razão desta determinação era se ter uma base para se estipular o período de tempo, a ser utilizado nos ensaios subseqüentes, entre a formação do sistema de precipitação (adição de solução de sal à solução de proteína) e a separação de fases.

Foram realizados ensaios a concentrações relativamente altas de carbamato ($7,00$ e $8,50 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) e a concentrações menores ($4,00$, $4,50$ e $5,00 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), para intervalos de tempo que variaram de 30 min a 88 h . A concentração inicial de proteínas para as amostras de concentrações molal de carbamato iguais a $4,00$; $4,50$; $5,00$ e $7,00 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ era de $15,00 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Já para a concentração molal de carbamato de $8,50 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ a concentração inicial de proteína era de $11,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os dados para as cinéticas em intervalos de tempo menores ($0,5$ a 25 h) foram obtidos em duplicatas, enquanto que para as cinéticas em intervalos de tempo maiores (10 a 88 h) foram obtidos em triplicatas .

3.2.5. Curvas de solubilidade da lisozima

Após a estipulação de um tempo de equilíbrio, foram determinadas as curvas de solubilidade para a lisozima nas temperaturas de $5,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $15,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $17,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $20,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$) em carbamato de amônio (R_{NC} igual a $2,0$) e nas temperaturas de $5,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $15,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $20,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$) em solução de sal volátil com R_{NC} igual a $2,5$. A concentração inicial de lisozima em solução utilizada nestes experimentos era sempre de $15,00 \text{ mg/ml}$ e os ensaios foram realizados em duplicata.

3.2.6. Análise microscópica de cristais de lisozima

Em um dos ensaios de determinação de solubilidade foram obtidos cristais que foram analisados em microscópio biológico trinocular nos aumentos de $40X$ e $100X$. Para averiguar se os cristais observados ao microscópio ótico eram de fato cristais de proteína e não cristais inorgânicos decorrentes dos sais em solução, estes foram corados com corante IZIT, de coloração azul, que cora especificamente cristais macromoleculares, não alterando cristais inorgânicos ou de moléculas menores. Para uma gota de solução (volume de aproximadamente $0,1 \text{ ml}$), foram adicionados $5 \mu\text{l}$ de solução de IZIT, e esta gota foi deixada em repouso por 1 h antes da análise ao microscópio.

3.2.7. Solubilização de insulina bovina e suína

Para o preparo de uma solução estoque com concentração relativamente alta de insulina a pH 9,8, optou-se por uma solubilização por etapas (Costa, 2002). Inicialmente, foram pesados 0,05 g de insulina e esta massa foi solubilizada em 10 ml de solução de HCl 0,01 N a pH 2,0 sob agitação suave com auxílio de agitador magnético. Após a solubilização, uma nova massa de insulina era adicionada e, desta forma, sucessivamente, solubilizou-se 0,20 g de insulina em 10 ml de solução de HCl 0,01 N com um pH final de aproximadamente 2,4 (uma vez que, após a adição da insulina, o pH da solução se eleva). Em seguida, ainda sob agitação branda, o pH desta solução foi cuidadosamente elevado até 9,8 com NaOH 4,0 N, obtendo-se, assim, uma solução de insulina $20,00 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ em NaOH pH 9,8 (aproximadamente 0,1 mM) com NaCl 0,01 M. Esta solução foi, então, diluída com tampão Tris-HCl 0,10 M pH 9,8 na proporção de 9:1 (solução de insulina com pH 9,8:tampão Tris-HCl), obtendo-se uma solução final de insulina 18,00mg/ml em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8 contendo NaCl a aproximadamente 9 mM. Esta solução foi filtrada em seguida, sendo esta a solução final utilizada em todos os experimentos com insulina em solução. Este protocolo foi utilizado tanto para solubilização de insulina bovina quanto suína.

3.2.8. Cinéticas de precipitação e curvas de solubilidade para as insulinas bovina e suína

Diferente da lisozima, os experimentos para determinação de cinética de precipitação e determinação de curvas de solubilidade das insulinas bovina e suína foram realizados simultaneamente. Nestes experimentos, amostras contendo uma concentração inicial de insulina de $5,00 \text{ mg}\cdot\text{ml}$ em solução e quatro diferentes concentrações de sal, com valores bem distribuídos, foram envelhecidas em diferentes intervalos de tempo até que se observasse a manutenção de um estado de equilíbrio por medida de absorção a 280 nm das fases líquidas. Após os sucessivos tempos de envelhecimento, as amostras eram centrifugadas e suas fases sobrenadante e precipitado eram analisadas. Os ensaios foram realizados com carbamato de amônio e sal volátil com R_{NC} igual a 2,5 e para as temperaturas de $25,0^\circ \text{C}$ e $15,0^\circ \text{C}$.

3.2.9. Modelagem da precipitação (gráficos de Cohn)

Para a estimativa de parâmetros relacionados à efetividade da precipitação das diferentes proteínas estudadas com os sais voláteis e de como esta efetividade variou com o $R_{N/C}$ e com a temperatura, expressou-se as solubilidades determinadas experimentalmente através da equação de Cohn (1925), em que o logaritmo da solubilidade da proteína ($\log S$) é plotado em função da concentração de sal volátil (C_{sal}).

3.2.10. Balanços de massa

Após a separação das fases precipitado e sobrenadante por centrifugação a 8000 g, à fase precipitado era adicionado 1,0 ml de tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8. Estas amostras eram, então, deixadas sob agitação branda entre 4 e 48 hs. As amostras onde se visualizava a completa solubilização do precipitado tiveram sua concentração de proteínas dosadas por absorção a 280 nm. A determinação da concentração de proteína no sobrenadante (cujo volume total foi considerado como de 1,0 ml, mesmo após a precipitação e centrifugação) e na solução de precipitado ressolubilizado (1,0 ml) permitiu o cálculo do balanço de massa do processo de precipitação. O balanço de massa foi feito com a intenção de se estudar a confiabilidade do método de medida de concentração de proteína por A280 como instrumento analítico nas precipitações realizadas, para se obter uma estimativa dos erros do processo como um todo e para se estudar a recuperação da proteína após a precipitação.

3.2.11. Avaliação de modificação estrutural pós-precipitação de insulina bovina pela técnica de dicroísmo circular

Apesar dos estudos com tripsina, relatados por Watanabe (2004), terem mostrado que a desnaturação ocasionada pelo carbamato de amônio foi relativamente pequena, optou-se por realizar um estudo de avaliação da modificação estrutural de molécula protéica pós precipitação e ressolubilização através da técnica de dicroísmo circular (CD). Escolheu-se a insulina para este

estudo por ser esta a proteína de maior pureza que tínhamos em estoque no momento, por possuir estruturas secundária e terciária relativamente simples e por apresentar uma completa ressolubilização do precipitado em tampão relativamente rápida.

Experimentos de precipitação foram realizados a 25 °C e os precipitados, expostos ao sal volátil por diferentes tempos, foram analisados pela técnica de CD. Inicialmente, foi preparada uma solução de insulina 2,0 mg/ml em solução aquosa de NaOH pH 9,0 (0,01 mM) com NaCl 0,01 M. Esta solução foi preparada dissolvendo-se 20 mg de insulina em 10,0 ml de solução de HCl 0,01 N (pH 2,0) cujo pH foi, em seguida, ajustado para 9,0 com solução de NaOH.

Preparou-se, então, quatro alíquotas de 1,0 ml de uma solução para precipitação utilizando-se 600 µl da solução original de insulina em NaOH pH 9,0 e 400 µl de uma solução de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ 10,00 mol·kg⁻¹. Esta solução final continha, então, insulina 1,20 mg/ml, NaCl 6 mM e sal volátil 4,00 mol·kg⁻¹, cujo pH estimase próximo a 9,8 (o pH aproximado das soluções de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$, visto que a concentração de carbamato de amônio é 5 ordens de grandeza maior que a concentração de NaOH), caracterizando assim uma solução de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ com $R_{N/C} = 2,0$.

Observou-se a formação de precipitado imediatamente após a adição de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$. Dos quatro sistemas de precipitação, um foi imediatamente levado à centrifugação (amostra identificada como tempo 0 h) e cada um dos outros três foram incubados a 25 °C por diferentes intervalos de tempo: 2 , 48 e 72 h.

Após a centrifugação, os precipitados de cada uma das amostras foram coletados, congelados a -8 °C e submetidos a vácuo em sistema “speed vack” por 2 h para remoção do sal volátil e água residual; em seguida, eles foram dissolvidos em 1,0 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 9,0. Uma solução de insulina 2,00 mg/ml em NaOH pH 9,0 com NaCl 0,01M (volume de 200 µl) foi seca no mesmo sistema “speed vack”; o resíduo seco foi em seguida dissolvido em 1 ml do mesmo tampão Tris-HCl 0,1 M pH 9,0 e esta solução foi utilizada para o experimento controle de CD.

A concentração molar de insulina em cada uma destas amostras foi medida por absorvância a 280 nm (diluídas, para este ensaio, na base de 50 µl de cada amostra e 250 µl de tampão fosfato 0,02 M pH 6,5 com 6,0 M de cloridrato de guanidina). O coeficiente de extinção molar ($\epsilon^{280nm}_{25^{\circ}C}$) da insulina neste tampão foi obtido através do programa “ProtParam tools”, disponível, via internet, no endereço de ferramentas para bioinformática “ExPaSy”, e foi calculado conforme a seguinte equação:

$$\epsilon^{280nm}_{25^{\circ}C} = \sum \epsilon_r r_M \quad (3.2)$$

onde ϵ_r é o coeficiente de extinção molar a 280 nm e 25 °C para cada um dos resíduos de aminoácidos que absorvem neste comprimento de onda (resíduos aromáticos e de cisteína) e r_M é o número total de cada um destes resíduos por unidade molar da proteína. Este cálculo teórico pode ser aplicado a este sistema devido ao fato da concentração de 6,0 M de cloridrato de guanidina tornar este um sistema desnaturante, onde se pressupõe estar a molécula protéica desenovelada e, assim, os resíduos de aminoácidos não estarão interagindo entre si. O valor de ϵ^{280nm} , previsto a partir da seqüência primária da insulina bovina e utilizado para o cálculo de sua concentração foi de 5480 M⁻¹cm⁻¹. As concentrações molares de insulina calculadas para o precipitado ressolubilizado das amostras controle, 0 h, 2 h, 48 h e 72 h foram, respectivamente: 345, 316, 347, 362 e 365 µM.

De posse destas informações, obteve-se os espectros de dicroísmo circular das amostras de insulina bovina a temperatura ambiente na faixa de comprimentos de onda de 205 a 260 nm. As amostras foram previamente diluídas de 1:5 em água, de forma a evitar interferências oriundas da alta concentração salina (Tris, NaCl e possíveis resquícios de sal volátil) e minimizar a voltagem na parte óptica do aparelho. Os valores de elipsidade (θ) para cada comprimento de onda foram devidamente corrigidos pelas concentrações molares em cada amostra, de forma a se obter os valores de elipsidade molar ($[\theta]$).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ENSAIOS PRELIMINARES

4.1.1. Determinação da concentração de proteína

Para a determinação da concentração de proteína através da medida de absorbância a 280 nm obteve-se o coeficiente de absorção específica para cada uma das três proteínas estudadas. Este coeficiente de absorção relaciona a concentração de proteína em solução com a fração de luz incidente que é absorvida pela solução, e é formulado pela equação de Lambert – Beer :

$$A = a \times C \times l \quad (4.1)$$

Em que A é uma medida logarítmica da fração de luz absorvida na amostra de proteína em relação à amostra de referência (“branco”), conhecida como absorbância; C é a concentração de proteína em solução em $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; l é a distância que a luz percorre através da solução da amostra (caminho ótico) em cm, neste caso 1 cm, e a é o coeficiente de absorção específico na faixa linear da curva A versus C em unidades de $\text{cm}^2\cdot\text{mg}^{-1}$ (Harris e Bashford, 1987).

4.1.1.1. Curvas padrão de lisozima

Como foi dito no tópico 3.2.1.1, foi realizado um estudo para verificar a influência da concentração de sal volátil na absorbância a 280 nm da lisozima, de forma a que se pudesse corrigir os valores de absorbância encontrados para as soluções sobrenadantes a diferentes concentrações de sal volátil, utilizando-se sempre como “branco” a solução na qual as amostras protéicas se encontravam originalmente em solução – Tris-HCl 0,01 M pH 9,8. Embora seja bem documentado que sais só apresentam influência no coeficiente de absorção de proteínas a concentrações extremas, usualmente acima de 30%, optou-se por

realizar tais estudos devido ao fato de ser o sal volátil um agente de “salting out” e portanto passível de interagir ou mesmo modificar a estrutura tridimensional de proteínas, o que poderia acarretar em uma modificação do coeficiente de absorção. Além disso, diferenças no índice de refração de soluções contendo carbamato de amônio, em relação à solução tampão Tris-HCl, poderiam resultar em uma variação aparente no coeficiente de absorção linear da proteína. Os estudos foram realizados apenas com o carbamato de amônio, assumindo-se que as propriedades físico-químicas das soluções deste e do sal volátil com R_{NC} igual a 2,5 sejam suficientemente próximas.

A Figura 4.1 contém as curvas de absorção a 280 nm das soluções de lisozima em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 9,8 e soluções de carbamato de amônio 1,00; 2,00 e 4,00 molal.

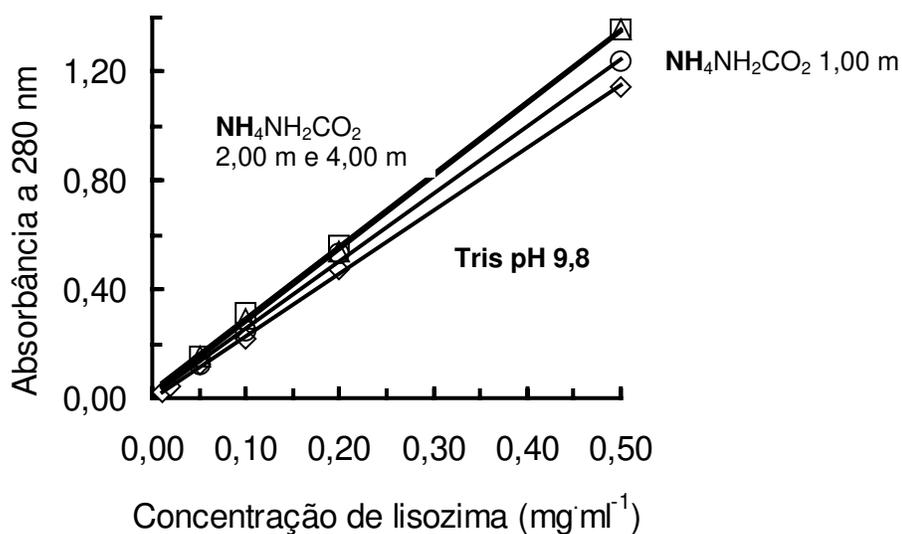


Figura 4.1. Curvas padrão de absorção a 280 nm para a lisozima a pH 9,8 com diferentes molalidades de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$. \diamond - Tris-HCl 0,01 M, pH 9,8; \circ - $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ 1,00 mol·kg⁻¹; Δ - lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ 2,00 mol·kg⁻¹; \square - $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ 4,00 mol·kg⁻¹.

Na Tabela 4.1, são listados os respectivos coeficientes de absorção (a) e os fatores de correlação (R^2) para uma reta passando pela origem para cada uma das quatro curvas de absorção.

Tabela 4.1. Parâmetros das curvas padrão de lisozima em soluções com diferentes concentrações de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$.

Solução	$a(\text{cm}^2\cdot\text{mg}^{-1})$	R^2
Tris-HCl 0,01M, pH 9,8	2,30	0,9994
$\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ 1,00 mol·kg ⁻¹	2,50	0,9985
$\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ 2,00 mol·kg ⁻¹	2,72	0,9991
$\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ 4,00 mol·kg ⁻¹	2,74	0,9979

Este conjunto de dados aponta para um comportamento hiperbólico do coeficiente de absorção em relação à concentração molal de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$, conforme pode ser visto na Figura 4.2. Tomando-se, então, da faixa linear da curva mostrada na Figura 4.2, pode-se traçar uma linha de tendência para a variação do coeficiente de absorção linear a 280 nm com a concentração de carbamato de amônio, que é válida para concentrações de carbamato de 0 a 2 molal e para concentrações de proteína na faixa de 0 a 0,5 mg/ml. Através desta linha de tendência, que pode ser visualizada na Figura 4.3, obtem-se a equação 4.2:

$$a = 0,2084 \cdot m(\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2) + 2,2995 \quad (4.2)$$

com um fator de correlação igual a 0,9999, e que foi utilizada na determinação da concentração de lisozima em solução neste trabalho. O coeficiente linear obtido nesta equação (2,2995) é o coeficiente de absorção da lisozima a pH 9,8 na ausência de sal volátil e em baixas concentrações salinas (no presente estudo, 10 mM de TRIS-HCl). Já o coeficiente angular (0,2084) é o acréscimo conferido a este mesmo coeficiente de absorção por unidade molal de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ adicionada (quando se utiliza como “branco” o tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8), desde que a concentração molal deste sal se mantenha na faixa de 0 a 2,00.

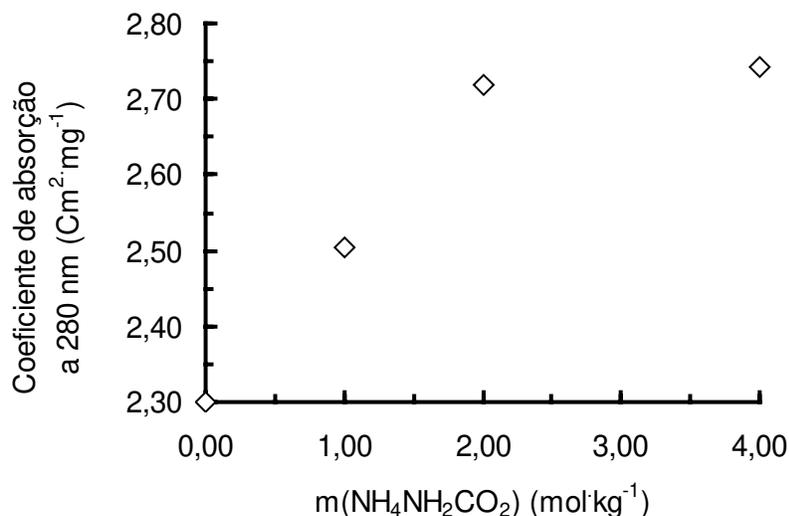


Figura 4.2. Influência da concentração de carbamato de amônio no coeficiente de absorção a 280 nm para soluções de lisozima em pH 9,8. A variável independente $m(\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2)$ é a molalidade de carbamato de amônio.

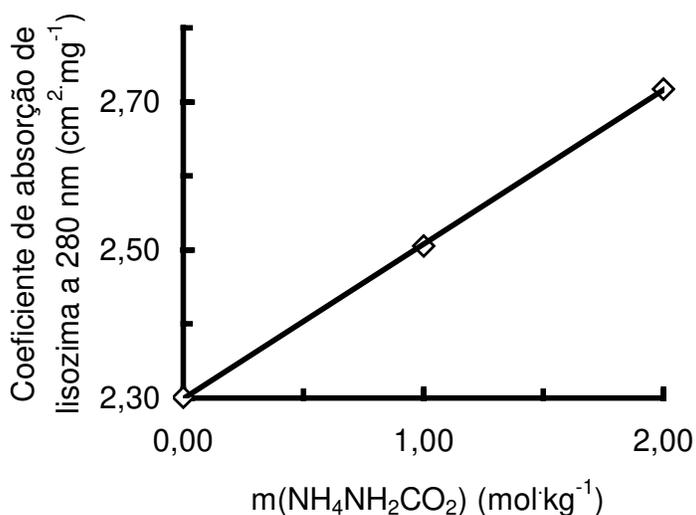


Figura 4.3. Correlação linear entre a concentração molal de carbamato de amônio e o coeficiente de absorção a 280 nm da lisozima em pH 9,8. Coeficiente angular da curva = 0,2084; coeficiente linear = 2,2995; fator de correlação linear $R^2 = 0,9999$.

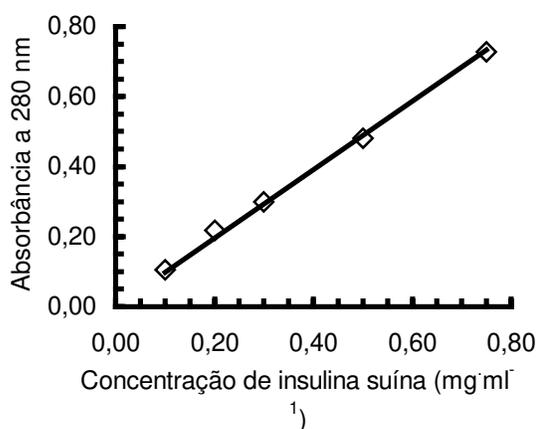
Para a determinação da concentração de lisozima nas soluções sobrenadantes dos ensaios de precipitação, foram feitas as diluições necessárias para que tanto a concentração de sal volátil quanto a de proteína se mantivessem dentro das faixas utilizadas nos experimentos de curva padrão. Para a determinação da concentração protéica no precipitado ressolubilizado, considerou-

se a concentração de sal volátil (decorrente da co-precipitação de sal e proteína) como desprezível, utilizando-se então o coeficiente linear da equação 4.2 como coeficiente de absorção.

4.1.1.2. Curvas padrão de insulina bovina e suína

Como será discutido no ítem 4.3, não se julgou necessário a determinação de curvas padrão das insulinas suína e bovina em diferentes concentrações de sal volátil. Assim, foram determinadas apenas as respectivas curvas padrão das duas insulinas em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8 (Figura 4.4) bem como seus respectivos coeficientes de absorção (a) a 280 nm e os fatores de correlação (R^2).

A)-



B)-

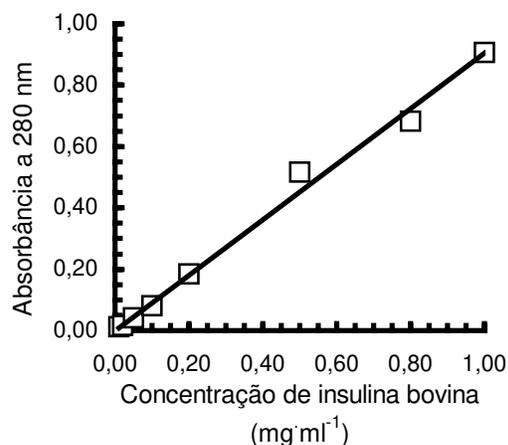


Figura 4.4. Curvas padrão de insulina suína e bovina em tampão Tris-HCl 0,01 M pH 9,8. A) – Curva padrão de insulina suína; $a = 0,976$; $R^2 = 0,9973$. B) – Curva padrão de insulina bovina; $a = 0,9052$; $R^2 = 0,993$.

4.2. PRECIPITAÇÃO DE LISOZIMA COM SAIS VOLÁTEIS

4.2.1. Determinação do tempo de equilíbrio para a precipitação de lisozima com sais voláteis

Ensaio iniciais a relativas altas concentrações de carbamato (7,00 e 8,50 mol·kg⁻¹) (Figura 4.5) mostraram que a redução da concentração de proteína na fase líquida é intensa já na primeira meia hora. Para a concentração de carbamato de amônio de 8,50 mol·kg⁻¹, a concentração de proteína no sobrenadante permanece com um valor constante próximo a 1,02 mg/ml, no intervalo de tempo entre 1 e 25 h. Para a concentração de 7,00 mol·kg⁻¹, no entanto, mesmo após 15 h o estabelecimento do equilíbrio não estava bem definido.

Ensaio de precipitação a menores concentrações de sal (4,00 e 4,50 mol·kg⁻¹) (Figura 4.6) mostraram a influência desta variável na cinética de nucleação com a existência de um tempo de indução mensurável pela técnica utilizada para a dosagem de proteínas: até cerca de 10 h, não havia redução da concentração de lisozima na fase líquida, o que acontece em grande extensão a partir de cerca de 12 h. Ao contrário do determinado para as concentrações de 8,5 mol·kg⁻¹, mesmo após 25 h de envelhecimento não se podia afirmar que o equilíbrio havia sido atingido.

Estes resultados apontam para um alto limite de metaestabilidade para a nucleação da lisozima induzida por “salting-out” com eletrólitos voláteis, sendo necessário, em baixas supersaturações, a ocorrência de um tempo de indução relativamente longo antes que se detecte a redução da concentração na fase líquida; redução esta que, no equilíbrio, é de cerca de 96% para concentrações de carbamato de amônio próximas a 5 mol·kg⁻¹. Bernardo *et al* (2004) também observaram tempos de indução relativamente longos para a lisozima, contudo bem menores que os aqui observados, devendo-se, no entanto, levar em conta que tanto o sistema de precipitação (tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 3,5 ou 4,0, com 10% de cloreto de sódio (m/v) a 15, 20, 25 e 35 °C, em recipiente de quartzo), quanto o método de monitoramento da nucleação (medida do espalhamento de luz através da absorvância a 320 nm) eram distintos do método aqui utilizado.

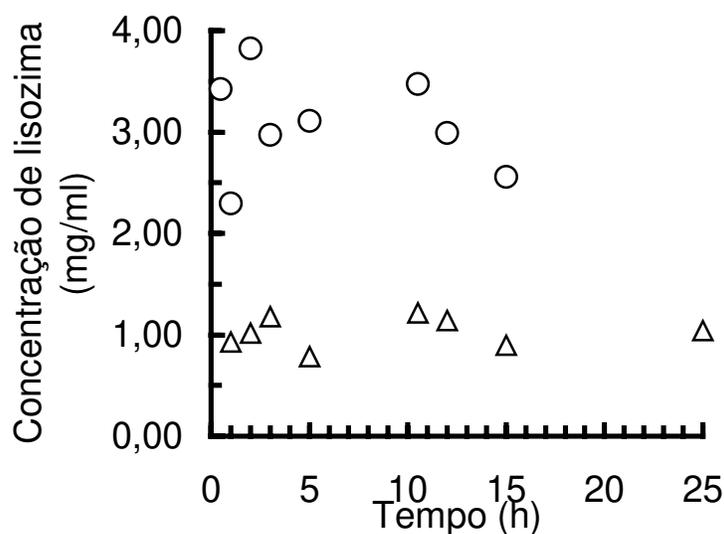


Figura 4.5. Cinética de precipitação de lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ (solução com $R_{N/C} = 2,0$ e pH 9,8) com concentrações de sal de $7,00 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (O) e $8,50 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Δ). Concentração inicial de proteína de $15,00 \text{ mg/ml}$. Temperatura igual a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Dados são médias de duplicatas.

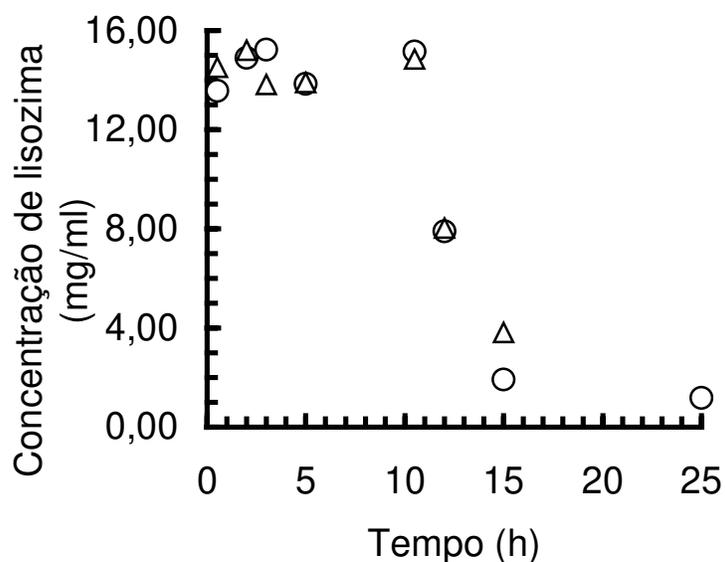


Figura 4.6. Cinética de precipitação de lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ (solução com $R_{N/C} = 2,00$ e pH 9,8) com concentrações de sal de $4,0 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (O) e $4,5 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Δ). Concentração inicial de proteína de $15,00 \text{ mg/ml}$. Temperatura igual a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Dados são médias de duplicatas.

A decorrência de um tempo relativamente longo entre a detecção da nucleação e o estabelecimento de um estado de equilíbrio, sobretudo para as amostras de menor supersaturação, sugere uma cinética lenta para o crescimento cristalino (partículas de precipitado) da lisozima quando sob a influência do carbamato de amônio. Howard *et al.* (1988) citam um fator limitante na cinética para o crescimento cristalino da lisozima: A difusão de moléculas de proteína do seio do líquido para a face cristalina.

Um segundo conjunto de ensaios de precipitação, para períodos de tempos maiores, foram realizados para as concentrações de sal de 4,00 e 5,0 mol·kg⁻¹ (Figura 4. 7). Após 48 h, verificou-se que foi atingido o equilíbrio, não se observando mais variações significativas da concentração na fase líquida que permaneceu com um valor constante de aproximadamente 0,55 mg/ml.

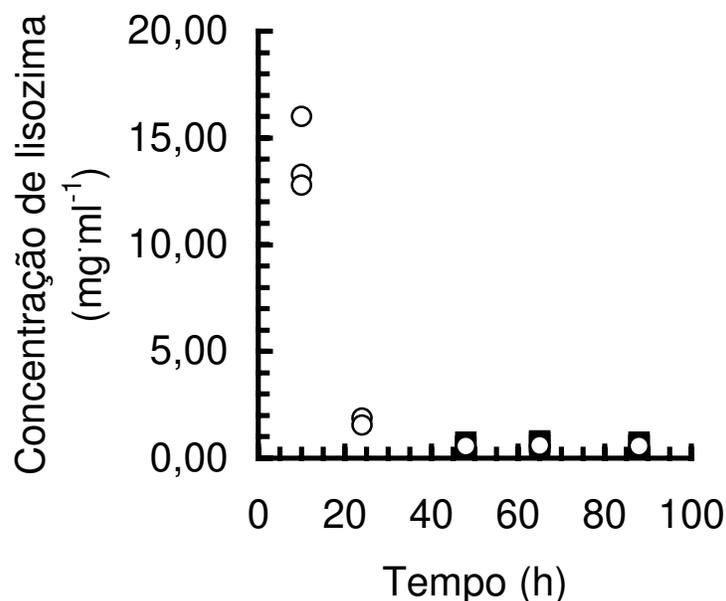


Figura 4.7. Cinética de precipitação de lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ (solução com $R_{NC} = 2,0$ e pH 9,8) com concentrações de sal de 4,00 mol·kg⁻¹ (■) e 5,00 mol·kg⁻¹ (○). Concentração inicial de proteína de 15,00 mg·ml⁻¹. Temperatura de 25 °C. Dados em triplicatas, exceto para um ensaio em duplicatas: 5,00 mol·kg⁻¹ no tempo de 24 h.

A partir destes resultados, então, optou-se por realizar os experimentos de precipitação de lisozima com um tempo de envelhecimento de 48 h.

4.2.2. Curvas de solubilidade de lisozima em solução de carbamato de amônio

As concentrações de lisozima na fase sobrenadante, representando a solubilidade da proteína, foram inicialmente determinadas em soluções de sal volátil com $R_{N/C}$ igual a 2,0 nas temperaturas de 5,0; 15,0; 17,5; 20,0 e 25,0 ° C. A concentração inicial de lisozima em solução foi de 15,00 mg/ml. As curvas de solubilidade de lisozima em $R_{N/C}$ igual a 2,0 mostraram uma diminuição da concentração de proteína na fase sobrenadante com o aumento da concentração de sal, evidenciando o efeito “salting-out” na precipitação da proteína.

As curvas de solubilidade de lisozima a diferentes temperaturas (Figura 4.8) revelaram o comportamento de solubilidade retrógrada (menor solubilidade da proteína na medida em que se aumenta 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. Analisando-se de início os valores dos pontos da curva a 25,0 ° C para as concentrações de sal de 4,00 e 5,00 molal, pode-se verificar que estes valores são muito próximos àqueles encontrados no platô para os tempos mais longos na Figura 4.7, mostrando que, a partir do tempo de 48 h o sistema realmente se encontra em equilíbrio. Contudo, os valores para a concentração de 7,00 molal são significativamente menores que aqueles encontrados tanto para a concentração de 7,00 quanto para a de 8,50 molal após 25 h no gráfico da Figura 4.6. Este fato permite constatar que ao tempo de 25 h, o sistema, de fato, ainda não se encontra em equilíbrio na faixa de concentrações estudadas (enquanto que após 48 h o equilíbrio, ao que tudo indica, foi atingido), e, portanto, o tempo de 48 h é realmente um intervalo de tempo de envelhecimento adequado para a precipitação de lisozima com sais voláteis.

Nota-se também que os valores de concentração de proteína no sobrenadante para as temperaturas de 5,0 e 15,0 ° C são muito próximos. Para as temperaturas de 20,0 e 25,0 °C, as solubilidades a altos valores de supersaturação (maiores concentrações de carbamato de amônio) tendem a se

aproximar. A curva de solubilidade a 17,5 °C parece apresentar um comportamento intermediário: os ensaios com maior supersaturação apresentam valores de concentração de proteína no sobrenadante próximos aos de maiores supersaturações das curvas a 20,0 e 25,0 °C, porém, ao se baixar a concentração de carbamato de amônio de 5,00 para 4,50, a concentração no sobrenadante sobe bruscamente para um valor próximo aos das curvas a 5,0 e 15,0 °C. Este comportamento pode ser melhor visualizado na modelagem das curvas de solubilidade através da equação de Cohn (Figura 4.9).

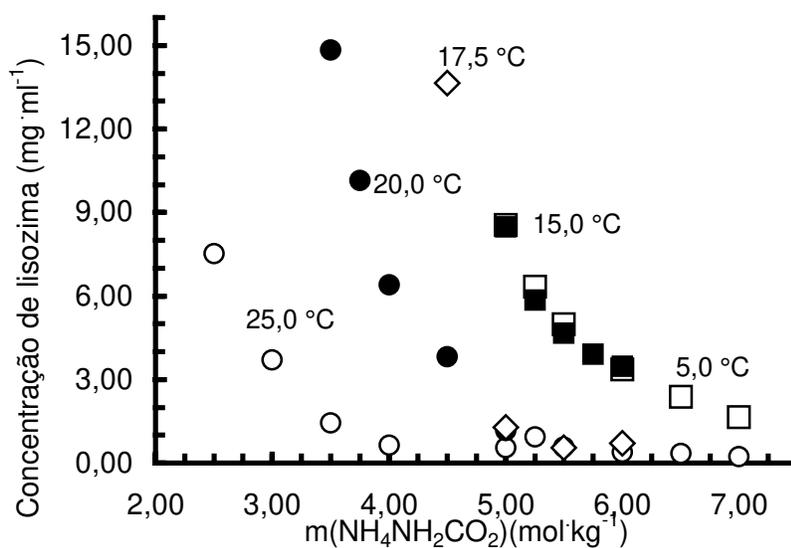


Figura 4.8. Solubilidade de lisozima em $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ ($R_{N/C} = 2,0$) a: □ 5,0 °C, ■ 15,0 °C, ◇ 17,5 °C, ● 20,0 °C, e ○ 25,0 °C. Tempo de envelhecimento de 48 h. As solubilidades são expressas como os valores de concentração no sobrenadante, medidos por absorvância a 280 nm. Dados são médias de duplicatas.

A análise dos gráficos de Cohn aponta para uma mudança de comportamento entre as curvas a temperaturas mais altas (20,0 e 25,0 °C) e aquelas a temperaturas mais baixas (15,0 e 5,0 °C). Na Tabela 4.2 são apresentados os valores de K'_s e β' para as curvas da Figura 4.9.

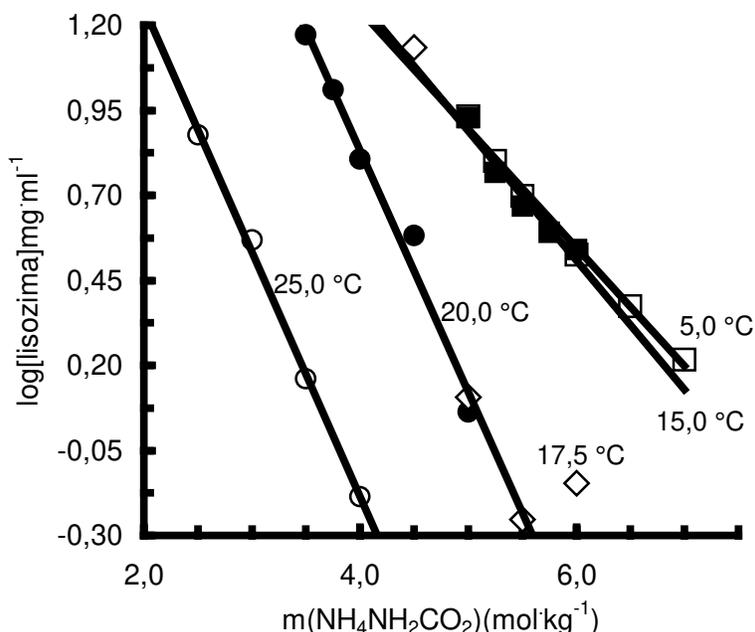


Figura 4.9. Solubilidade de lisozima a diferentes temperaturas em solução de carbamato de amônio R_{NC} igual a 2,0 expressa segundo o gráfico de Cohn. Solubilidades a: \square 5,0 °C; \blacksquare 15,0 °C; \diamond 17,5 °C; \bullet 20,0 °C e \circ 25,0 °C. Os dados da figura são pontos colhidos da faixa linear das curvas da Figura 4.8 e tratados segundo a equação de Cohn. Variável independente – molalidade de carbamato de amônio em $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$; variável resposta – logaritmo da concentração de lisozima ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) em solução.

Tabela 4.2. Parâmetros β' e K'_s , respectivos erros destes parâmetros com intervalo de confiança de 95% e correlação linear (R^2) da equação de Cohn para a lisozima em solução de carbamato de amônio ($R_{NC} = 2,0$) a diferentes temperaturas.

Temperatura (° C)	K'_s	Erro	β'	Erro	R^2
5,0	0,35	$\pm 0,02$	2,64	$\pm 0,09$	0,9925
15,0	0,38	$\pm 0,05$	2,79	$\pm 0,27$	0,9530
20,0	0,71	$\pm 0,06$	3,67	$\pm 0,25$	0,9790
25,0	0,72	$\pm 0,03$	2,69	$\pm 0,09$	0,9974

Nos ensaios aqui apresentados, pode-se observar dois grupos de valores para K_s' : para as temperaturas de 20,0 e 25,0 °C observam-se valores mais altos e muito próximos entre si (diferença estatisticamente não significativa em relação aos desvios com 95% de confiança para estes parâmetros estimados pelo programa Origin na regressão linear); enquanto que para as temperaturas de 5,0 e 15,0 °C observa-se valores significativamente mais baixos e também muito próximos entre si (diferença não significativa com intervalo de confiança de 95%) (vide Tabela 4.2). Estes dados sugerem a existência de dois padrões de “salting-out” pelo carbamato de amônio para a lisozima: de 5,0 a 15,0 °C, um padrão de menor supersaturação pela presença do sal (menor eficiência precipitante do carbamato de amônio), e de 20,0 a 25,0 °C, um padrão de maior supersaturação pela presença do sal (maior “eficiência” do carbamato como agente precipitante). Para uma temperatura intermediária (17,5 °C) é observado um comportamento também intermediário entre os dois padrões: os pontos de maior supersaturação têm comportamento semelhante ao da curva a 20,0 °C, enquanto que o ponto de concentração de carbamato igual a 4,50 (menor supersaturação) é mais bem representado pelas curvas a 15,0 e 5,0 °C.

O duplo padrão de solubilidade da lisozima apresentado nas Figuras 4.8 e 4.9 parece estar em conformidade com os dados de Howard *et al.* (1988) que, ao estudarem a solubilidade de lisozima com diferentes concentrações de NaCl e a diferentes temperaturas, verificaram uma mudança nas curvas de solubilidade próximo a 20,0 – 25,0 °C. Entre 10,0 e 20,0 °C (ou, dependendo da concentração salina, entre 10 e 25 °C), a lisozima exibia uma solubilidade característica para um calor de cristalização (ΔH_{cris}) negativo, com a solubilidade aumentando com o aumento de temperatura, enquanto que para temperaturas maiores ela apresentava um comportamento de solubilidade característico de um calor de cristalização positivo (solubilidade retrógrada). Esta mudança ocorria justo na faixa de temperaturas onde Jolles e Berthou (1972) descreveram a transição da geometria do cristal, de tetragonal (baixas temperaturas) para ortorrômbico (altas temperaturas). Também foi observado, pelo grupo de Howard (1988), que a variação entre os calores de cristalização calculados para as curvas em temperaturas acima e abaixo da zona de transição (20 – 25 °C) apresentava um

valor próximo ao ΔH de conversão do hábito cristalino de tetragonal para ortorrômbico, em concordância com os dados de Jolles e Berthou (1972).

É esperado que esta variação de hábito cristalino e de comportamento da solubilidade em relação à temperatura esteja associada a alguma mudança conformacional na lisozima nesta faixa de temperaturas, quando submetida a concentrações salinas consideráveis. Esta mudança também afetaria a constante K'_s , uma vez que ela implica em uma mudança nos valores de ϕ (e portanto de Ω). De fato, pode-se especular que o aumento no valor de K'_s para a lisozima a temperaturas mais altas esteja associado a uma maior exposição dos resíduos hidrofóbicos da proteína próximo a 20 °C. Estas mudanças conformacionais com a temperatura poderiam ser acentuadas pela alta concentração salina em solução e por possíveis efeitos desnaturantes dos eletrólitos voláteis. Uma possível explicação do comportamento intermediário a 17,5 °C é a de que nesta temperatura exista uma certa proporção, em solução, de moléculas com estrutura mais compacta e de moléculas com motivos hidrofóbicos mais expostos. Em baixas concentrações salinas, o equilíbrio estaria voltado para a presença de um maior número de moléculas com estrutura nativa, com um comportamento de solubilidade próximo ao observado para temperaturas menores (5 e 15 °C). Com o aumento da concentração salina o equilíbrio se deslocaria para um maior número de moléculas parcialmente desenoveladas, observando-se um comportamento de solubilidade próximo ao da curva a 20 °C.

No trabalho de Howard *et al* (1988), verificou-se que próximo a 20,0-25,0 °C ocorria um máximo local de solubilidade da lisozima, devido à referida mudança no hábito cristalino. Este comportamento também pode ser constatado nas curvas de solubilidade de lisozima em carbamato de amônio pela análise dos termos β' na Tabela 4.2. Como já mencionado (tópico 2.1.1), o parâmetro β' , que varia de forma independente da natureza do sal utilizado, mas é influenciado pela proteína, pH e temperatura, reflete o logaritmo da solubilidade na ausência de sal. Nota-se que também ocorre uma inversão do comportamento deste parâmetro a 20,0 °C, onde ocorre um máximo local. Os valores de β' nas demais temperaturas não são significativamente diferentes entre si.

4.2.3. Curvas de solubilidade de lisozima em solução de sal volátil $R_{N/C} = 2,5$

Para avaliação do efeito do parâmetro de razão entre as quantidades totais de nitrogênio e carbono dos sais voláteis ($R_{N/C}$), determinou-se a curva de solubilidade de lisozima em solução de sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 nas temperaturas de 5,0, 15,0, 20,0 e 25,0 °C (Figura 4.10). Nestes ensaios, a concentração inicial de proteína era também de 15 mg·ml⁻¹. Para efeito de comparação entre as soluções de diferentes $R_{N/C}$, a concentração de sal de razão igual a 2,5 é descrita em função da molalidade de dióxido de carbono total (considerada como se todo o sal em solução se converte-se em amônia e CO₂).

Observou-se que de forma análoga à precipitação de proteína com o sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,0, ocorre uma redução da concentração de lisozima na fase sobrenadante com o aumento da concentração de carbamato de amônio. Apesar da verificação do efeito “salting-out” na precipitação da proteína com a solução de $R_{N/C}$ igual a 2,5, a precipitação não se mostrou tão efetiva quanto aquela obtido com o sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,0. Este fenômeno também foi observado por Watanabe *et al* (2004) na precipitação da tripsina bovina, que atribuiu à concentração de íons carbonato (CO₃²⁻) em solução uma possível explicação deste fenômeno. Para altas concentrações de sal, a concentração de carbonato é proporcionalmente maior para uma razão $R_{N/C}$ igual a 2,0. Pode-se especular que um aumento na concentração de amônia (e conseqüentemente na razão $R_{N/C}$) faça com que parte dos íons carbonato se converta a carbamato (Lichtfers, 2000), o que em princípio faz com que a capacidade de induzir o “salting-out” diminua, pois o íon carbonato é um íon bivalente de tamanho próximo ao carbamato, e um aumento na densidade de cargas é, de modo geral, relacionado a um aumento na capacidade de induzir o “salting-out” (a princípio, devido a um aumento no termo σ nas Equações 2.1 e 2.5).

Assim como para as soluções de carbamato de amônio, foram verificados dois padrões de comportamento de precipitação, sendo que para as soluções a $R_{N/C}$ igual a 2,5 um comportamento intermediário é verificado na temperatura de 20 °C (análogo ao comportamento a 17,5 °C em $R_{N/C}$ igual a 2,0). Este duplo comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 4.11, onde são plotadas as

curvas a R_{NC} igual a 2,5 para as diferentes temperaturas em gráficos de Cohn. Na tabela 4.3 se apresentam os valores dos parâmetros K'_s e β' para as diferentes curvas, os erros destes parâmetros com 95% de confiança e os coeficientes de correlação (R^2) para cada curva.

Nota-se que os valores de K'_s para as soluções a R_{NC} igual a 2,5 são significativamente menores que seus análogos nas soluções de carbamato de amônio, confirmando um decréscimo na capacidade de induzir o “salting out” com o aumento do R_{NC} . Assim como nas curvas a R_{NC} igual a 2,0, os valores de K'_s a R_{NC} igual a 2,5 nas temperaturas de 5,0 e 15,0 °C, embora não possuam diferença significativa entre si, são significativamente menores que o valor a 25,0 °C. Isto confirma a existência de uma mudança no padrão de “salting out” também em R_{NC} 2,5. Já os valores do parâmetro β' das curvas a 5,0, 15,0 e 25,0 °C não tiveram diferença estatisticamente significativa, nem entre si (média igual a 2,75 com $SD \pm 0,18$) e nem entre seus análogos em solução de carbamato de amônio (média igual a 2,71 com $SD \pm 0,08$), mostrando que a pequena diferença entre os valores de pH das duas soluções não foi suficiente para alterar a solubilidade da lisozima na ausência de sal (pH da solução de carbamato de amônio é aproximadamente igual a 10,0, e da solução de sal volátil de R_{NC} igual a 2,5 é aproximadamente 10,5) (Watanabe *et al.* 2004).

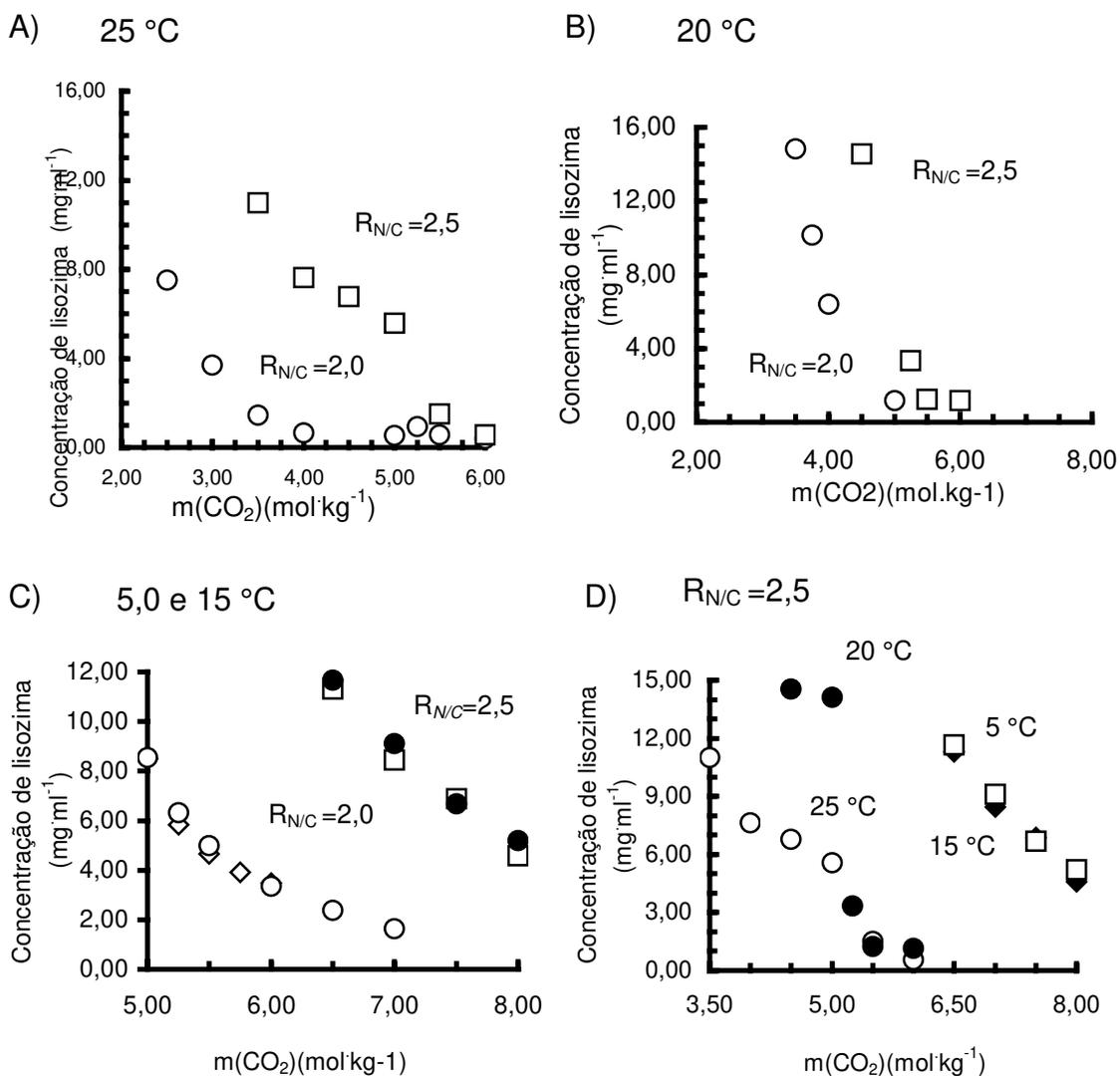


Figura 4.10. Variação do parâmetro razão entre as quantidades totais de nitrogênio e carbono ($R_{N/C}$) do sal volátil na precipitação de lisozima a diferentes temperaturas. Concentração inicial de proteína igual a $15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. A e B - temperaturas de 25 e 20 °C, respectivamente; \circ $R_{N/C} = 2,0$; \square $R_{N/C} = 2,5$. C - temperaturas de 5 e 15 °C; \circ 5 °C $R_{N/C} = 2,0$; \diamond 15 °C $R_{N/C} = 2,0$; \bullet 5 °C $R_{N/C} = 2,5$; \square 15 °C $R_{N/C} = 2,5$. D – Solubilidades em solução com $R_{N/C}$ igual a 2,5 a diferentes temperaturas: \square 5 °C; \blacklozenge 15 °C; \bullet 20 °C e \circ 25 °C. Tempo de envelhecimento de 48 h. Dados são médias de duplicatas.

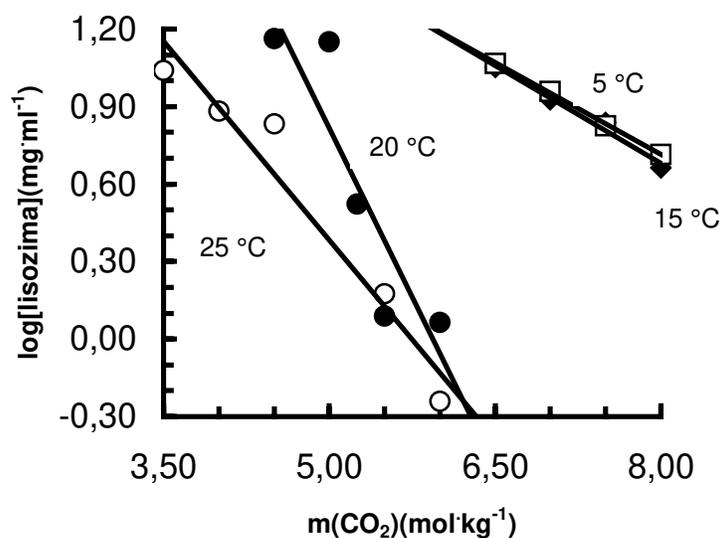


Figura 4.11. Solubilidade de lisozima a diferentes temperaturas em solução de sal volátil $R_{N/C}$ igual a 2,5 expressa segundo o gráfico de Cohn. \square - solubilidade a 5 °C; \blacksquare - solubilidade a 15 °C; \bullet - solubilidade a 20 °C; \circ - solubilidade a 25 °C. Os dados da figura são pontos colhidos da faixa linear das curvas na Figura 4.8 e tratados segundo a equação de Cohn. Variável independente – molalidade de dióxido de carbono em $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$; variável resposta – logaritmo da concentração de lisozima ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) em solução.

Tabela 4.3. Parâmetros β' e K'_s , respectivos erros destes parâmetros com intervalo de 95% de confiança e correlação linear (R^2) da equação de Cohn para a lisozima em solução de sal volátil com $R_{N/C} = 2,5$ a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	K'_s	Erro	β'	Erro	R^2
5,0	0,24	$\pm 0,01$	2,61	$\pm 0,05$	0,9982
15,0	0,25	$\pm 0,02$	2,70	$\pm 0,17$	0,9828
25,0	0,51	$\pm 0,07$	2,95	$\pm 0,34$	0,9461

4.2.4. Análise microscópica de cristais de lisozima obtidos em $R_{N/C}$ igual a 2,5

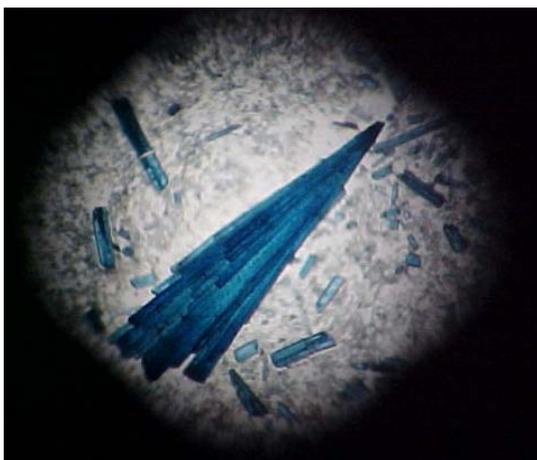
Em solução com $R_{N/C}$ igual a 2,5, a 25 °C e em concentração molal de sal igual a 4,0 mol·kg⁻¹, foi observada a formação de cristais aciculiformes que permaneciam em suspensão ou se aderiam às paredes do tubo Eppendorf. Estes cristais foram analisados em microscópio ótico trinocular com aumentos de 40X e de 100X. Para diferenciar se estes cristais se tratavam de cristais de proteína ou cristais inorgânicos, eles foram corados com Izit.

O Izit é uma molécula pequena de corante (em solução possui cor azul) que se infiltra nos canais de solvente, de dimensões relativamente grandes, existentes em cristais de macromoléculas biológicas, atribuindo uma coloração azul a estes cristais. Tais canais de solvente com grandes dimensões não estão presentes em cristais inorgânicos ou de moléculas pequenas, de forma a que o Izit não penetra nestes cristais e eles não adquirem a coloração azul (Izit Crystal Dye User Guide, Hampton Research, EUA).

Verificou-se uma coloração azul relativamente intensa nos cristais analisados após sua exposição ao Izit, o que confirmou tratarem-se de cristais de proteína (Figura 4.12). É sabido que a lisozima de clara de ovo de galinha se cristaliza com relativa facilidade, o que faz com que ela seja a proteína mais utilizada em estudos de cristalização de macromoléculas (Pusey *et al.*, 2001).

O fato de ter sido observado precipitado cristalino apenas em solução com $R_{N/C}$ igual a 2,5 provavelmente está ligado à baixa supersaturação desta em relação à solução de $R_{N/C}$ igual a 2,0 (onde não houve a evidência da formação de cristais tendo sido observado apenas precipitado amorfo). Soluções menos supersaturadas favorecem o surgimento de um menor número de núcleos, possibilitando um crescimento mais ordenado das partículas, com maior chance da formação de sólido cristalino ao invés de precipitado amorfo (Boistelle e Astier, 1988).

A)



B)

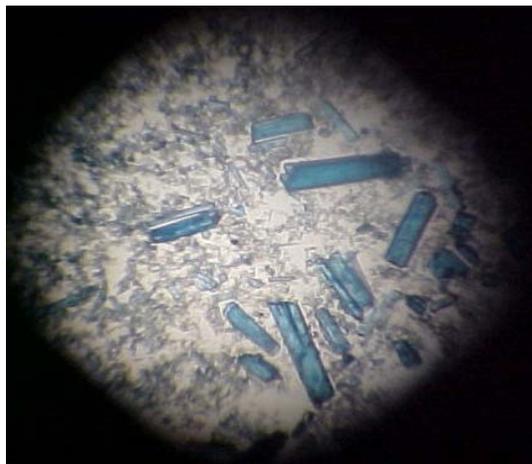


Figura 4.12. Cristais de lisozima obtidos em solução de sal volátil com $R_{N/C}$ igual a 2,5, a 25 °C, concentração inicial de proteína em solução de $15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, concentração molal de sal volátil de $4 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$. A – aumento de 40X. A estrutura maior ao centro, aparentemente, é um “cluster” de cristais menores e possui cerca de 1 mm de comprimento. B – aumento de 100X. São visualizados, em outro campo e em maior aumento, cristais com dimensões da ordem de 0,1 mm. Cristais desta ordem de grandeza também são visualizados em A, circundando o “cluster” central. A coloração azul dos cristais se deve à fixação de moléculas de Izit, o que comprova tratarem-se de cristais macromoleculares.

Embora estes dados em si possam pouca reprodutibilidade (de dois ensaios nas condições mencionadas na Figura 4.12, a formação de cristais foi observada em apenas um) devido à superfície irregular e não padronizada da parede dos tubos eppendorfs, e embora alguns autores contestem a eficácia da lisozima como proteína modelo de cristalização (chayen e Saridakis, 2001; Rosenberg *et al.* 1996), estes resultados são um incentivo para o estudo da utilização de sais voláteis na formação de cristais de proteínas. Eles também sugerem a importância da variação do parâmetro razão $R_{N/C}$, bem como outros parâmetros que influenciem a supersaturação do sistema, na qualidade do produto obtido: é sabido que cristais de proteínas possuem uma série de vantagens definitivas em relação à estocagem, densidade, concentração protéica e diversas propriedades mecânicas e reológicas sobre sólidos amorfos ou pós cristalinos (Kam *et al.*, 1978).

4.2.5. Balanço de massa para a precipitação de lisozima com sais voláteis

Um experimento de precipitação de lisozima a diferentes concentrações de carbamato de amônio foi realizado com o intuito de se fazer o balanço de massa em termo de proteína na fase sobrenadante e precipitado de forma a se verificar a exatidão das análises de concentração de proteína na fase líquida e no precipitado pelo método utilizado (absorbância a 280) (Figura 4.13). Estes experimentos foram realizados em duplicatas a 25 °C com uma concentração inicial de proteína em solução de 15 mg·ml⁻¹. Uma vez que a lisozima apresentou dificuldades em sua ressolubilização após decorrido o tempo de equilíbrio (48 h), optou-se por se determinar os balanços de massa a partir de um experimento de precipitação com um tempo de envelhecimento de 3,5 horas.

Verificou-se um erro máximo de menos de 15% e um erro mínimo de menos de 1,8% para os balanços. Tanto o valor médio dos balanços (101,5%) quanto o valor da mediana (103,6%) são bem próximos do valor teórico (100%). Assim, pode-se constatar que a metodologia utilizada para a precipitação, dissolução, diluição e medida das concentrações na fase sobrenadante por absorbância a 280 nm é adequada desde que repetições sejam feitas para assegurar a exatidão nos valores obtidos no caso de estudos sem seqüência de pontos experimentais que permitam a determinação de uma tendência. Uma possível fonte de erro no balanço de massa é o fato de o isolamento das duas fases após a centrifugação ter sido realizado por pipetagem da solução sobrenadante, o que pode acarretar no arraste de pequenas partículas de material precipitado em suspensão juntamente com o sobrenadante pipetado. A otimização do processo de isolamento é possível, o que deve levar a menores erros no balanço de massa, mas seu estudo foge ao escopo deste trabalho.

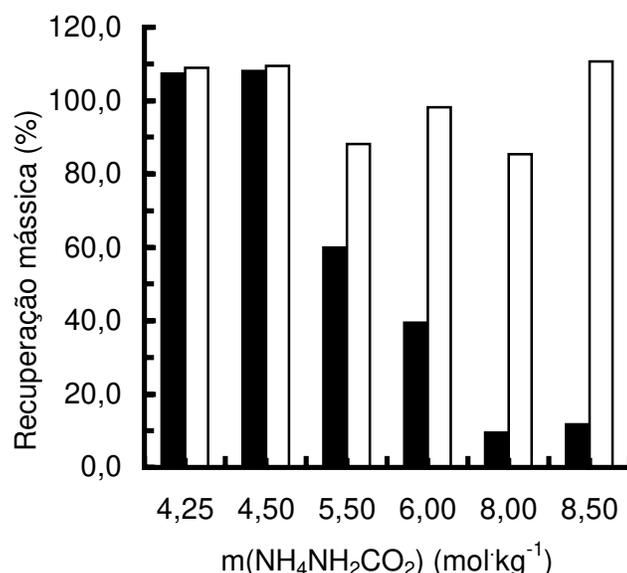


Figura 4.13. Balanço de massa de ensaio de precipitação de lisozima. As barras indicam a recuperação de massa de proteína na fase líquida (■) e a recuperação total na fase líquida e precipitado (□). Condições: solução de $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ com $R_{N/C} = 2,0$ (pH 9,8); tempo de envelhecimento, 3,5 h; temperatura, 25,0 °C; concentração de lisozima inicial, 15,0 mg/ml. Dados são médias de dois ensaios. Variável independente – molalidade de Carbamato de amônio ($\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$); resposta – percentagem de lisozima quanto à quantidade inicialmente adicionada.

A ressolubilização do precipitado por agitação branda após a decorrência do tempo de equilíbrio para a precipitação (48 h) não ocorreu, nem para as soluções de carbamato de amônio e nem para as de $R_{N/C}$ igual a 2,5. Uma hipótese é a presença de sais voláteis no precipitado de lisozima em quantidades suficientes para dificultar ou mesmo impedir a completa ressolubilização da proteína. Neste caso, a retirada do sal por diminuição da pressão ou elevação da temperatura pode ser checada como uma variável passível de aumentar a recuperação da proteína. Outra hipótese é a de que o longo período de tempo utilizado neste ensaio, para que o sistema atingisse o equilíbrio, seja suficiente para que o sal volátil induza modificações conformacionais ou mesmo desnaturação das moléculas de proteína de forma “irreversível”, impedindo assim a sua completa ressolubilização. O intervalo de tempo necessário para se alcançar o equilíbrio pode ser encurtado aumentando-se a supersaturação do sistema com uma elevação da concentração da proteína ou do sal, embora o último, em

princípio, alteraria a solubilidade da proteína e poderia intensificar possíveis efeitos desnaturantes do sal. Também é possível uma explicação que tende por um caminho em contrário: a alta supersaturação oriunda da elevada concentração inicial de lisozima utilizada nos ensaios de precipitação poderia ser a causadora de possíveis mudanças conformacionais irreversíveis que dificultariam sua ressolubilização. Pode-se também aumentar a ressolubilização do produto aumentando a força iônica da solução (utilizar, por exemplo, Tris 0,1 M ao invés de 0,01 M), o que, em princípio, poderia intensificar o efeito “salting-in” para a proteína precipitada. Pode-se ainda utilizar outra solução com um pH mais ácido, visto que o pH da solução utilizada (9,8) é muito próximo do ponto isoelétrico da lisozima (11,1). Todas estas hipóteses são passíveis de serem checadas em trabalhos futuros.

4.3. PRECIPITAÇÃO DE INSULINAS BOVINA E SUÍNA COM SAIS VOLÁTEIS

Para as insulinas suína e bovina, os estudos de cinética de precipitação e de curvas de solubilidade foram realizados simultaneamente. Em ambos os casos, foram realizados ensaios com diferentes concentrações de sal volátil, a temperaturas de 25,0 e 15,0 °C e em R_{NC} igual a 2,0 e 2,5 em diferentes tempos de envelhecimento até que se verificasse que o equilíbrio foi alcançado. Nestes ensaios, a concentração inicial de insulina em solução era de $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Optou-se por utilizar uma menor concentração inicial de proteína para as duas insulinas em relação à lisozima (cuja concentração inicial, como já mencionado, foi de 15 mg/ml) uma vez que ensaios preliminares (dados não mostrados), além das informações da literatura consultada (Schlichtkrull, 1957, a-b; Blundell, *et. al.*, 1972, Sluzky, *et. al.*, 1992) sugeriam uma solubilidade significativamente menor e uma cinética de precipitação mais rápida para a insulina. Estes ensaios não foram realizados em duplicata, uma vez que, ao se atingir o equilíbrio do sistema, os subseqüentes valores de concentração no sobrenadante podem ser considerados como repetições.

Como mencionado no tópico 3.2.1, para as insulinas não foi realizado um estudo de modificação do coeficiente de absorção a 280 nm com a molalidade de

sal volátil, visto que os estudos com a lisozima mostraram que este acréscimo foi relativamente pequeno e é tanto maior quanto maior for a concentração de sal volátil e de proteína no sobrenadante. Uma vez que tanto a concentração de proteína no sobrenadante quanto as concentrações de sal volátil utilizadas nos ensaios de precipitação de insulina bovina e suína foram significativamente menores que para a lisozima, não se julgou necessário a realização de tais estudos. Posteriormente, os balanços de massa (tópicos 4.3.2 e 4.3.4 deste trabalho) confirmaram esta suposição.

4.3.1. Cinética de precipitação e curvas de solubilidade de insulina bovina em soluções com sais voláteis

As curvas de solubilidade de insulina bovina (Figura 4.14) mostraram, assim como para a lisozima, o efeito de “salting out”. Percebe-se que já nos primeiros 30 min. de precipitação o sistema alcança o equilíbrio. Entretanto percebe-se também que, ao contrário do sucedido para a lisozima, os parâmetros temperatura e razão R_{NC} , nas faixas estudadas, parecem não ser significativamente relevantes para a precipitação de insulina bovina com o sal volátil. Os valores dos pontos experimentais determinados a 25 °C e 15 °C e em R_{NC} igual a 2,00 e 2,50 são praticamente idênticos.

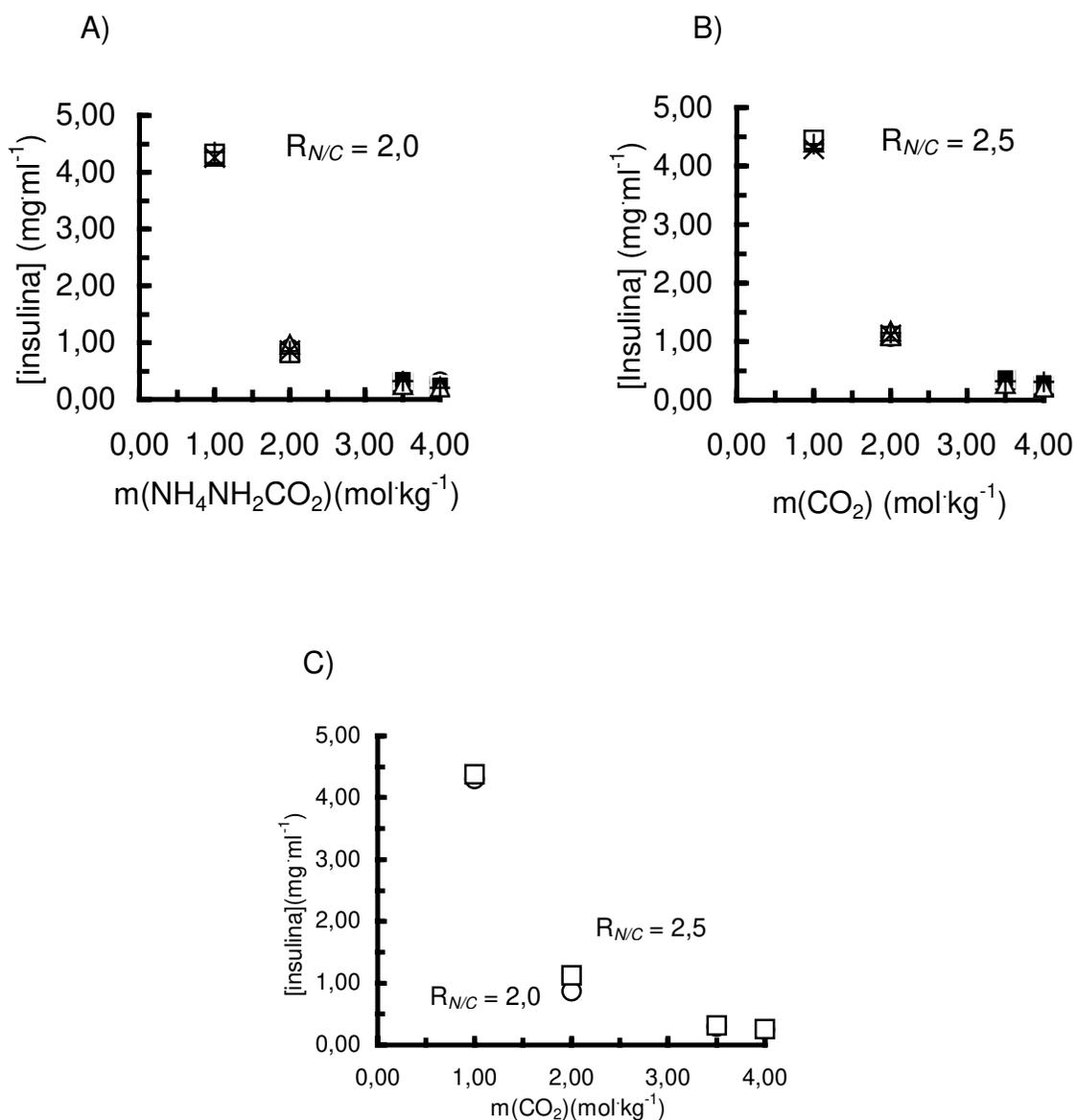


Figura 4.14. Solubilidade de insulina bovina em soluções de sal volátil em diferentes tempos de envelhecimento. A e B – solubilidades em soluções com $R_{N/C}$ igual a 2,0 e 2,5 respectivamente. \diamond - solubilidade a 25,0 °C e em tempo de envelhecimento de 0,5 h; \circ - 25,0 °C e 5 h; \blacktriangle - 25,0 °C 13,5 h; \square - 25,0 °C e 20 h; \blacksquare - 15,0 °C e 0,5 h; \triangle - 15,0 °C e 5 h; \times - 15,0 °C e 13,5 h; $+$ - 5,0 °C e 20 horas. C - Sobreposição das curvas em $R_{N/C}$ igual a 2,0 e 2,5. \circ - média das curvas em $R_{N/C}$ igual a 2,0 (dados de A); \square - média das curvas em $R_{N/C}$ igual a 2,5 (dados de B). A concentração de proteína inicial em todos os ensaios foi de 5 mg·ml⁻¹. $m(i)$ – molalidade da espécie i em mol·kg⁻¹; [insulina] – concentração de insulina em mg·ml⁻¹.

A Figura 4.15 apresenta a sobreposição das médias das curvas em R_{NC} igual a 2,0 e 2,5 em gráfico de Cohn e a Tabela 4.4 apresenta os parâmetros K'_s e β' . Nota-se que as duas curvas praticamente se sobrepõem e que valores dos respectivos parâmetros não apresentam diferença estatisticamente significativa com intervalo de confiança de 95%, ressaltando a pequena influência das variáveis temperatura e R_{NC} para a precipitação de insulina bovina nas condições estudadas.

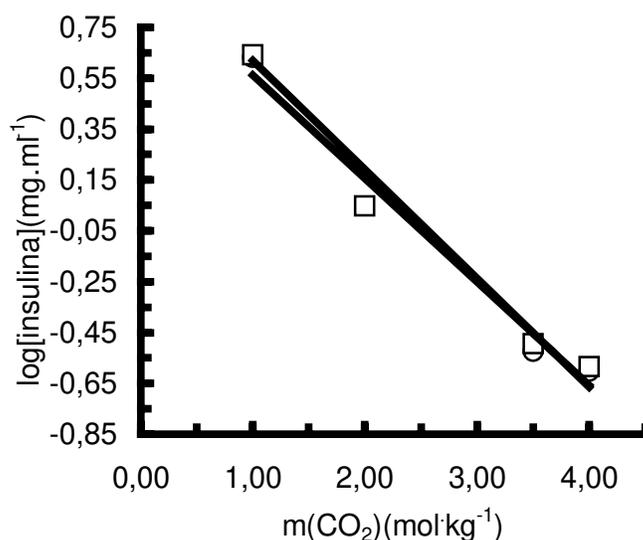


Figura 4.15. Solubilidade de insulina bovina em soluções de sal volátil com R_{NC} igual a 2,0 e 2,5 expressa segundo o gráfico de Cohn. ○ - média das curvas em R_{NC} igual a 2,0 (Figura 4.14.A); □ - média das curvas em R_{NC} igual a 2,5 (Figura 4.14.B). $m(\text{CO}_2)$ - molalidade de CO_2 em mol·kg⁻¹; $\log[\text{insulina}]$ - logaritmo da concentração de insulina bovina no sobrenadante em mg·ml⁻¹.

Tabela 4.4. Parâmetros β' e K'_s , respectivos erros destes parâmetros com intervalo de 95% de confiança e coeficiente de correlação linear (R^2) da equação de Cohn para a insulina bovina em solução de carbamato de amônio e sal volátil com R_{NC} igual a 2,5.

R_{NC}	K'_s	Erro	β'	Erro	R^2
2,0	0,43	± 0,04	1,05	± 0,13	0,9902
2,5	0,41	± 0,05	0,97	± 0,13	0,9746

Percebe-se que os valores de K'_s para a insulina bovina são próximos aos valores para a lisozima em carbamato de amônio (R_{NC} igual a 2,00) a 5,0 e 15,0 °C, sendo significativamente menores que os valores para esta mesma proteína no mesmo R_{NC} a 20,0 e 25,0 °C (onde se observou, para a lisozima uma mudança no comportamento de precipitação com uma maior eficiência no “salting out” induzido pelo sal volátil). Contudo, a insulina bovina apresentou, em todas as condições estudadas neste trabalho, valores de solubilidade significativamente menores que os valores obtidos para a lisozima. Aparentemente, esta menor solubilidade está mais relacionada às propriedades intrínsecas da molécula que ao efeito do sal: os valores do parâmetro β' para a insulina bovina são aproximadamente iguais a 1,00 enquanto que este mesmo parâmetro para a lisozima apresenta valores em torno de 2,70. Estes dados apontam para uma solubilidade cerca de 50X maior para a lisozima que para a insulina bovina, na ausência do efeito precipitante do sal volátil. Embora a lisozima possua massa molecular mais de duas vezes maior que a da insulina, a distribuição mais uniforme dos grupos carregados e hidrofóbicos da lisozima em comparação com a insulina (com uma consequente redução substancial do potencial para a formação de oligômeros) contribui para uma maior solubilidade da primeira em relação à segunda (Rosenberg *et al.*, 1996; Slusky *et al.*, 1992).

A reduzida solubilidade da insulina bovina nos valores de pH e concentração salina estudados pode ser uma possível explicação para a não discriminação do efeito da temperatura e da razão R_{NC} nas curvas de solubilidade desta proteína em soluções de sais voláteis pela técnica utilizada: os efeitos da concentração salina, da proporção de amônia e da temperatura se tornam pouco significativos perante a já elevada tendência para a agregação desta molécula (Slusky *et al.*, 1992). Além disto, a molécula de insulina (na forma monomérica) apresenta uma complexidade estrutural relativamente menor que a da lisozima (Blundell *et al.*, 1972 e 1976) o que implica em uma variabilidade comparativamente menor de sua estrutura tridimensional e, conseqüentemente, de seu parâmetro Φ com a temperatura.

O aumento da concentração salina provavelmente induz a uma maior formação de hexâmeros de insulina em solução (Kadima, *et al.* 1993) o que,

paradoxalmente, contribui para os valores relativamente baixos de K'_s : a maior ocupação de sítios interfaciais para a formação de dímeros e hexâmeros reduz a área superficial disponível para a desnaturação parcial do monômero, necessária para a agregação da insulina (Sluzky, *et. al.*, 1991, Susanne, *et. al.*, 2006) (ver Tópico 4.4).

A superfície hidrofóbica das paredes do tubo Eppendorf pode, em princípio, fornecer uma matriz para a associação de hexâmeros de insulina, contribuindo ainda mais para os menores valores de solubilidade da insulina em relação à lisozima. É esperado que tal efeito seja muito mais potencializado na insulina – uma molécula que possui os grupos hidrofóbicos mais expostos, apresentando portanto tendência para a agregação na presença de interfaces hidrofóbicas (Slusky *et al.*, 1991) – que para a lisozima – que, como já citado, possui os grupos hidrofóbicos bem distribuídos em sua estrutura superficial e interna, apresentando assim uma menor tendência para a formação de oligômeros (Rosenberg *et al.*, 1996).

4.3.2. Balanço de massa para a precipitação de insulina bovina com sais voláteis.

Assim como foi feito para a lisozima, foi realizado o balanço de massa para a precipitação com sais voláteis da insulina bovina (Figura 4.16). O balanço de massa foi feito para pontos com molalidade de sal volátil iguais a 1,00 e 2,00 mol·kg⁻¹ no tempo de 13,50 horas das curvas a 25 e 15 °C com R_{NC} iguais a 2,00 e 2,50. A completa ressolubilização do precipitado foi alcançada, tanto para estes tempos quanto para os tempos maiores da cinética (dados não mostrados). Obteve-se um erro máximo de 13% e um erro mínimo de 1,6%, com um valor médio dos balanços de 95,3% e uma mediana de 92,5%. Os maiores desvios foram encontrados para a menor concentração de sal (1,00 mol·Kg⁻¹), com um erro máximo de 13%, um erro mínimo de 8,7%, um valor médio de 89,6% e uma mediana de 90%. Já para a concentração de 2,00 mol·kg⁻¹, obteve-se um erro máximo de 6,4%, um erro mínimo de 1,6%, um valor médio de 100,9% e uma mediana de 101,9%.

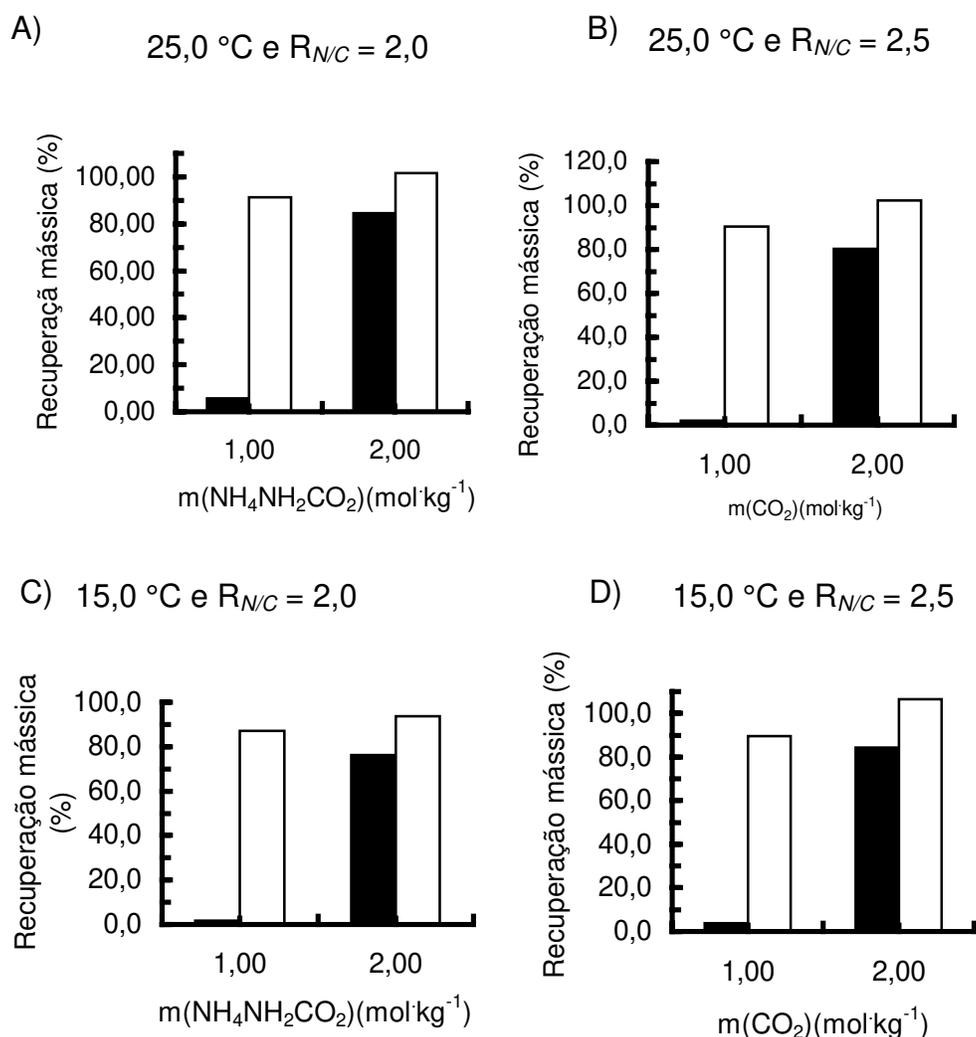


Figura 4.16. Balanço de massa da insulina bovina precipitada com sais voláteis. Concentrações de 1,00 e 2,00 mol·kg⁻¹, tempo de envelhecimento de 13,5 horas e concentração inicial de proteína em solução de 5,00 mg·ml⁻¹. A e B – insulina precipitada a 25°C em solução de $R_{N/C}$ igual a 2,0 e 2,5, respectivamente. C e D – insulina precipitada a 15 °C em solução com $R_{N/C}$ igual 2,0 e 2,5, respectivamente. Dados coletados a partir dos pontos dos ensaios de solubilidade representados na Figura 4.14. ■ - porcentagem de insulina no precipitado; □- porcentagem de insulina total (precipitado e sobrenadante).

Embora para os pontos de menor concentração salina tenham sido alcançadas menores recuperações mássicas, os desvios encontrados no balanço de massa da insulina bovina são da mesma ordem de grandeza que os

encontrados no balanço de massa da lisozima. Isto permite constatar que, de fato, a influência do sal no coeficiente de absorção da proteína não é um empecilho nas medidas de recuperação mássica na fase sobrenadante e precipitado (nas faixas de concentração utilizadas), visto que para a insulina bovina não foi feito um estudo prévio de influência da concentração salina no coeficiente de absorção (como foi feito para a lisozima).

Uma vez que as medidas de recuperação mássica são feitas por via de absorção a 280 nm da fase sobrenadante e do precipitado ressolubilizado em tampão, e que a concentração de sal volátil no precipitado é, em princípio, significativamente menor que a concentração no sobrenadante, é pertinente afirmar, em vista da proximidade dos desvios nos balanços para a lisozima e para a insulina bovina, que esta diferença de concentração do sal nas duas fases não influenciou de forma significativa as medidas de concentração de proteína

4.3.3. Cinética de precipitação e curvas de solubilidade de insulina suína em sais voláteis

As curvas de solubilidade para a insulina suína em sais voláteis (Figura 4.17) também evidenciaram o efeito “salting out”. Embora se observe uma redução da concentração de proteína no sobrenadante já nas primeiras 4 h e a presença de precipitado (principalmente para as amostras de maior supersaturação) seja visível no instante em que o sal é adicionado, a manutenção de um estado de equilíbrio só foi observada a partir de 14 h para a solução a 15,0 °C com R_{NC} igual a 2,0 e a partir de 24 h para as demais soluções. Observa-se também que as variáveis temperatura e razão R_{NC} tiveram uma influência significativa, embora pequena em comparação com a lisozima, na precipitação de insulina suína por sais voláteis. Estes dados podem ser melhor contemplados a partir da análise da Figura 4.18, onde são apresentadas as solubilidades de insulina suína a 15 e 25 °C, com R_{NC} igual a 2,0 e 2,5 expressadas pelo gráfico de Cohn, e da Tabela 4.5, onde são apresentados os respectivos valores de K'_s e de β' .

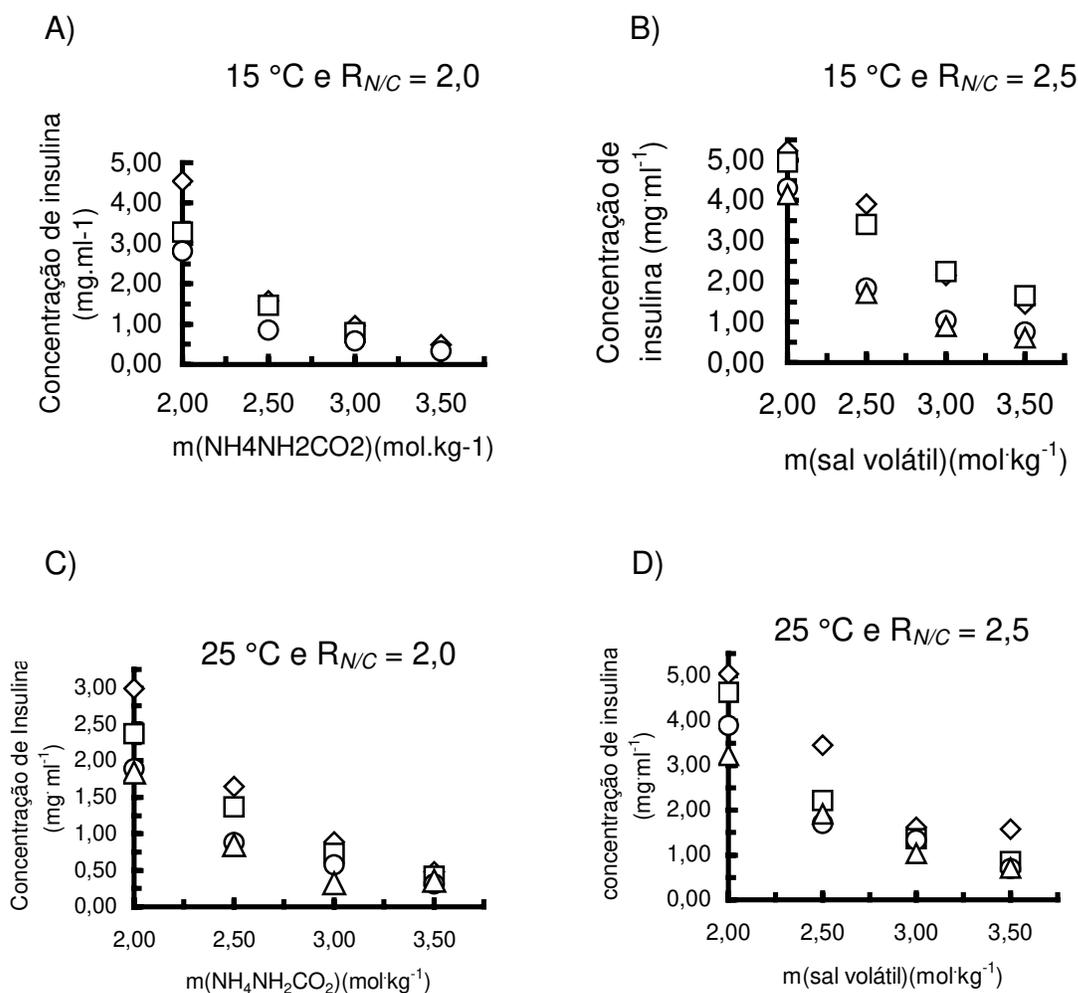


Figura 4.17. Curvas de solubilidade de insulina suína em sal volátil a diferentes valores de $R_{N/C}$, temperatura e tempo de envelhecimento. A e B – 15,0 °C em $R_{N/C}$ 2,0 e 2,5, respectivamente. C e D – 25,0 °C em $R_{N/C}$ 2,0 e 2,5, respectivamente. ◇ tempo igual a 4 h; □ 14 h; ○ 24 h e △ 48 h. Concentração inicial de proteína em solução igual a 5,00 mg·ml⁻¹.

Embora se observe que as curvas de solubilidade (Figuras 4.17 e 4.18) e os respectivos valores de K'_s (Tabela 4.5) se alteram tanto com a temperatura quanto com a razão $R_{N/C}$, só se observou uma diferença estatisticamente relevante (com intervalo de confiança de 95%) quando estes dois parâmetros foram alterados simultânea e sinergicamente (aumento dos dois parâmetros em conjunto, ou diminuição de ambos), sugerindo uma influência pequena da temperatura (na faixa

de 15,0 a 25,0 °C) e do $R_{N/C}$ (entre 2,0 e 2,5) para a precipitação de insulina suína, porém mais significativa que para a insulina bovina.

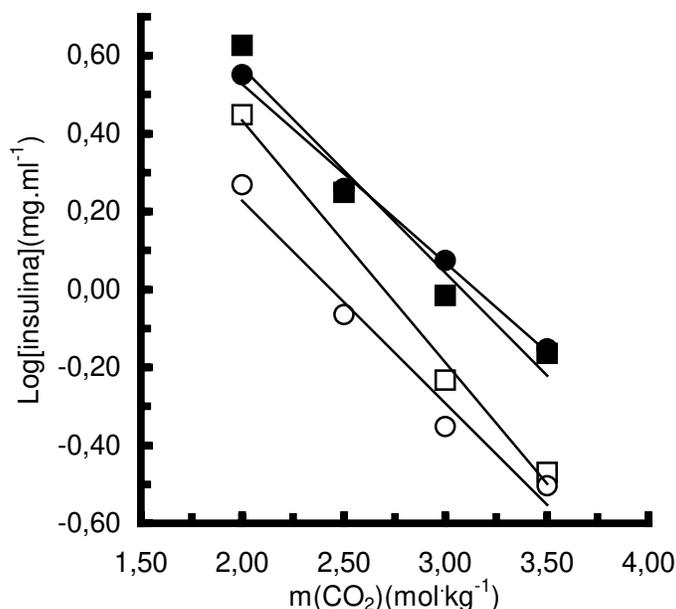


Figura 4.18. Curvas de solubilidade de insulina suína em sais voláteis expressadas segundo a equação de Cohn. Curvas para solubilidades em: ○ 25,0 °C em $R_{N/C}$ igual a 2,0; □ 15,0 °C em $R_{N/C}$ igual a 2,0; ● 25,0 °C em $R_{N/C}$ igual a 2,5; ■ 15,0 °C em $R_{N/C}$ igual a 2,5. Os pontos a 15,0 °C com $R_{N/C}$ são médias dos pontos nos tempos de 14 e 24 h da Figura 4.17.A tratados segundo a equação de Cohn; os demais pontos são médias dos pontos nos tempos de 24 e 48 h das Figuras 4.17.B-D tratados segundo a mesma equação.

Tabela 4.5. Parâmetros β' e K'_s , erros destes parâmetros com intervalo de confiança de 95% e coeficiente de correlação linear (R^2) da equação de Cohn para a insulina suína em sal volátil com $R_{N/C}$ igual a 2,0 e 2,5.

$R_{N/C}$ do sal	Temperatura (°C)	K'_s	Erro	β'	Erro	R^2
2,0	15,0	0,62	± 0,05	1,68	± 0,15	0,9934
	25,0	0,52	± 0,06	1,27	± 0,16	0,9756
2,5	15,0	0,53	± 0,07	1,62	± 0,20	0,9639
	25,0	0,46	± 0,03	1,45	± 0,08	0,9918

O aumento simultâneo da temperatura de 15 para 25 °C e do $R_{N/C}$ de 2,00 para 2,5 implicou em uma redução do K'_s de $0,62 \pm 0,05$ para $0,46 \pm 0,03$. Esta redução do K'_s , relacionada a um decréscimo na eficiência de “salting out” do sal para uma dada proteína, pode ser tanto devida a uma diminuição no valor de Ω com o aumento da temperatura (segundo as equações desenvolvidas no trabalho de Melander e Horvarth (1977)) quanto a um decréscimo da densidade de carga em solução devido ao aumento do $R_{N/C}$.

Pelas equações de Melander e Horvarth (1977), é esperado que o valor de Ω diminua com a temperatura (para um mesmo valor de Φ) diminuindo, em conseqüência, o valor de K'_s . Como mencionado no tópico 4.3.1, a molécula de insulina apresenta uma estrutura terciária pouco complexa, de forma a que se espera uma menor variabilidade de sua estrutura tridimensional e do valor de Φ com a temperatura, ao contrário do que se espera para a lisozima. Além disto, um aumento na temperatura implica, no deslocamento do equilíbrio para a formação de CO_2 e NH_3 gasoso (vide equações 2.3-6), o que ocasiona um decréscimo na concentração de espécies iônicas em solução e uma conseqüente diminuição do efeito “salting out”.

Paralelamente, espera-se que com o aumento da razão $R_{N/C}$, conforme mencionado no tópico 4.2.3, ocorra uma diminuição da concentração de íons carbonato em solução, com conseqüente decréscimo na densidade de cargas, o que faz em princípio com que a capacidade de induzir o “salting out” diminua.

Os valores de solubilidade para a insulina suína foram maiores que os valores para a insulina bovina, e este fenômeno parece estar mais relacionado ao parâmetro β' , indicando maiores solubilidades na ausência do efeito “salting out”. Isto está em concordância com as descrições de Schlichtkrull (1956) que encontrou maiores supersaturações com conseqüentes menores solubilidades para a insulina bovina em relação à suína (vide tópico 2.4.2). Entretanto, os valores de K'_s sugerem um maior efeito de “salting out” induzido pelo sal volátil para a insulina suína que para a insulina bovina, embora esta diferença só se torne estatisticamente significativa em $R_{N/C}$ igual a 2,0 e a 15,0 °C. As curvas de

solubilidade da insulina suína apresentaram valores de K'_s próximos aos valores das curvas com maior supersaturação para a lisozima (20-25°C) tanto em R_{NC} igual a 2,0 quanto igual a 2,5; diferente da insulina bovina que havia apresentado valores próximos aos das curvas com menor supersaturação (5-15 °C) para esta mesma molécula.

Os dados também sugerem uma solubilidade retrógrada para a insulina suína na faixa de temperaturas estudadas. Bernardo *et al.* (2005) já haviam observado um comportamento de solubilidade retrógrada para a insulina suína em solução de acetato de sódio 0,1 M pH 10,0 com 7% de cloreto de sódio (m/v).

Nota-se, também para a insulina suína, valores de solubilidade significativamente menores que os da lisozima, e novamente esta diferença parece estar mais relacionada com os valores de β' que com os de K'_s .

As diferenças nos valores dos parâmetros β' e K'_s das curvas de solubilidade das insulinas bovina e suína em soluções de sais voláteis, bem como no comportamento das curvas de solubilidade destas duas proteínas em relação à temperatura e à razão R_{NC} são uma constatação interessante. Aparentemente, a substituição de dois aminoácidos é suficiente para uma alteração significativa no comportamento de “salting out” de uma dada proteína. De fato, a insulina suína difere da bovina somente pela substituição de um resíduo de alanina por uma treonina e de uma valina por uma isoleucina nas posições 8 e 10 da cadeia A, respectivamente (Murray *et al.*, 1993). Estes quatro resíduos são aminoácidos hidrofóbicos, possuindo índices de hidropatia consideráveis, embora distintos entre si. Esta distinção é suficiente para diferir significativamente os índices médios de hidropatia (GRAVY) destas duas moléculas (tópico 2.4.2) e distinguir seus comportamentos de solubilidade e “salting out”, apesar da identidade dos demais aminoácidos e das estruturas tridimensionais semelhantes.

4.3.4. Balanço de massa para a precipitação de insulina suína com sais voláteis

O balanço de massa foi realizado para a precipitação de insulina suína nas molalidades de sal volátil de 2,00, 2,50, 3,00 e 3,50 mol·kg⁻¹ e concentração inicial de insulina de 5,00 mg·ml⁻¹. Assim como para a insulina bovina, o balanço foi feito para a precipitação com carbamato de amônio e com sal volátil de R_{NC} igual a 2,5 e para as temperaturas de precipitação de 25,0 e 15,0 °C, respectivamente. O tempo de envelhecimento foi de 24 h, tempo em que o equilíbrio é atingido para todas as condições de temperatura e R_{NC} acima citadas. O desvio máximo obtido foi de 9,1% e o mínimo de 0,4%. O valor médio de recuperação mássica foi de 98,5% e a mediana foi de 98,0%. Obteve-se, também para a insulina suína, a completa ressolubilização do precipitado mesmo após um tempo de precipitação de 48 h (dados não apresentados).

Os desvios relativamente baixos nos balanços de massa para as precipitações de insulina suína, novamente, permitem a constatação da baixa influência do sal nas medidas de recuperação mássica por absorbância a 280 nm (ver tópico 4.3.2).

Em conjunto, os balanços de massa para a lisozima, insulina bovina e insulina suína apresentaram bons valores de recuperação mássica e desvios relativamente baixos. Watanabe *et al* (2004) também alcançou bons valores de recuperação mássica através das medidas de absorbância a 280 nm, tanto quanto com a liofilização seguida de pesagem do sobrenadante e do precipitado. Estes resultados permitem inferir que a medida de concentração do sobrenadante por absorbância a 280 nm é um método adequado para a determinação das curvas de solubilidade de proteínas com sais voláteis.

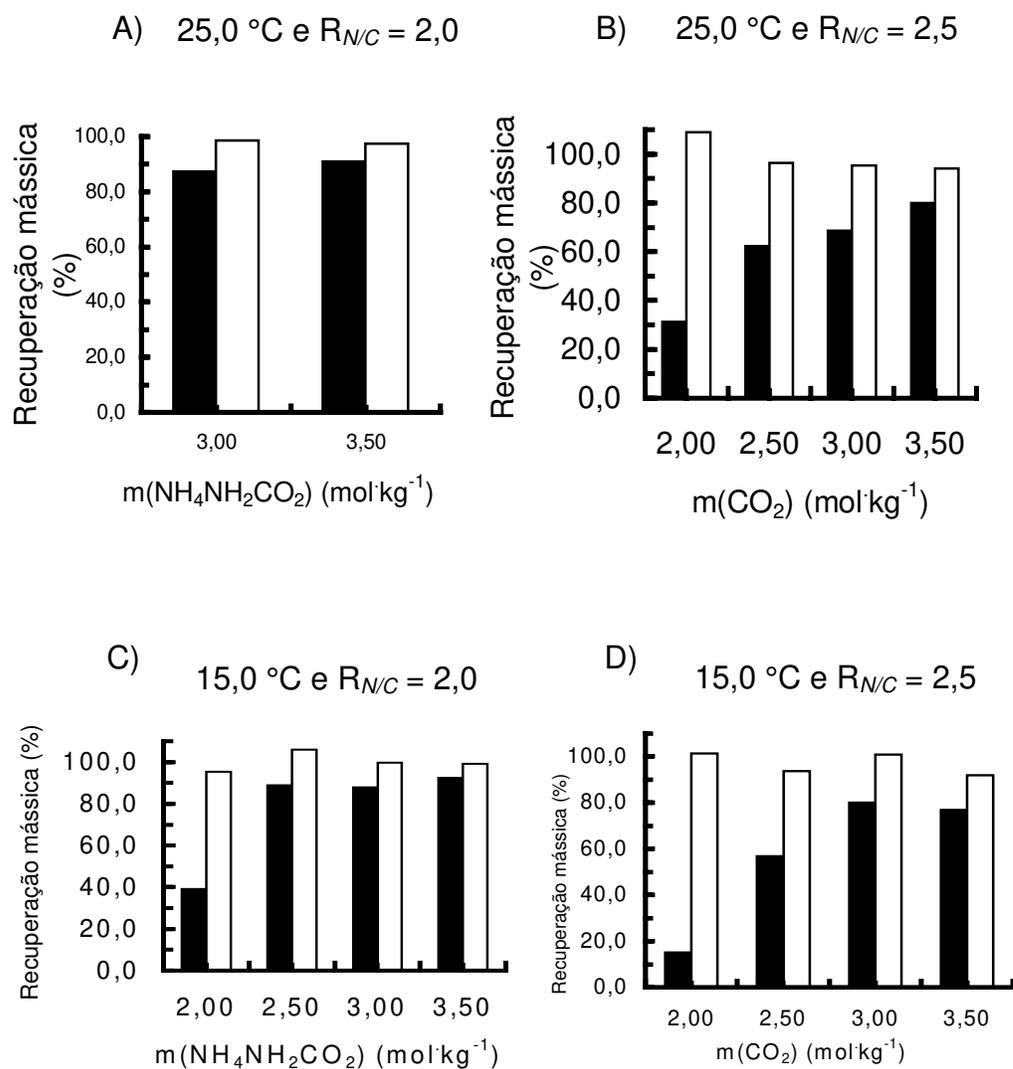


Figura 4.19. Balanço de massa da precipitação de insulina suína com sais voláteis. Tempo de precipitação de 24 h; concentração inicial de proteína em solução de $5,00 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. A e B – temperatura de 25,0 °C com $R_{N/C}$ igual a 2,0 e 2,5, respectivamente. C e D – temperatura de 15,0 °C com $R_{N/C}$ igual a 2,0 e 2,5, respectivamente. ■ - Recuperação mássica na fase precipitado; □ - recuperação mássica total na fase sobrenadante e fase precipitado.

4.4. AVALIAÇÃO POR DICROÍSMO CIRCULAR DE MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS EM INSULINA BOVINA CAUSADAS PELA PRECIPITAÇÃO COM SAL VOLÁTIL

Nos estudos de Watanabe *et al.* (2004) foi verificada uma perda de 30% na atividade enzimática da tripsina suína após a precipitação com o carbamato de amônio seguida da retirada dos eletrólitos voláteis da fase precipitado por secagem a vácuo e ressolubilização da fase precipitado. Ensaios de SDS-PAGE permitiram concluir que esta perda de atividade não estava associada, aparentemente, a uma possível autólise da tripsina, estando mais provavelmente associada a uma certa desnaturação desta proteína decorrente do processo. No presente trabalho, a não ressolubilização do precipitado de lisozima, após a decorrência do tempo de equilíbrio (48 h), em solução Tris – HCl 0,01 M pH 9,8 (a mesma solução em que esta proteína havia sido previamente solubilizada antes dos ensaios de precipitação) é outro indício de mudanças conformacionais na proteína pós-precipitação com sais voláteis.

Diante destes indícios de um efeito desnaturante do processo de precipitação com eletrólitos voláteis, optou-se por realizar um estudo mais refinado de modificação estrutural, utilizando-se, para tal, a técnica de dicróismo circular. Como citado no tópico 3.2.11, escolheu-se a insulina bovina para este estudo, por razões de disponibilidade, pureza, facilidade de ressolubilização após a precipitação (constatado por nossos dados experimentais) e por possuir uma estrutura secundária relativamente simples, composta basicamente de α - hélices e “turns”, possuindo, portanto, um espectro de CD facilmente interpretável (Murali e Jayakumar, 2005). Além disto, a literatura associa a alta tendência da insulina em oligomerizar em sistemas onde o caráter hidrofóbico é intensificado a uma maior exposição de resíduos hidrofóbicos e a uma perda na estrutura secundária da proteína nestes sistemas (Sluzky, *et al.*, 1992; Mollmann *et al.*, 2006).

Percebe-se que há uma diferença significativa nos espectros da insulina precipitada quando comparada com uma solução de insulina controle (dissolvida em mesmo tampão e liofilizada, mas não precipitada) (Figura 4.20).

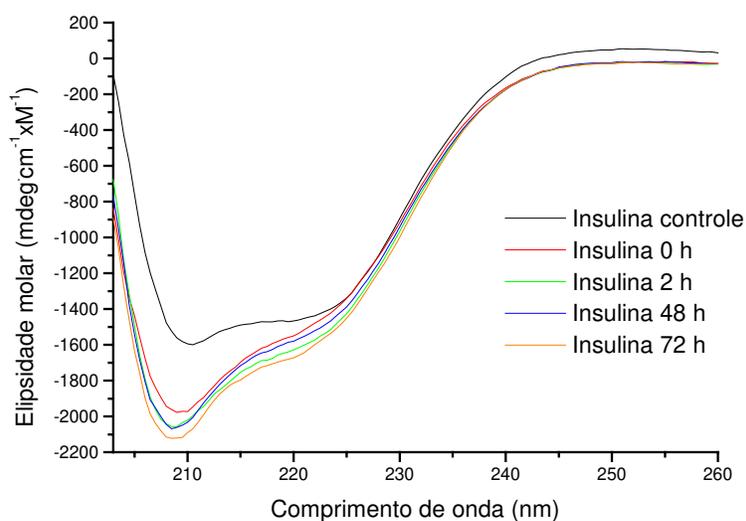


Figura 4.20. Espectros de CD no ultravioleta distante de amostras de insulina precipitadas com $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$. Concentração de sal, $4,0 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$; temperatura, 25°C . Insulina controle – insulina “envelhecida” em solução de NaOH pH 9,0 com NaCl 0,01 N a 25°C por 72 h; secada em sistema “speed-vack” e ressolubilizada em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 9,00. Insulina 0-72 h - Insulina precipitada com o sal em diferentes tempos de envelhecimento.

A amostra de insulina controle apresenta um espectro dicróico semelhante aos demais espectros encontrados na literatura para esta molécula (Chen, 1974; Mollmann, 2006), característico de uma proteína rica em α -hélices, que é a principal estrutura secundária da molécula de insulina (Blundell *et al.*, 1972). Isto mostra que o pH alcalino da solução mãe, os elevados tempos de envelhecimento a 25°C e o processo de liofilização não contribuíram significativamente para a alteração da estrutura secundária da proteína, podendo as mudanças observadas nos demais espectros dicróicos serem atribuídas aos efeitos dos eletrólitos voláteis em solução.

A banda próxima a 222 nm é a transição dos orbitais $n \rightarrow \pi^*$, enquanto que a banda próxima a 208 nm é o pico de excitação para a transição paralela dos orbitais $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ (ver Anexo A2). Embora a alta concentração salina em solução (devido ao Tris utilizado e a resquícios de sal volátil não eliminados na liofilização), não tenha tornado possível estender o espectro para comprimentos de onda menores que 205 nm, de forma a se visualizar a banda maior de elipcidade positiva da transição perpendicular $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ (próxima a 190 nm), foram obtidas

informações satisfatórias com a análise das duas bandas de elipcidade negativa. De fato, o ligeiro deslocamento observado para estas duas bandas para comprimentos de onda menores e, sobretudo, o aumento da intensidade relativa entre a banda de transição paralela $\pi_o \rightarrow \pi^*$ e a banda de transição $n \rightarrow \pi^*$ após a precipitação e ressolubilização são fortes indícios de “distorções” nas α -hélices da proteína e de aumento no teor de estruturas desordenadas (Chen, 1974). A razão entre as elipcidades molares a 222 nm (transição $n \rightarrow \pi^*$) e a 208 nm ($\pi_o \rightarrow \pi^*$) fornece uma medida indireta do teor de α -hélices para proteínas: a princípio, quanto mais próximo de 1 seja o valor da razão entre as elipcidades acima mencionadas, mais próximo de 100% é o teor de α -hélices na estrutura secundária (embora haja exceções e embora não se estabeleça uma proporção numérica direta entre o valor desta razão e o teor de α -hélices para toda e qualquer proteína). A Tabela 4.19 contém os valores das elipcidades molares para as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi_o \rightarrow \pi^*$ nos espectros dicróicos da Figura 4.20 e a razão entre estas elipcidades. Nota-se um decréscimo significativo do valor desta razão para as proteínas precipitadas com sal volátil em relação à insulina controle, evidenciando o decréscimo de estrutura secundária pós-precipitação.

Embora seja visualizado o aumento da elipcidade negativa a 208 nm e o conseqüente decréscimo da razão entre as bandas de transição $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (característico para a perda de α – hélices e aumento de estruturas desordenadas), não é visualizada a diminuição da elipcidade negativa a 222 nm que, geralmente, acompanha este tipo de transição (Mollmann *et. al.*, 2006). Ao contrário, é visualizado um ligeiro aumento da elipcidade negativa a 222 nm com a precipitação (de -1,44 na insulina controle para -1,60 no tempo de envelhecimento de 72 h). A interpretação deste fenômeno pode ser facilitada comparando-se com os dados de dicroísmo circular de Mollmann *et. al.*, (2006) para a insulina mutante Asp^{B28}. Esta mutação impede a dimerização da molécula de insulina, o que é visualizado em seu espectro dicróico por uma ligeira diminuição na elipcidade negativa a 222 nm. Assim, o ligeiro aumento desta elipcidade nos espectros de insulina precipitada por carbamato de amônio, apesar das perdas de estrutura secundária denunciadas pelo forte aumento da elipcidade negativa a 208 nm, é

um indício do aumento do teor de dímeros e hexâmeros em solução, devido aos efeitos dos eletrólitos voláteis. Isto estaria em concordância com o fato de que, após a retirada do sal por liofilização, o precipitado de insulina é rapidamente ressolubilizado em solução Tris – HCl 0,01 M pH 9,8 (enquanto que a cinética de solubilização da insulina nesta mesma solução antes dos ensaios de precipitação é lenta, necessitando ser efetuada por etapas): nos oligômeros de insulina, os sítios hidrofóbicos estão melhor “escondidos” nas interfaces de dimerização, facilitando sua solubilização em soluções aquosas.

Tabela 4.19. Parâmetros do espectro de CD para amostras de insulina precipitadas com $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{CO}_2$ 4 mol·kg⁻¹ a 25 °C com diferentes tempos de envelhecimento. $n \rightarrow \pi^*$: elipicidade molar a 208 nm, caracterizando a transição dos orbitais n para π^* ; $\pi \rightarrow \pi^*$: elipicidade molar a 222 nm, caracterizando a transição paralela dos orbitais π para π^* .

Amostras	[θ] (x 10 ⁻⁴ mdeg·cm ⁻² ·dmol)		$\frac{n \rightarrow \pi^*}{\pi \rightarrow \pi^*}$
	$n \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$	
Controle	-1,44	-1,48	0,97
0 h	-1,48	-1,94	0,76
2 h	-1,57	-2,04	0,77
48 h	-1,52	-2,04	0,74
72 h	-1,60	-2,11	0,76

Padrões de modificações estruturais semelhantes (com perda de estrutura secundária e aumento de estrutura desordenada) foram observados por Mollmann *et. al* (2006) para a insulina humana após a adsorção em superfícies hidrofóbicas (partículas de Teflon) e por Lenz, *et. al* (1995) para a insulina suína após a adsorção em interface de micelas reversas lipídicas. Isto sugere que o aparente decréscimo na estrutura secundária da proteína denunciado pelos espectros dicróicos acima é um fator comum para a insulina em sistemas onde as interações hidrofóbicas são acentuadas.

A maior modificação é observada entre a amostra de insulina controle e as amostras precipitadas com carbamato de amônio, sendo mínimas as modificações dentre as amostras com diferentes tempos de envelhecimento. Pode-se inferir daí que embora a precipitação com carbamato de amônio tenha apresentado efeitos de desnaturação parcial para a insulina bovina, este efeito não foi intensificado significativamente com o tempo de envelhecimento, ocorrendo as principais mudanças logo no instante da precipitação inicial.

Como foi visto nos ensaios de precipitação de insulina (tópico 4.3) esta molécula possui uma cinética de precipitação significativamente rápida (no caso da insulina bovina, verificou-se a manutenção do estado de equilíbrio logo a partir dos primeiros 30 minutos após a adição do sal). Assim, justifica-se que as principais mudanças conformacionais nas moléculas na fase precipitado sejam verificadas logo nos primeiros instantes da precipitação. Pode-se inferir que possíveis mudanças decorrentes das trocas de moléculas, por difusão, entre a fase precipitado e sobrenadante sejam mínimas.

Considerando-se estes dados juntamente com o fato de que a lisozima, com uma cinética de precipitação lenta, apresentou dificuldades em sua ressolubilização após o tempo de equilíbrio, tendo sido ressolubilizada, no entanto, quando submetida a um tempo de envelhecimento menor (3 h), pode-se especular que o tempo de indução e a cinética de precipitação sejam fatores limitantes no que se refere à preservação da estrutura nativa da proteína após a precipitação com o carbamato de amônio. A princípio, assumindo-se que as trocas difusivas entre as fases precipitado e sobrenadante após o equilíbrio sejam mínimas, a decorrência de um maior intervalo de tempo entre a adição do sal e a precipitação, implica em uma maior exposição da proteína aos possíveis efeitos desnaturantes do sal. Um fenômeno semelhante foi verificado por Mollmann *et. al* (2006) no estudo de alterações estruturais de insulina após adsorção em interface hidrofóbica (partículas de Teflon): para concentrações de insulina abaixo da supersaturação do sistema (quando as cinéticas de adsorção eram mais lentas) observavam-se maiores perdas na estrutura secundária da proteína (conforme

vislumbrado por espectros de CD). Isto foi associado a um aumento no tempo disponível para a molécula em solução se desenovelar e otimizar as interações com a superfície hidrofóbica.

Uma constatação mais precisa acerca deste comportamento só será possível, em trabalhos futuros, após a ressolubilização e realização de espectros de CD com o precipitado da lisozima, bem como a realização de espectros com a fase sobrenadante ou com proteínas em concentrações abaixo de sua supersaturação. Podem, também, serem realizados estudos mais refinados de verificação de estado de oligomerização e de desenovelamento de proteínas como, por exemplo: Fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estudos de calorimetria diferencial de varredura (DSC).

O quanto a modificação estrutural observada no espectro de CD afeta a atividade biológica da insulina é difícil de se afirmar. A quantificação prática deste efeito para a insulina só é possível através de ensaios biológicos. Faz-se necessária, também, a verificação de possíveis efeitos desnaturantes de sais convencionais (como o persulfato de amônio, por exemplo) e da técnica mais comumente utilizada industrialmente para a precipitação de insulina (precipitação isoelétrica), de forma a se constatar o quão significativas são as modificações conformacionais aqui observadas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. CONCLUSÕES

A primeira conclusão resultante deste trabalho é a de que a precipitação de proteínas por “salting out” com eletrólitos voláteis $\text{CO}_2 - \text{NH}_3$, conforme realizado por Watanabe (2004) para a tripsina suína, é extensível a outras proteínas. Até então não haviam relatos de qualquer outra proteína precipitada por este sistema que não a tripsina suína. Um avanço neste trabalho foi a realização de estudos de precipitação com proteínas com um maior grau de pureza: A tripsina suína utilizada por Watanabe (2004) apresentava um grau de pureza inferior a 90% enquanto que as proteínas utilizadas neste estudo apresentam graus de pureza maiores ou iguais a 90%. Além disto, neste trabalho foi verificada a influência da variável temperatura, que não havia sido verificada no trabalho acima mencionado.

Novamente foi verificada a relevância do parâmetro R_{NC} neste tipo de sistema: assim como observado por Watanabe (2004) para a tripsina suína, o aumento da proporção de amônia no sistema (aumento da razão R_{NC}) implicou em menores eficiências de “salting-out”, com menores valores do parâmetro K'_s . Especula – se que este fenômeno seja devido a uma diminuição na densidade de cargas em solução com o aumento do R_{NC} .

A lisozima apresentou uma cinética de precipitação lenta, com um tempo de indução próximo a 10 h para as amostras com concentrações de carbamato próximas a 5 molal, e a decorrência de um tempo de 48 h para que se alcançasse o equilíbrio; o que parece estar em concordância com a literatura que cita uma limitação na cinética de crescimento de cristais de lisozima, devido a uma baixa difusão da proteína na interface entre o seio do líquido e a superfície do cristal. Já as insulinas bovina e suína não apresentaram um tempo de indução mensurável pela técnica utilizada e apresentaram cinéticas de precipitação notoriamente

rápidas, provavelmente ,devido às altas supersaturações e à forte tendência da insulina para se oligomerizar.

Tanto para a lisozima quanto para a insulina suína, foi observado o comportamento de solubilidade retrógrada (queda da solubilidade com o aumento da temperatura).

A lisozima mostrou uma transição em seu comportamento de “salting-out” em temperaturas próximas a 20 °C. A literatura também cita mudanças na solubilidade e no hábito cristalino desta proteína em temperaturas próximas a 20 °C quando em soluções salinas relativamente concentradas, estando estas mudanças provavelmente relacionadas a modificações conformacionais em sua estrutura tridimensional em temperaturas próximas a esta. As mudanças nos perfis das curvas de solubilidade da lisozima em temperaturas maiores ou iguais a 20 °C sugerem uma maior exposição dos resíduos hidrofóbicos desta proteína nesta faixa de temperaturas. Já as insulinas, com forte tendência em formar oligômeros, apresentaram solubilidades muito baixas para as quais os parâmetros temperatura e proporção de amônia apresentaram influências pouco significativas (insulina suína) ou praticamente desprezíveis (insulina bovina).

Apesar de diferirem apenas em dois resíduos de aminoácidos as insulinas bovina e suína apresentaram diferenças pequenas, mas significativas, em seus comportamentos de solubilidade em sistemas com eletrólitos voláteis $\text{CO}_2 - \text{NH}_3$. Este fenômeno é de interesse em Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB), pois sugere que é possível, em princípio, a separação de duas moléculas com massas moleculares muito próximas e propriedades físico-químicas também muito próximas em um processo de precipitação com o uso de sais voláteis.

Foram observados indícios de efeitos desnaturantes do processo de precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis, em concordância com as perdas na atividade da tripsina suína observadas por Watanabe (2004): O precipitado de lisozima, após a decorrência do tempo de equilíbrio de 48 h, não se ressolubilizou na solução de Tris – HCl 0,01 M, pH 9,8, na qual havia sido facilmente solubilizada previamente. Ensaio de dicroísmo circular (CD) com a insulina bovina mostraram

perdas na estrutura secundária da proteína decorrentes da precipitação, sendo estas alterações estruturais semelhantes às observadas para a insulina em outros sistemas onde as interações hidrofóbicas e a oligomerização são instigados. As alterações observadas nos espectros de CD não se intensificaram significativamente com o tempo de envelhecimento após a precipitação (no intervalo de 0 a 72 horas), mostrando que as principais mudanças na estrutura secundária da insulina bovina ocorreram no momento da precipitação, sendo mínimas as mudanças decorrentes da troca de moléculas por difusão entre o precipitado e o sobrenadante após o equilíbrio. Em conjunto, os dados relacionados à ressolubilização da lisozima e aos espectros de CD da insulina sugerem que proteínas que se precipitam com cinéticas mais rápidas podem sofrer menores perdas estruturais que aquelas com cinéticas mais lentas. Se este fenômeno for regra geral, o controle da supersaturação do sistema e, conseqüentemente, da cinética de precipitação, pode ser um fator limitante para a recuperação do produto ativo.

5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se a partir dos resultados apresentados nesta dissertação:

- a) Realizar os mesmos ensaios para outras proteínas com variadas características físico-químicas (diferentes medidas de hidrofobicidade, massa molecular, potencial zeta, momento dipolo, etc) de forma a que se possa, no futuro, elaborar uma modelagem mais refinada sobre o efeito do sal volátil no “salting-out” de diferentes proteínas. Para se modelar melhor os efeitos de “salting-out” de eletrólitos voláteis com proteínas de diferentes áreas superficiais hidrofóbicas (Φ), pode-se realizar estudos sistemáticos comparando-se os valores de K'_s com medidas indiretas da hidrofobicidade superficial como, por exemplo, retenção em coluna hidrofóbica.
- b) Realizar estudos em outras temperaturas e em outros $R_{N/C}$, a fim de se mensurar com maior precisão o efeito destes parâmetros na precipitação de proteínas.

- c) Através da comparação dos gráficos de Cohn, elaborar e executar experimentos de precipitação fracionada de proteínas com sais voláteis, como estratégia de RPB.
- d) Realizar estudos das características morfológicas e cristalográficas do precipitado das proteínas em diferentes condições, sobretudo, para o precipitado da lisozima na faixa específica de temperaturas em que ocorre a mudança no comportamento de “salting out”, e que se especula tratar - se de uma transição de hábito cristalino. Realizar também estudos de cristalização em “gota suspensa”, de forma a se controlar melhor as características dos cristais e se estudar o potencial do uso de eletrólitos voláteis $\text{CO}_2 - \text{NH}_3$ para estudos de cristalografia de proteínas.
- e) Realizar estudos detalhados de dicroísmo circular, juntamente a outras técnicas que permitam verificar a estrutura, estado de oligomerização e estabilidade estrutural de proteínas (estudos com fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS), calorimetria diferencial de varredura (DSC), dentre outros) para a lisozima e para a insulina, bem como outras proteínas a serem precipitadas com sais voláteis, quando precipitadas em diferentes temperaturas e $R_{N/C}$. Estes estudos podem ser realizados tanto para o precipitado ressolubilizado, quanto para o sobrenadante e para soluções contendo proteína e sal em concentrações abaixo da supersaturação, de forma a se elucidar melhor os efeitos dos eletrólitos voláteis e da precipitação na estrutura e na estabilidade estrutural protéica.
- f) Realizar estudos de atividade biológica das proteínas recuperadas e comparar com os estudos estruturais citados em “e”.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arakawa, T., Timasheff, S.N., Theory of Protein Solubility, *Methods in Enzymology*, v. 114, p. 49 -113, 1985.
2. Atha, D.H., Ingham, K.C., Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols – analysis in terms of excluded volume, *Journal of Biological Chemistry* v. 256, p. 2108 – 2117, 1981.
3. BASF A. G., *Ammonium carbonate – Technical data sheet*, Ludwigshafen, 1998.
4. BASF A. G., *Ammonium carbonate – Technical data sheet*, Ludwigshafen, 1999.
5. BASF A. G., *Ammonium carbamate – Technical data Sheet*, Ludwigshafen, 2002.
6. Bernardo, A., *Determinação de Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos para a Cristalização de Proteínas A Partir da Dissolução e do Tempo de Indução*, Campinas - SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002 (Dissertação de Mestrado);
7. Bernardo, A., Calmanovici, C. E., Miranda, E. A., Induction Time as an Instrument to Enhance Comprehension of Protein Crystallization, *Crystal Growth & Design*, v. 4, p. 799-805, 2004.
8. Bernardo, A., Calmanovici, C.E., Miranda, E. A., Observance of Polymorphic Behaviour During Dissolution of Insulin And Lysozyme, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, 331-339, 2005.

9. Blundell, T. L., Dodson, G. G., Hodgkin, D. M., Mercola, D. *Advances in Protein Chemistry*. New York: Academic Press, 1972.
10. Blundell, T.L., Johnson, L.N., *Protein Crystallography*, New York: Academic Press, 1976.
11. Boistelle, R., Astier, J. P., Crystallization mechanisms in solution, *Journal of Crystal Growth*, v. 90, p. 14-30, 1988.
12. Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, M., Dunnill, P., Protein Purification: The Right Step at The Right Time, *Biotechnology*, v. 4, p. 954-958, 1986
13. Brooks, L. A., Audreth L. F., Ammonium Carbamate, *Inorganic Syntheses*, v. 2, p. 85-86, 1946.
14. Bull, H.B., Breese, K., Protein solubility and the lyotropic series of ions *Archives of Biochemistry And Biophysics*, v. 202, p. 116 - 120, 1980.
15. Chayen, N.E., Saridakis, E., Is lysozyme really the ideal model protein ?, *Journal of Crystal Growth*, v. 232, p. 262-264, 2001.
16. Chen, Y. H., Yang, J. T., Chaus, K. H., Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry*, v. 13, p. 3350 – 3359, 1974.
17. Christopher, G.K., Phillips, A. G., Gray, R. J., Temperature-dependent solubility of selected proteins, *Journal of Crystal Growth*, v. 122, p. 66-70, 1992.
18. Claudel, B., Brousse, E., Shehadeh, G., Novel Thermodynamic and Kinetic Investigation of Ammonim Carbamate Decomposition into Urea and Water, *Thermochimica Acta*, v. 102, p. 357-371, 1986.
19. Cohn, EJ, The Physical Chemistry of the Proteins, *Physiological Reviews*, v. 5, p. 349-428, 1925.
20. Costa, CAM, *Incorporação de Insulina em Lipossomas para Administração por Via Pulmonar*, Campinas – SP: Universidade Estadual de Campinas (qualificação de doutorado), 2002.

21. Curtis, R.A., Steinbrecher, C., Heinemann, M., Blanch, H. W., Prausnitz, Hydrophobic forces between protein molecules in aqueous solutions of concentrated electrolyte, *Biophysical Chemistry*, v. 98, p. 249-265, 2002.
22. Deutscher, M.P. (ed.), *Methods in Enzimology*, vol. 182, San Diego: Academic Press, p. 285-306, 1990.
23. Du W. , Zong M. H., Guo Y., Liu D. H., Lipase-catalysed Enantioselective Ammonolysis of Phenylglycine Methyl Ester in Organic Solvent, *Biotechnology And Applied Biochemistry*, v. 38, p. 107-110, 2003.
24. Edwards, T.J., Newman, J., Prausnitz, J. M., Thermodynamics of Aqueous Solutions Containing Volatile Weak Electrolytes, *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v. 21, p. 248-259, 1975.
25. Edwards, T. J., Maurer, G., Newman, J., Prausnitz, J. M., Vapor-Liquid Equilibria in Multicomponent Aqueous Solutions of Volatile Weak Electrolytes, *American Institute of Chemical Engineers Journal*, v. 24, p. 966- 976, 1978.
26. Gerhartz, W., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th ed., v. A2, Germany, p. 261-265, 1985.
27. Göppert, U., Maurer, G., Vapor-Liquid Equilibria in Aqueous Solutions of Ammonia and Carbon Dioxide at temperatures between 333 and 393 K and Pressures up to 7 Mpa, *Fluid Phase Equilibria*, v. 41, p. 153-185, 1988.
28. Harris, DA, Bashford, CL, *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry – a practical approach*, 1st ed., IRL Press. Oxford – Washington – DC, EUA, p. 6 – 7, 1987.
29. Hoare, M., Protein Precipitation and Precipitate Ageing – Part I: Salting-Out and Ageing of Casein Precipitates, *Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, v. 60, p. 79-87, 1982.
30. Hofland , G. W., de Rijke, R Thiering, R., van der Wielen, L. A. M., Witkamp, G.J., Isoelectric Precipitation of Soybean Protein using Carbon Dioxide as a Volatile Acid, *Journal of Chromatograph B*, v. 743, p. 357-368, 2000.

31. Howard, S. B., Twigg, P. J., Baird, J. K., Meehan, E. J., The solubility of hen egg-white lysozyme, *Journal of Crystal Growth*, v. 90, p. 94 -104, 1988.
32. Juckes, I.R.M., Russel B., Polson A., Fractionation of proteins and viruses with polyethylene glycol, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 229, p. 535 (1971).
33. Jollès, P., Berthou, J., High Temperature Crystallization of Lysozyme: An Example of Phase Transition, *Federation of European Biochemical Societies*, v. 23, p. 21-23, 1978.
34. 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*, v. 33, p. 1643 -1657, 1993.
35. Kam, Z., Shore, H. B., Feher, G., On the crystallization of proteins, *Journal of Molecular Biology*, v. 123, p. 539-555, 1978.
36. King, M.V., Magdoff, B.S., Adelman, M.B., Harker, D., Crystalline forms of bovine pancreatic ribonuclease – techniques of preparation, unit cells, and space groups, *Acta Crystallographica* v. 9, p. 460-465 (1956).
37. Kurz, F. Rumpf, B., Maurer, G., Vapor-Liquid-Solid Equilibria in the System $\text{NH}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ from around 310 to 410 K: New Experimental Data and Modeling, *Fluid Phase Equilibrium*, v. 104, p. 261-275, 1995.
38. Ladisch, M.R., *Bioseparations Engineering*, New York, John Wiley & Sons, 116 – 151, 2001.
39. Lenz, V.J., Federwisch, M., Gattenr, H., Brandenburg, D., Hoecker, H., Hassiepen, U., Wollmer, A., Structure and rotational dynamics of fluorescently labeled insulin in aqueous solution and at the amphiphile – water interface of reversed micelles. *Biochemistry* v. 34, p. 6130 – 6141, 1995.
40. Likhoshesterov L.M., Novikova O. S., Shibaev V. N., New Efficient Synthesis of Beta-Glucosylamines of Mono and Disaccharides with the Use of Ammonium Carbamate, *Dokl. Chem.*, v. 383, p. 89 - 92, 2002.

41. Maia L, Mira L, Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase: A Simple Procedure for the Simultaneous Purification from Rat Liver, *Archives of Biochemistry And Biophysics*, v. 400, p. 48-53, 2002.
42. *Martindale: the extra pharmacopoeia*, edited by James E.F. Reynolds, Pharmaceutical Press, London, 1993.
43. McGregor, W.C., Large Scale Isolation and Purification of Proteins from Recombinant *E. coli*, *Annals of the New York Academy of Science*, v. 413, p. 231, 1983.
44. Melander, W.R., Horváth, C., Salt Effects on Hydrophobic Interactions in Precipitation and Chromatography of Proteins: an Interpretation of the Lyotropic Series, *Archives Biochemistry and Biophysics*, v. 183, p. 200-215, 1977.
45. Mollmann, S.H., Jorgensen, L., Burkinsky, J. T., Elofsson, U., Norde, W., Frokjaer, S., Interfacial adsorption of insulin conformational changes and reversibility of adsorption, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 27, p. 194-204, 2006.
46. Moure F, Rendueles M, Dias M, Coupling Process for Plasma Protein Fractionation using Ethanol Precipitation and Ion Exchange Chromatography, *Meat Science*, v. 64, p. 391-398, 2003.
47. Murali, J, Jayakumar, R, Spectroscopic studies on native and protofibrillar insulin, *Journal of Structural Biology*, v. 150, p. 180 – 190, 2005.
48. Murray, R. K., Granner, D. K, Mayes, P. A., e Rodwell, V. W., *Harper's Biochemistry*, Appleton e Lange, 23^a Edição, 1993.
49. Nair P.S., Robinson W.E., Purification and Characterization of a Histidine-Rich Glycoprotein that Binds Cadmium from the Blood Plasma of the Bivalve *Mytilus edulis*, *Archives Biochemistry and Biophysics*, v. 366, p. 8-14, 1999.
50. Narayanan, S.R., Preparative Affinity Chromatography of Proteins, *Journal of Chromatograph*, v. 658, p. 237-258, 1994.

51. Ozturk-Urek R, Tarhan L, Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from Chicken Liver, *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 128, p. 205-212, 2001.
52. Pittz, E. P., Timasheff, S.N., Interaction of ribonuclease-A with aqueous 2 - methyl – 2,4 – pentanediol at ph 5,8, *Biochemistry*, v. 17, p. 615 - 623, 1978.
53. Polson, A., Potgier, G.M., Largier, J.F., Joubert, F.J., Mears G. E. F., Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight, *Biochimica et Biophysica. Acta*, v. 82, p. 463, 1964.
54. Prausnitz, J. M., Lichtenthaler, R. N., Azevedo, E. G., *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*, 3rd ed., New Jersey, Prentice Hall, 1999.
55. 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*, v. 232, p. 301-307, 2001.
56. 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*, v. 168, p. 1-27, 1996.
57. Rumpf, G., Weyrich, F., Maurer, G., Enthalp Changes upon Partial Evaporation of Aqueous Solutions Containing Ammonia and Carbon Dioxide, *Industrial Engineering Chemistry Research*, v. 37, p. 2983-2995, 1998.
58. Ryzewski, C.N., Hsu, J.T., Purification of Protein-C from Human Plasma by Precipitation and Aqueous 2-Phase Partitioning, *Biotechnology Techniques*, v. 7, p. 815-820, 1993.
59. Schlichtkrull, J., The minimum mole fraction of metal in insulin crystals prepared with Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , or Fe^{2+} , *Acta Chemica Scandinavica*, v. 10, p. 1455-1458, 1956 - a.
60. Schlichtkrull, J, Shape o rhobohedrical zinc-insulin crystals in relation to species and crystallization media, *Acta Chemica Scandinavica*, v. 10, p. 1459-1464, 1956 - b.

61. Schlichtkrull, J., The nucleation and growth of insulin crystals, *Acta Chemica Scandinavica*, v. 11, p. 439-460, 1957 - a.
62. Schlichtkrull, J., The growth of insulin crystals, *Acta Chemica Scandinavica*, v. 11, p. 1248-1256, 1957- b.
63. Scopes, R. K., *Protein Purification*, 2nd ed., New York, Springer-verlag New York Inc., 41-71, 1988.
64. Sluzky, V., Klibanov, A. M., e Langer R., Mechanism of Insulin Aggregation and Stabilization in Agitated Aqueous Solutions, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, p. 895-903, 1992.
65. Sluzky, V., Tamada, J.A., Klibanov, A.M., Langer, R., Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 88, p. 9377 – 9381, 1991.
66. Smith, E. L., Hill, R. L., Lehman, I. R., Lefkowitz, R. J., Handler, P., White, A., *Principles of Biochemistry – Mammalian Biochemistry*, 7th edition, MacGraw-Hill, Baskerville, 1985.
67. Tomasula, P.M., Craig, J.C., Boswell, R.T., A Continuous Process for Casein Production Using High-Pressure Carbon Dioxide, *Journal of Food Engineering*, v. 33, p. 405-419, 1997.
68. van Berlo, M., Luyben, K.C. A. M., van der Wielen, L. A. M., Poly(ethylene glycol)-Salt Aqueous Two-Phase Systems with Easily Recyclable Volatile Salts, *Journal of Chromatograph B*, v. 711, p. 61-68, 1998.
69. Van Berlo, M., Ottens, M., Luyben, K. C. A. M., van der wielen, L. A.M., Partitioning Behavior of Aminoacids in Aqueous Two-Phase Systems with Recyclable Volatile Salts, *Journal of Chromatograph B*, v. 743, p. 317-325, 2000.
70. Wallace BA, Janes RW, Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics, *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 5, p. 567 – 571, 2001.

-
71. Wang, SW, Speck NA, Purification of Core-Binding Factor, a Protein that Binds the Conserved Core Site in Murine Leukemia-Virus Enhancers, *Molecular and Cellular Biology*, v. 12, p. 89-102, 1992.
 72. Watanabe, EO, *Estudo da Precipitação de Tripsina com Uso de Sais Voláteis*, Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
 73. Woody RW, Theory of circular dichroisms of proteins, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Edited by Fasman GD. New York: Plenum Press; p. 25 – 67,

ANEXO

DICROÍSMO CIRCULAR E ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE PROTEÍNAS - FUNDAMENTOS BÁSICOS

A espectroscopia por dicroísmo circular (“circular dichroism” – CD) mede a diferença de absorção na luz circularmente polarizada de forma levógira e destrógira quando esta passa através de uma amostra contendo substâncias quirais ou opticamente ativas (Wallace e Janes, 2001). O espectro na faixa de comprimentos de onda do ultravioleta distante (de cerca de 190 a cerca de 250 nm) provê informações acerca das estruturas secundárias de cadeias polipeptídicas e proteínas.

O espectro de CD surge a partir de transições eletrônicas entre os estados fundamentais e excitados dos orbitais moleculares. Para proteínas, o principal cromóforo no UV distante é o grupo amida das ligações polipeptídicas, ocorrendo, também, pequenas contribuições de outros grupos (destacando-se dentre estes o grupo sulfidril dos resíduos de cisteína). Variações na estrutura secundária da proteína implicam em variações na orientação espacial e na energia envolvida nas transições eletrônicas destes grupos. Desta forma, ocorrem também deslocamentos no comprimento de onda absorvido, mudanças no sinal dicróico (positivo ou negativo, conforme a absorção de luz em um dado comprimento de onda se dê na forma levógira ou destrógira, respectivamente) e na intensidade da absorção, caracterizando, assim, o espectro dicróico no ultravioleta distante para uma determinada amostra protéica (Woody, 1996) (Figura A2): para α -hélices, a banda negativa a aproximadamente 222 nm é a transição $n \rightarrow \pi^*$, e as bandas positiva e negativa próximas a 190 nm e 208 nm, respectivamente, são os picos de excitação perpendicular e paralela para a transição $\pi_o \rightarrow \pi^*$ (onde n representa o orbital molecular não ligante do grupo amida e π_o e π^* são os orbitais moleculares π ligante e antiligante, respectivamente, para o mesmo grupo). Para folhas β , a

banda negativa a 215 nm é a transição $n \rightarrow \pi^*$, e as bandas positiva e negativa a aproximadamente 198 e 175 nm, respectivamente, são as transições $\pi_o \rightarrow \pi^*$. Para estruturas helicoidais do tipo poliprolina – II (estrutura secundária encontrada na natureza em algumas poucas proteínas fibrosas, destacando-se dentre elas as moléculas de colágeno), a banda positiva a aproximadamente 220 nm é a transição $\pi_o \rightarrow \pi^*$ paralela, e a banda negativa a aproximadamente 200 nm é a transição $\pi_o \rightarrow \pi^*$ perpendicular, enquanto que a transição $n \rightarrow \pi^*$ não é visualizada. Assim, o espectro de dicroísmo circular se torna um instrumento deveras útil na elucidação e na verificação de mudanças da estrutura secundária de proteínas.

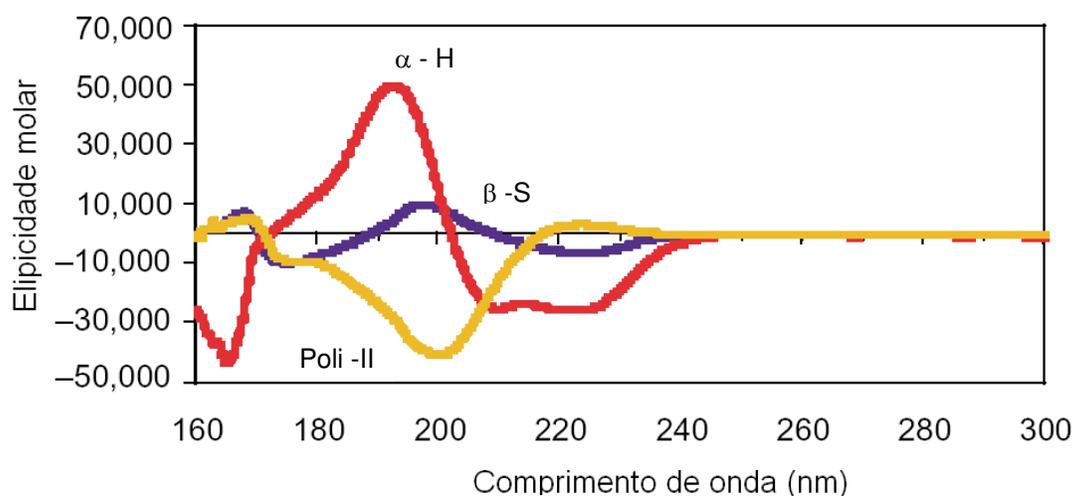


Figura A2. Espectros de dicroísmo circular de luz síncrotron para proteínas com estruturas secundárias constituídas basicamente de: α - hélices (α -H) (mioglobina, em vermelho); folhas β (β -S) (concanavalina, em azul) e hélice do tipo poliprolina - II (Poli - II) (colágeno tipo IV, em amarelo). São visualizadas diferenças substanciais no espectro na faixa do UV distante (cerca de 160 a cerca de 260 nm). Fonte: Wallace e Janes (2001).

O sinal emitido no dicroísmo circular para uma determinada amostra em um dado comprimento de onda é dito elipicidade dicróica (θ) e é uma medida indireta da diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada levógira e destrógira. Os valores de elipicidade, quando corrigidos pela concentração molar da amostra, o número de resíduos de aminoácidos e o caminho ótico, geram os valores de elipicidade molar ($[\theta]$), que são utilizados na comparação dos espectros

de diferentes amostras ou diferentes condições. Esta correção é feita, usualmente através da Equação A2:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10CRl} \quad (A2)$$

em que C é a concentração molar de proteína, R é o número de resíduos de aminoácidos, l é o caminho ótico em cm e 10 é um fator de correção (Wood, 1996).