

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Engenharia de Processos

**EQUILÍBRIO DE FASES NA PRECIPITAÇÃO DE LISOZIMA E
ALBUMINA DE SORO BOVINO COM O USO DE SAIS**

Autora: Érika Ohta Watanabe

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Novembro de 2007

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

W29e Watanabe, Érika Ohta
Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima e
albumina de soro bovino com o uso de sais / Érika Ohta
Watanabe.--Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Pedro de Alcântara Pessoa Filho,
Everson Alves Miranda.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Precipitação (Química). 2. Equilíbrio sólido-
líquido. 3. Lisozima. 4. Albumina. 5. Sal. I. Pessoa
Filho, Pedro de Alcântara. II. Miranda, Everson Alves.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Phase equilibrium of salt-induced precipitation of lysozyme and
bovine serum albumin.

Palavras-chave em Inglês: Precipitation, Phase equilibrium, Lysozyme, Bovine
serum albumin, Salt.

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Raquel de Lima Camargo Giordano, Roberto Guardani,
Marcelo Martins Seckler e Marisa Masumi Beppu.

Data da defesa: 30/11/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Érika Ohta Watanabe e aprovada em 30 de novembro de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Pedro de Alcântara Pessoa Filho

Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho - EPUSP

Orientador

Marcelo Martins Seckler

Prof. Dr. Marcelo Martins Seckler - IPT

Marisa Masumi Beppu

Profª. Drª. Marisa Masumi Beppu - FEQ/UNICAMP

Raquel de Lima Camargo Giordano

Profª. Drª. Raquel de Lima Camargo Giordano - DEQ/UFSCar

Roberto Guardani

Prof. Dr. Roberto Guardani - EPUSP

200802276

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui, primeiro, com o meu cunhado pelo apoio constante, compreensão e ajuda. Depois, deixo aqui, com o meu pai, que sempre será lembrado com gratidão por sua coragem e por sua força. E, por fim, deixo aqui, com a minha mãe, por toda a ajuda. Muito obrigado.

Depois, deixo aqui, com o meu pai, pelo apoio constante, compreensão e ajuda. Depois, deixo aqui, com o meu pai, que sempre será lembrado com gratidão por sua coragem e por sua força. E, por fim, deixo aqui, com a minha mãe, por toda a ajuda. Muito obrigado.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Érika Ohta Watanabe em 30 de novembro de 2007.



Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho

Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, minha irmã e meu cunhado pelo apoio constante, compreensão e ajuda. A minha mãe, que sempre será lembrada com muito amor por sua coragem e perseverança. Aos meus avós por toda a ajuda. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho meu profundo agradecimento pela orientação, pelas muitas palavras de incentivo, pela confiança e paciência ao longo deste trabalho. Muito obrigada por sua ajuda incondicional em todos os momentos, pela amizade e pelas demonstrações de respeito, bondade, ética e seriedade.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda por disponibilizar seu laboratório para a realização deste trabalho e pelas sugestões e críticas, que não somente contribuíram para o enriquecimento desta tese, mas também para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Gerd Maurer pela excelente acolhida na TU-Kaiserslautern, pelas idéias e sugestões que efetivamente geraram este trabalho e pela disposição em ajudar sempre.

Ao Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed por seu exemplo de profissionalismo, caráter e seriedade, qualidades que sempre lhe foram intrínsecas.

À Prof^a. Dr^a. Marisa Masumi Beppu e à Dr^a. Rosana Emi Tamagawa pelas sugestões dadas nos exames de qualificação que muito colaboraram na continuidade e finalização da tese.

À Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno e à Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios para preparo e análise de amostras.

Ao Prof. Dr. Martín Aznar e à Prof^a. Dr^a. Marisa Masumi Beppu por disponibilizarem o equipamento de liofilização e ao técnico Celso pela ajuda durante estes ensaios.

Aos amigos de laboratório da Unicamp: Alessandra, Ana Paula, Fabiana, Goran, Igor, Lidiana, Lucimara, Mariana, Oselys, Tashima, pela ajuda, discussões e pelo ótimo ambiente de trabalho que sempre me proporcionaram.

Aos amigos da TU-KL e da Alemanha: Frau Reim, Frau Hofmann, Iván e Carmem Remolina, Silke Breyer, Katja Sahandzhieva, Yuri Orlov, Álvaro Péres-Salado Kamps, Katja Popova, Ilna Urukova, Luciana e Dirk Schäffer, Vanderlei, Rodrigo, Leonardo e Patrícia pela ótima recepção, pelo apoio, por compartilhar saudades, pelos passeios, pela ajuda no laboratório e pelos muitos Kaffee und Kuchen. Vielen dank!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo suporte financeiro através da bolsa de estudo e da bolsa-sanduíche para a Alemanha e ao DAAD pela bolsa de estudo da língua alemã.

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização desta tese, muito obrigada!

RESUMO

A precipitação induzida pela adição de sais ("salting-out") é uma operação unitária freqüentemente empregada na purificação de proteínas. Com a adição de sal, a solução aquosa de proteína separa-se em uma fase pobre e um precipitado rico em proteína, sendo este último efetivamente uma mistura da fase sólida formada (a que chamaremos precipitado verdadeiro) e da fase líquida pobre em proteína, já que uma separação completa das fases não pode ser alcançada. A obtenção de dados completos de equilíbrio de fases na precipitação de proteínas ainda é rara, embora a determinação dos diagramas de fase possa contribuir para a caracterização deste precipitado verdadeiro e para uma melhor compreensão do fenômeno de precipitação. Neste trabalho, o equilíbrio de fases da precipitação de lisozima e albumina de soro bovino (BSA) foi estudado através de ensaios de precipitação, nos quais as composições das fases coexistentes foram analisadas. Os ensaios de precipitação de lisozima foram conduzidos utilizando-se sulfato de amônio e sulfato de sódio a diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 7,0 e 10,0) e cloreto de sódio a pH 7,0 e o sal volátil carbamato de amônio a 5,0, 15,0 e 25,0°C como agentes precipitantes. A BSA foi precipitada em sulfato de amônio a pH 2,0, 7,0 e 9,0. A composição do precipitado verdadeiro pode ser obtida através da intersecção de extrapolações das linhas de amarração determinadas experimentalmente, técnica de análise cuja utilização extensiva e sistemática foi realizada pela primeira vez neste trabalho. Os diagramas de fases, para o sistema contendo lisozima e sulfato de amônio e sulfato de sódio, mostraram dois tipos de precipitado verdadeiro: um composto de proteína-água e um complexo de proteína, água e sal. Diferentes valores de pH não influenciaram na composição do precipitado verdadeiro. Para os sistemas lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e a 5,0 e 15,0°C, uma região de "salting-in" na curva de solubilidade pode ser observada. Duas fases correspondentes a diferentes precipitados foram obtidas para as regiões "salting-in" e "salting-out". Os sistemas lisozima-cloreto de sódio e lisozima-carbamato de amônio apresentaram um precipitado verdadeiro composto de proteína-água e apenas proteína, respectivamente. A atividade enzimática da lisozima mostrou-se dependente da concentração de sal, enquanto nenhuma desnaturação foi verificada para a lisozima precipitada em carbamato de amônio. Para o sistema contendo BSA, em cada valor de pH utilizado foi obtido um único precipitado verdadeiro cuja composição é dependente do pH.

ABSTRACT

Salt induced protein precipitation (“salting-out”) is a unit operation commonly used to protein purification. By adding a salt, an aqueous protein solution is forced to undergo a phase separation into a protein-lean liquid phase and a protein rich phase. Nevertheless, as a complete phase separation cannot be achieved, the protein rich phase is actually a mixture of the solid phase (herein called true precipitate) and the protein-lean liquid phase. The determination of equilibrium diagrams can contribute to the characterization of this true precipitate and to the understanding of the phenomena underlying this so widely used technique but, in spite of this, the experimental determination of phase equilibrium diagrams of protein precipitation is scarce. In this work, phase equilibrium of salt-induced precipitation of lysozyme and bovine serum albumin (BSA) was studied through precipitation assays, in which the compositions of the coexisting phases were analysed. Lysozyme precipitation experiments were carried out using ammonium sulfate and sodium sulfate at different values of pH (2.0, 4.0, 7.0 e 10.0) and sodium chloride at pH 7.0 and the volatile salt ammonium carbamate at 5.0, 15.0 and 25.0°C as precipitant agents. Precipitation of BSA was carried out in ammonium sulfate solution at pH 2.0, 7.0 and 9.0. The composition of the true precipitate phase was inferred by the intersection of the extensions of the experimentally determined tie-lines – an analysis not previously carried out to such extent. Phase diagrams of lysozyme-ammonium sulfate and sodium sulfate-water showed two different types of precipitate: a salt-free protein-water phase and a protein-rich phase formed by lysozyme, water and salt. No significant difference was observed in the composition of the true precipitate when the pH value is changed. For systems formed by ammonium sulfate at pH 7.0 at 5.0 and 15.0°C, a salting-in region in the solubility curve was observed. Two different true precipitates were found, corresponding to the salting-in and salting-out regions. The systems lysozyme-sodium chloride and lysozyme-ammonium carbamate showed only one true precipitate composed by protein-water and protein, respectively. Lysozyme activity depends on the salt concentration used to protein precipitation, while no protein denaturation was verified in the lysozyme precipitated by ammonium carbamate. Phase diagrams of BSA-salt-water showed only one true precipitate, whose composition depends on the pH studied.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XXII
NOMENCLATURAS	XXVIII
 CAPÍTULO 1	 1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVO.....	6
1.2. ETAPAS EXECUTADAS	6
 CAPÍTULO 2.....	 9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS.....	10
2.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS POR “SALTING-OUT”	12
2.2.1. Aspectos gerais da precipitação de proteínas por “salting-out”... 12	
2.2.2. Precipitação de proteínas com uso de sal volátil..... 15	
2.2.3. Modelagem da precipitação por “salting-out” de proteínas	17
2.3. DIAGRAMAS DE FASE.....	22
2.4. LISOZIMA.....	26
2.5. ALBUMINA.....	32
 CAPÍTULO 3.....	 35
MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. MATERIAIS	35

3.1.1. Reagentes	35
3.1.2. Equipamentos.....	36
3.2. PROCEDIMENTOS	37
3.2.1. Preparo das soluções de proteína e sal.....	37
3.2.2. Precipitação das proteínas.....	38
3.2.3. Determinação das concentrações de proteína, água e sal na fase sobrenadante.....	40
3.2.4. Determinação das concentrações de proteína, água e sal do precipitado.....	41
3.2.5. Determinação da atividade da lisozima, da faixa operacional da taxa de reação de degradação do substrato e da influência do sal na atividade da lisozima	44
CAPÍTULO 4.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
4.1. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA LISOZIMA - SULFATO DE AMÔNIO-ÁGUA	48
4.1.1. Efeito do pH no equilíbrio de fases do sistema lisozima - sulfato de amônio - água à temperatura de 25°C	48
4.1.2. Determinação da composição do precipitado verdadeiro.....	54
4.1.3. Efeito da temperatura no equilíbrio de fases do sistema lisozima - sulfato de amônio - água a pH igual a 7,0.....	61
4.1.4. Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima - sulfato de amônio - água a 25°C e a diferentes valores de pH.....	66
4.2. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA LISOZIMA - SULFATO DE SÓDIO - ÁGUA	70
4.2.1. Efeito do pH no equilíbrio de fases do sistema lisozima - sulfato de sódio - água à temperatura de 25,0°C	70

4.2.2. Efeito da temperatura no equilíbrio de fases do sistema lisozima - sulfato de sódio - água a pH igual a 7,0	76
4.2.3. Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima - sulfato de sódio - água a 25,0°C e a diferentes valores de pH.....	81
4.3. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA LISOZIMA - CLORETO DE SÓDIO - ÁGUA A DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURA	85
4.4. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA LISOZIMA - CARBAMATO DE AMÔNIO - ÁGUA A DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURA.....	90
4.5. BALANÇOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LISOZIMA	97
4.6. COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES SAIS VISANDO A PRECIPITAÇÃO COMO UMA OPERAÇÃO DE SEPARAÇÃO OU CONCENTRAÇÃO	101
4.7. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA ALBUMINA DE SORO BOVINO - SULFATO DE AMÔNIO - ÁGUA	103
CAPÍTULO 5.....	111
CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	111
5.1. CONCLUSÕES.....	111
5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
CAPÍTULO 6.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
APÊNDICE 1.....	127
APÊNDICE 2.....	131
A2.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NA FASE SOBRENADANTE E NO PRECIPITADO	131
A2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA FASE SOBRENADANTE POR CONDUTIVIDADE	133

A2.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LISOZIMA NAS MEDIDAS DE CONDUTIVIDADE DOS SAIS	134
A2.4. DADOS EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE ABSORÇÃO DE LISOZIMA E BSA.....	139
A2.5. DADOS EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE CONDUTIVIDADE DOS SAIS.....	146
APÊNDICE 3.....	149
A3.1. DIAGRAMAS DE FASE DA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SAL	149
APÊNDICE 4.....	151
A4.1. SISTEMA LISOZIMA-SULFATO DE AMÔNIO-ÁGUA.....	151
A4.2. SISTEMA LISOZIMA-SULFATO DE SÓDIO-ÁGUA.....	164
A4.3. SISTEMA LISOZIMA-CLORETO DE SÓDIO-ÁGUA	172
A4.4. SISTEMA LISOZIMA-CARBAMATO DE AMÔNIO-ÁGUA	176
A4.5. SISTEMA BSA-SULFATO DE AMÔNIO-ÁGUA	179
A4.6. INFLUÊNCIA DO TEMPO E VELOCIDADE DE CENTRIFUGAÇÃO NA SEPARAÇÃO DE FASES DO SISTEMA LISOZIMA-SULFATO DE AMÔNIO-ÁGUA	182
APÊNDICE 5.....	185
A5.1. DETERMINAÇÃO DA FAIXA OPERACIONAL DA TAXA DE REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS PELA LISOZIMA.....	185
A5.2. INFLUÊNCIA DO SAL NA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS PELA LISOZIMA	186

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1: Ilustração de um diagrama de fase mostrando a solubilidade de uma proteína em solução em função da concentração do agente precipitante (Riès-Kautt e Ducruix, 1992)..... 11
- Figura 2.2: Concentrações de equilíbrio da tripsina suína a 4°C em solução de: carbamato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 2,0, $\circ$; sulfato de amônio, $\square$; sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5, $\triangle$. Concentração inicial de tripsina de 40 mg/mL em solução de carbamato de amônio e em sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 e de 30 mg/mL em solução de sulfato de amônio (Watanabe *et al.*, 2006). 18
- Figura 2.3: Diagrama de fase do sistema gelatina-sulfato de amônio-água em pH igual a 4,0 e temperatura de 37°C. Região S: região de uma única fase; região C: duas fases coexistentes (solução e coacervado); região T: região de três fases (coacervado, solução e precipitado); regiões P_1 e P_2 : solução rica em sal em equilíbrio com o precipitado (Dervichian, 1943). 24
- Figura 2.4: Diagrama de fase do sistema albumina de soro-sulfato de amônio-água (Dervichian e Mossé, 1953)..... 25
- Figura 2.5: Densidade de íons (ânions e cátions) em relação a duas superfícies (carregadas com a mesma densidade de cargas e grupos carregados da lisozima) separadas a $20 \text{ \AA}^0$. As duas curvas superiores foram determinadas a pH igual a 4,0, enquanto as duas curvas inferiores a pH igual a 12. As linhas sólidas correspondem a estudos com NaSCN e as linhas tracejadas a estudos com NaCl (Boström *et al.*, 2005)..... 30
- Figura 2.6: Diagrama de fases para proteínas globulares. Condições da solução abaixo da curva de solubilidade são metaestáveis considerando-se a cristalização. Região I: região ótima para a cristalização da proteína. Região II: separação em duas fases líquidas metaestáveis imiscíveis (formação de um precipitado de turvação). Na região da curva de gelatinização, formação incompleta do gel

(precipitado amorfo). Formação de gel na Região III (Muschol e Rosenberger, 1997).	32
Figura 3.1: Ilustração da metodologia utilizada para a precipitação das proteínas.	39
Figura 3.2: Ilustração da metodologia utilizada para determinação de proteína, água e sal da fase sobrenadante.	41
Figura 3.3: Ilustração da metodologia utilizada para determinação de proteína, água e sal do precipitado.	42
Figura 3.4: Fluxograma dos ensaios de precipitação e da metodologia utilizada para a determinação de proteína, sal e água dos sistemas em equilíbrio.....	43
Figura 3.5: Ilustração da metodologia utilizada para determinação da atividade biológica da lisozima na fase sobrenadante e no precipitado.	45
Figura 4.1: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$).	49
Figura 4.2: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$).	50
Figura 4.3: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$).	51

Figura 4.4: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 10,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$). 52

Figura 4.5: Concentrações de equilíbrio de lisozima em solução de sulfato de amônio a 25,0°C e diferentes valores de pH: 2,0 ($\square$), 4,0 ($\circ$), 7,0 ($\diamond$), 10,0 ($\triangle$). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 2,0 ($\cdots\square\cdots$), 4,0 ($---\circ---$), 7,0 ($\cdot\text{---}\diamond\text{---}\cdot$), 10,0 ($\text{---}\triangle\text{---}$). 53

Figura 4.6: Diagramas de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água, com a presença dos precipitados verdadeiros, a 25,0°C e diferentes valores de pH: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 7,0; (d) 10,0. Composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (---). 57

Figura 4.7: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução (neste trabalho) e 0,1 - 0,25 g proteína/g solução (Moretti *et al.*, 2000); concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da fase sobrenadante ($\triangle$, $\blacktriangle$), composição do precipitado ($\circ$, $\bullet$); dados deste trabalho (símbolos abertos), dados de Moretti *et al.*, 2000 (símbolos cheios)..... 59

Figura 4.8: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0 (neste trabalho) e pH=8,0 (Moretti *et al.*, 2000). Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução (neste trabalho) e 0,1 - 0,25 g proteína/g solução (Moretti *et al.*, 2000); concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da fase sobrenadante ($\triangle$, $\blacktriangle$), composição do precipitado ($\circ$, $\bullet$); dados deste trabalho (símbolos abertos), dados de Moretti *et al.*, 2000 (símbolos cheios)..... 60

Figura 4.9: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 5,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 61

Figura 4.10: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 15,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 62

Figura 4.11: Concentrações de equilíbrio de lisozima em sulfato de amônio a pH 7,0 e a diferentes temperaturas: 25,0°C ($\circ$), 15,0°C ($\square$), 5,0°C ($\triangle$). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 25,0°C (— $\circ$ —), 15,0°C (--- $\square$ ---), 5,0°C (··· $\triangle$ ···). 64

Figura 4.12: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0. 67

Figura 4.13: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0. 68

Figura 4.14: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0. 69

Figura 4.15: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 71

Figura 4.16: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20

g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 72

Figura 4.17: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 73

Figura 4.18: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 10,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 74

Figura 4.19: Concentrações de equilíbrio de lisozima em solução de sulfato de sódio a 25,0°C e diferentes valores de pH: 2,0 ($\square$), 4,0 ($\circ$), 7,0 ($\diamond$), 10,0 ($\triangle$). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 2,0 ($\cdots\square\cdots$), 4,0 ($---\circ---$), 7,0 ($\cdot\text{---}\diamond\text{---}\cdot$), 10,0 ($\text{---}\triangle\text{---}$). 76

Figura 4.20: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 5,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20 g proteína/g solução; Concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 77

Figura 4.21: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 15,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 78

Figura 4.22: Concentrações de equilíbrio de lisozima em sulfato de sódio a pH 7,0 e a diferentes temperaturas: 25,0°C (○), 15,0°C (□), 5,0°C (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de sódio: 0,20 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 25,0°C (—○—), 15,0°C (---□---), 5,0°C (···△···). 80

Figura 4.23: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0. 82

Figura 4.24: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0. 83

Figura 4.25: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0. 84

Figura 4.26: Diagrama de fases do sistema lisozima-cloreto de sódio-água a 5,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,25 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—). 85

Figura 4.27: Diagrama de fases do sistema lisozima-cloreto de sódio-água a 15,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,25 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—). 86

Figura 4.28: Diagrama de fases do sistema lisozima-cloreto de sódio-água a 25,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,25 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—). 87

Figura 4.29: Concentrações de equilíbrio de lisozima em cloreto de sódio a pH 7,0 e a diferentes temperaturas: 25,0°C (○), 15,0°C (□), 5,0°C (△). Concentração

mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de sódio: 0,25 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 25,0°C (—○—), 15,0°C (---□---), 5,0°C (···△···). 89

Figura 4.30: Diagrama de fases do sistema lisozima-carbamato de amônio-água a 5,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,35 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—). 91

Figura 4.31: Diagrama de fases do sistema lisozima-carbamato de amônio-água a 15,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,35 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—). 92

Figura 4.32: Diagrama de fases do sistema lisozima-carbamato de amônio-água a 25,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,35 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—). 93

Figura 4.33: Concentrações de equilíbrio de lisozima em carbamato de amônio a pH 7,0 e a diferentes temperaturas: 25,0°C (○), 15,0°C (□), 5,0°C (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de carbamato de amônio: 0,35 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 25,0°C (—○—), 15,0°C (---□---), 5,0°C (···△···). 96

Figura 4.34: Diagrama de fases do sistema BSA-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0. Concentração mássica inicial de solução de BSA: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—). 104

Figura 4.35: Diagrama de fases do sistema BSA-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de BSA: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 105

Figura 4.36: Diagrama de fases do sistema BSA-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 9,0. Concentração mássica inicial de solução de BSA: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—). 106

Figura 4.37: Diagrama de fases do sistema BSA-sulfato de amônio-água a 20,0°C. Descrição morfológica observada no precipitado: (1) líquido transparente, límpido para baixas concentrações de BSA e de coloração amarela para concentrações de BSA maiores que 15%; (2) sólido não contendo líquido, com pequena quantidade de cristais de sal; (3) líquido contendo precipitado de proteína BSA; (4) líquido contendo precipitado de proteína e cristais de sal (Elysée-Collen e Lencki, 1997) 107

Figura 4.38: Concentrações de equilíbrio de solução de BSA em solução de sulfato de amônio a 25,0°C e diferentes valores de pH: 2,0 ($\square$), 7,0 ($\diamond$), 9,0 ($\triangle$). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução. 109

Figura A1.1: Esquema de um aparato para medida de pressão osmótica. A membrana é permeável ao solvente (1), mas não ao soluto (2). 128

Figura A3.1: Ilustração de leitura dos componentes proteína, sal e água representados no diagrama ternário. 150

Figura A5.1: Determinação da atividade específica da lisozima em tampão de fosfato de potássio 0,066 mol/L pH 6,24 em função da taxa de reação de degradação do substrato *Micrococcus lysodeikticus* a 25,0°C para diversas concentrações de lisozima. 186

Figura A5.2: Influência dos sais sulfato de amônio ($\diamond$), sulfato de sódio ($\triangle$), cloreto de sódio ($\circ$) e carbamato de amônio ($\square$) na atividade da lisozima utilizando o substrato *Micrococcus lysodeikticus* como substrato a 25,0°C. Concentração de lisozima: 0,10 mg/mL em tampão fosfato de potássio 0,066 mol/L pH 6,24..... 187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Características da lisozima de clara de ovo de galinha e da albumina de soro bovino.....	5
Tabela 3.1: Concentrações mássicas iniciais das soluções de proteínas e sais utilizados nos sistemas de equilíbrio de fases.....	38
Tabela 3.2: Valores de concentração de sal utilizados nos ensaios de atividade de lisozima para verificação da influência desses sais na atividade da proteína.	46
Tabela 4.1: Concentrações mássicas de lisozima, água e sal do precipitado verdadeiro nas regiões de alta e baixa concentração de sal, nos sistemas lisozima-sulfato de amônio-água a temperatura igual a 25,0 °C e a diferentes valores de pH.	58
Tabela 4.2: Concentrações mássicas de lisozima, água e sal do precipitado verdadeiro nas regiões de alta e baixa concentração de sal, nos sistemas lisozima-água-sulfato de amônio a pH 7,0 e diferentes temperaturas.....	63
Tabela 4.3: Composições de lisozima, água e sal do precipitado verdadeiro na região de alta concentração de sal, nos sistemas lisozima-água-sulfato de sódio a temperatura igual a 25,0 °C e a diferentes valores de pH.	75
Tabela 4.4: Concentrações mássicas de lisozima, água e sal do precipitado verdadeiro nas regiões de alta e baixa concentração de sal, nos sistemas lisozima-água-sulfato de sódio a pH 7,0 e diferentes temperaturas.	79
Tabela 4.5: Balanço de massa de lisozima dos sistemas lisozima-sal-água a pH igual a 7,0 e a diferentes valores de temperatura	98
Tabela 4.6: Balanço de atividade enzimática de lisozima dos sistemas lisozima-sal - água a pH igual a 7,0 e a diferentes valores de temperatura.....	99

Tabela A2.1: Coeficientes de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio a 205 e 280 nm.	132
Tabela A2.2: Coeficientes de absorção de solução de BSA em solução de sulfato de amônio a 205 nm e em água a 280 nm.	133
Tabela A2.3: Coeficientes de condutividade dos sais sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio.	134
Tabela A2.4: Influência de lisozima nas medidas de condutividade do sal sulfato de amônio. As concentrações dos componentes proteína, água e sal são expressas em g componente/g solução.	135
Tabela A2.5: Influência de lisozima nas medidas de condutividade do sal sulfato de sódio. As concentrações dos componentes proteína, água e sal são expressas em g componente/g solução.	136
Tabela A2.6: Influência de lisozima nas medidas de condutividade do sal carbamato de amônio. As concentrações dos componentes proteína, água e sal são expressas em g componente/g solução.	137
Tabela A2.7: Influência de lisozima nas medidas de condutividade do sal cloreto de sódio. As concentrações dos componentes proteína, água e sal são expressas em g componente/g solução.	138
Tabela A2.8: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de amônio a 205 nm.	139
Tabela A2.9: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de amônio a 280 nm.	139
Tabela A2.10: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de sódio a 205 nm.	140
Tabela A2.11: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de sódio a 280 nm.	141

Tabela A2.12: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de cloreto de sódio a 280 nm.	142
Tabela A2.13: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de carbamato de amônio a 280 nm.	143
Tabela A2.14: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em água a 280 nm.	144
Tabela A2.15: Determinação da curva de absorção de solução de BSA em solução de sulfato de amônio a 205 nm.	145
Tabela A2.16: Determinação da curva de absorção de solução de BSA em água a 280 nm.	145
Tabela A2.17: Determinação do coeficiente de condutividade do sal sulfato de amônio.	146
Tabela A2.18: Determinação do coeficiente de condutividade do sal sulfato de sódio.....	147
Tabela A2.19: Determinação do coeficiente de condutividade do sal carbamato de amônio.	147
Tabela A2.20: Determinação do coeficiente de condutividade do sal cloreto de sódio.....	148
Tabela A4.1: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.	151
Tabela A4.2: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução.	153

Tabela A4.3: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução. 154

Tabela A4.4: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a pH igual a 4,0 e 8,0 e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante (Moretti *et al.*, 2000) expressas em g componente/g solução. 156

Tabela A4.5: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a pH igual a 4,0 e 8,0 e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes no precipitado (Moretti *et al.*, 2000) expressas em g componente/g solução. 158

Tabela A4.6: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução. 160

Tabela A4.7: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução. ... 161

Tabela A4.8: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução. 163

Tabela A4.9: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução. 164

Tabela A4.10: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução. ... 166

Tabela A4.11: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução. 167

Tabela A4.12: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução. 169

Tabela A4.13: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução. ... 170

Tabela A4.14: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução. 171

Tabela A4.15: Sistema lisozima (1) – cloreto de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução. 172

Tabela A4.16: Sistema lisozima (1) – cloreto de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução. ... 174

Tabela A4.17: Sistema lisozima (1) – cloreto de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução. 175

Tabela A4.18: Sistema lisozima (1) – carbamato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução. 176

Tabela A4.19: Sistema lisozima (1) – carbamato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução. ... 177

Tabela A4.20: Sistema lisozima (1) – carbamato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução. 178

Tabela A4.21: Sistema BSA (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.	179
Tabela A4.22: Sistema BSA (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução. ...	180
Tabela A4.23: Sistema BSA (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução.	181
Tabela A4.24: Variação do tempo de centrifugação para o sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e 25,0°C a uma velocidade de centrifugação de 2000 g para separação da fase sobrenadante e do precipitado.	182
Tabela A4.25: Variação da velocidade de centrifugação para o sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e 25,0°C para o tempo de centrifugação de 15 min para separação da fase sobrenadante e do precipitado.....	183
Tabela A4.26: Variação da taxa de adição do sal, para o sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e 25,0°C.	184

NOMENCLATURAS

A – fração de luz absorvida;

a – coeficiente de absorção específico na faixa linear (g/(mg.cm));

a_1^0 – atividade do solvente puro;

B_{22} – segundo coeficiente virial osmótico para interação entre as proteínas (cm³/mol);

B_{22}^{hs} – contribuição da esfera rígida para o segundo coeficiente virial (cm³/mol);

BSA – albumina de soro bovino;

C – concentração de proteína em solução (mg/g);

c^P – concentração de proteína no precipitado (mg/g);

c^S – concentração de proteína na fase sobrenadante (mg/g);

d – distância percorrida pela luz através da solução da amostra (1,0 cm);

d – diâmetro da partícula esférica (cm);

I – força iônica (mol/kg);

k – constante de Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K);

K_e – coeficiente de partição entre duas fases;

K_S – constante específica do sal e da proteína (kg/mol);

m_i – molalidade da espécie *i* (mol/kg);

N_A – número de Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23}$ 1/mol);

r – distância centro a centro entre duas partículas esféricas (cm);

$R_{N/C}$ – razão entre as concentrações totais de nitrogênio e carbono do sal;

RPB – recuperação e purificação de bioprodutos;

S – concentração de equilíbrio da proteína em solução (mg/g);

t – tempo (min);

T – temperatura (K);

UA – unidade de atividade enzimática;

V_{Lisozima} – volume de lisozima (mL);

W – potencial de força média (J);

z_i – carga elétrica do íon;

β – constante dependente da temperatura, do pH e da proteína;

σ – incremento da tensão superficial molal;

$\Delta A_{450 \text{ nm}}$ – variação da absorbância a 450 nm;

Λ – termo relacionado às interações eletrostáticas entre o sal e a proteína;

Ω – constante dependente da área superficial hidrofóbica.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Proteínas podem ser utilizadas em uma ampla variedade de aplicações, mas independente da sua forma de produção, elas não são obtidas puras e uma extensa seqüência de etapas de separação pode ser necessária para que se obtenha o produto desejado no nível de pureza requerido. Estas operações seqüenciais são conhecidas como Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB) ou “Downstream Processing” e muito freqüentemente constituem uma das etapas mais difíceis e caras em um bioprocessos. No caso dos fármacos, o custo da RPB no processo produtivo pode atingir até 80% do custo de produção (Clonis, 2006).

A precipitação de proteínas com o uso de sais é uma etapa de purificação freqüentemente encontrada em bioprocessos e ocorre geralmente entre uma primeira etapa de separação de sólido e líquido, realizada por centrifugação ou filtração, e a purificação final utilizando-se adsorção ou cromatografia (Ladisch, 2001). Essa etapa de precipitação é bastante utilizada pela alta capacidade de concentrar a molécula de interesse e pelo seu baixo custo (Boychyn *et al.*, 2000), estando presente em mais da metade dos processos de purificação, segundo Bonnerjea *et al.* (1986). Porém, por ser uma etapa envolvida na concentração da molécula de interesse, após a precipitação seguem-se etapas de separação de outros contaminantes e dos sais adicionados. Por exemplo, o uso de operações como a diálise é necessária para a eliminação dos sais concomitantemente separados com o precipitado (por coprecipitação ou por arraste do sal contido na fase líquida, que inevitavelmente acompanham o sólido formado). Em etapas

seguintes ocorre a separação dos outros compostos de origem biológica. A precipitação de proteínas pode ainda ser utilizada ao final da RPB para a concentração do produto já purificado para posterior remoção da fase líquida e secagem.

Processos de precipitação de proteínas por “salting-out” têm sido comumente estudados com ênfase na solubilidade da proteína em função de parâmetros como o tipo de sal, pH e temperatura (Green, 1932; Dixon e Webb, 1961; Shih *et al.*, 1992; Bernard *et al.*, 1996; Judge *et al.*, 1996, Boychyn *et al.*, 2000, Legrand *et al.*, 2002, Cheng *et al.*, 2006). Características do precipitado sólido, como o tamanho e densidade das partículas agregadas, são às vezes investigadas como nos estudos realizados por Foster *et al.* (1976) para a precipitação da enzima fumarase induzida pela adição de sulfato de amônio, por Nelson e Glatz (1985) para a precipitação isoeletrica de proteínas de extrato de soja, e para a precipitação por “salting-out” de α -quimotripsina (Przybycien e Bailey, 1989a). No entanto, a determinação da composição e a análise morfológica do precipitado sólido raramente são realizadas, ainda que informações deste sólido, que contém o produto desejado, sejam importantes para o entendimento detalhado do fenômeno e otimização do processo de purificação e planejamento das operações subseqüentes. Nesse sentido, o estudo de equilíbrio de fases da precipitação de proteínas pode contribuir para a melhor caracterização do sólido e permitir que se determine a influência de parâmetros como pH e temperatura em sua estrutura.

Além de questões relacionadas diretamente ao tratamento da mistura resultante das operações de purificação, a expansão dos processos biotecnológicos para produção em larga escala tem exigido uma melhoria contínua das técnicas de separação, o que tem motivado o estudo do equilíbrio de fases de sistemas contendo proteínas e sal visando a um entendimento fundamental dos princípios envolvidos nesse equilíbrio (von Solms *et al.*, 2002). A correta manipulação das variáveis envolvidas na operação de precipitação pode levar, por exemplo, à otimização da quantidade de sais adicionados, com impacto positivo no custo total do processo de purificação – além da possibilidade de redimensionamento das operações subseqüentes. Por exemplo, o conhecimento

da quantidade de sal que acompanha a fase sólida permite que se projete melhor a remoção deste sal ou mesmo uma cromatografia hidrofóbica subsequente. Além disso, o estudo de alguns sistemas pode permitir que se proponham modelos adequados para o equilíbrio de fases, com potencial de extrapolação para sistemas de interesse industrial.

Apesar da importância dos diagramas de fases, a obtenção de dados completos de equilíbrio de fases da precipitação de proteínas, ou seja, valores de concentração de todos os componentes envolvidos, é complicada por vários fatores como: diferentes fases densas que podem ser encontradas (cristais, precipitados amorfos ou géis), as barreiras cinéticas para alcançar o verdadeiro equilíbrio, o caráter multicomponente das soluções utilizadas, mesmo que o alvo do estudo seja apenas a proteína, e a sensibilidade do comportamento de fases a parâmetros como, por exemplo, pH, força iônica, tipo de sal e temperatura (Moretti *et al.*, 2000). Devido a essas dificuldades, dados experimentais de diagramas de fases completos da precipitação de solução de proteínas ainda são escassos. Diagramas de fases são mais freqüentemente determinados para apresentar as separações de fases líquido-líquido, líquido-sólido ou regiões metaestáveis, para a predição de condições em que uma proteína pode ser cristalizada ou mesmo na obtenção de propriedades termodinâmicas. Porém, a determinação experimental de diagramas de fases que revelem as composições das fases coexistentes é rara, bem como estudos da morfologia dos precipitados obtidos de equilíbrios líquido-sólido.

Diagramas de fases são essenciais para a identificação dos sistemas mais adequados a serem utilizados em processos de precipitação e cristalização. Isto porque os diagramas apresentam as composições das diferentes fases em equilíbrio em função de parâmetros como pH, temperatura e tipo de sal, permitindo a seleção de condições e sistemas com elevada quantidade do sólido desejado no precipitado, sua morfologia e manutenção da atividade biológica da proteína. A escolha desta melhor condição do sistema permite menor custo do processo, redução do número de etapas de purificação posterior e menor quantidade de produto desejado na fase sobrenadante a ser tratada ou levada para descarte.

Por essas razões, este trabalho, trata do equilíbrio de fases da precipitação de soluções protéicas com sais. Este estudo está inserido em um contexto mais amplo, que inclui o estudo da precipitação de proteínas por eletrólitos voláteis e a determinação completa do diagrama de fases, contendo dados de concentração de todos os componentes presentes no sistema, conduzido simultaneamente nesta Faculdade pelo Prof. Dr. Everson Alves Miranda, na Escola Politécnica da USP pelo Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho e na “Technische Universität Kaiserslautern” (TU-KL), Alemanha, pelo Prof. Dr. Gerd Maurer.

As proteínas em estudo foram a lisozima de clara de ovo de galinha e a albumina de soro bovino (BSA). As proteínas lisozima de clara de ovo de galinha e BSA foram utilizadas neste trabalho por suas características distintas, como ponto isoelétrico, uma vez que a lisozima apresenta ponto isoelétrico básico de aproximadamente 11,3, enquanto que a BSA possui ponto isoelétrico ácido de cerca de 4,8. Além disso, a lisozima e a BSA possuem massas moleculares diferentes, aproximadamente 14,0 e 67,0 kDa, respectivamente. A relativa disponibilidade dessas proteínas em elevado grau de pureza (maior que 95%) e a alta solubilidade da lisozima (cerca de 10 mg/mL) e da BSA (cerca de 40 mg/mL) em água também motivaram o uso dessas proteínas neste estudo de precipitação por “salting-out”. Estas e outras características da lisozima e da BSA são apresentadas na Tabela 1.1.

Os sais utilizados foram: sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio. A efetividade dos sais na precipitação de proteínas por “salting-out” depende fortemente do tipo do sal utilizado. Por isso, diferentes tipos de sais foram escolhidos neste trabalho: sais de diferentes cátions, como NH_4^+ (sulfato de amônio e carbamato de amônio) e Na^+ (sulfato de sódio e cloreto de sódio) e diferentes ânions SO_4^{2-} (sulfato de amônio e sulfato de sódio), Cl^- (cloreto de sódio) e NH_2COO^- (carbamato de amônio). Estes sais permitiram a realização de um estudo comparativo da efetividade dos ânions SO_4^{2-} e Cl^- , através dos sais sulfato de sódio e cloreto de sódio e dos cátions NH_4^+ e Na^+ pelo uso dos sais sulfato de amônio e sulfato de sódio, bem como a comparação entre

o sal volátil e sais convencionais. Além desse aspecto comparativo, ressalte-se que o sulfato de amônio é o sal mais utilizado em precipitação de proteínas; o sulfato de sódio possui elevada capacidade de indução do “salting-out”; o cloreto de sódio possui larga aplicação em processos de proteínas de uso farmacêutico e o sal volátil carbamato de amônio é uma alternativa a ser considerada para a indução de precipitação de proteínas, pela facilidade de remoção desse sal das fases coexistentes.

Tabela 1.1: Características da lisozima de clara de ovo de galinha e da albumina de soro bovino.

Características	Lisozima	BSA	Referências
Massa Molecular (kDa)	14,0	67,0	Sigma (1996, 2000)
Ponto isoelétrico	11,3	4,8	Sigma (1996, 2000)
Solubilidade em água (mg/mL)	10,0	40,0	Sigma (1996, 2000)
Hidrofobicidade (cal/resíduo)	970	1120	Bigelow (1967)
Temperatura de desnaturação (°C)	> 100	> 60	Jollès (1967), Peters Jr. (1985)
Número de resíduos aminoácidos	129	582	Jollès e Jollès (1984), Peters Jr. (1985)
Carga líquida da proteína a pH 7,0	+ 8	- 10, -8 e 0 para os domínios I, II e III, respectivamente	Riès-Kautt e Ducruix (1997), Peters Jr. (1985)

1.1. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a determinação experimental e a análise de diagramas ternários de equilíbrio sólido-líquido de sistemas proteína - sal - água. Diagramas de fases de precipitação de proteínas com diferentes sais, a diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 7,0 e 10,0) e de temperatura (5,0, 15,0 e 25,0°C) foram conduzidos para avaliação dos efeitos destes parâmetros no equilíbrio de fases. Pela análise dos diagramas de fases obtidos, considerando os prolongamentos das linhas de amarração experimentais, pode-se determinar a composição do precipitado livre de fase líquida. A utilização extensiva desta técnica de análise visa a aprofundar o conhecimento sobre as operações de purificação em que este equilíbrio está presente, como a precipitação e a cristalização, para potencial aplicação em processos de separação e concentração de proteínas.

1.2. ETAPAS EXECUTADAS

A determinação experimental do equilíbrio de fases consistiu na precipitação de proteínas pela adição de sais (solução ou cristais), aguardando-se que o equilíbrio fosse atingido e, em seguida, realizou-se a separação das fases coexistentes e a determinação dos componentes das fases obtidas. Com o intuito de verificar a influência dos parâmetros pH, temperatura e tipo de sal na precipitação das proteínas e na composição do precipitado sólido formado, as seguintes etapas foram realizadas:

- a) Determinação experimental do equilíbrio de fases dos sistemas lisozima - sulfato de amônio - água e lisozima - sulfato de sódio - água a diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 7,0 e 10,0) e a temperatura de 25,0°C e análises de microscopia óptica desses sistemas;
- b) Diagramas de equilíbrio de fases determinados experimentalmente dos sistemas lisozima - sulfato de amônio - água, lisozima - sulfato de sódio - água, lisozima - cloreto de sódio - água e lisozima - carbamato de amônio -

água a pH igual a 7,0 e a diferentes valores de temperatura (5,0, 15,0 e 25,0 °C);

- c) Determinação experimental do equilíbrio de fases dos sistemas BSA - sulfato de amônio - água a diferentes valores de pH (2,0, 7,0 e 9,0) e à temperatura de 25,0 °C;

Além disso, ensaios de atividade enzimática da lisozima das fases sobrenadante e precipitado foram realizados através da reação de degradação de células de microorganismos, utilizados como substrato.

O trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Gerd Maurer, da “Technische Universität Kaiserslautern”, Alemanha, onde foram realizadas as etapas (a) e (c).

Ressalta-se que nenhuma metodologia de planejamento fatorial, fundamentada na teoria estatística, foi realizada, embora a influência de diversas variáveis tenha sido investigada, como: tipo de sal (sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio), parâmetros como pH (2,0, 4,0, 7,0 e 10,0) e temperatura (5,0, 15,0 e 25,0 °C). A ausência do planejamento experimental, baseado em fundamentos estatísticos, pode em princípio ocasionar o desconhecimento de alguma influência de uma das variáveis (sal, pH e temperatura) sobre a resposta do processo (equilíbrio de fases), além da possibilidade de número excessivo de ensaios ou repetições realizados e de limitar a análise efetuada para cada uma das variáveis sobre o processo em questão, separadamente, sem uma interação quantitativa e qualitativa entre estes fatores. Apesar dessas razões, o planejamento experimental não foi realizado por tratar-se de um trabalho inovador e em fase inicial de investigação, em que o objetivo prioritário era a obtenção dos diagramas de fases, sendo que as variáveis foram definidas ao longo do trabalho tanto para comparação com dados da literatura, como para fornecer resultados ainda não observados. Além disso, ressalte-se que o principal resultado experimental da execução do trabalho, os próprios diagramas de fase, não é passível de ser relacionado inequivocamente a uma única variável ou um conjunto de variáveis.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é abordada a revisão da literatura de temas pertinentes a este trabalho como: a solubilidade de proteínas, com destaque para o seu conceito, os parâmetros que a influenciam e as regiões metaestável, de nucleação e de precipitação de uma curva de solubilidade. A precipitação de proteínas induzida pela adição de sais (“salting-out”) e a precipitação de proteínas com o uso de sal volátil, uma vez que o sal carbamato de amônio foi utilizado nos ensaios de precipitação de lisozima, são brevemente discutidas. A modelagem da precipitação de proteínas, em que são apresentadas as equações que representam matematicamente os efeitos “salting-in” e “salting-out” também será abordada. A seguir, tem-se a definição, importância, emprego dos diagramas de fases e as dificuldades na determinação experimental desses diagramas de fases completos. Finalmente, as proteínas, lisozima e albumina, estudadas neste trabalho são apresentadas, assim como, os estudos relatados de cristalização e precipitação dessas proteínas e a influência dos parâmetros: pH, temperatura, tipo de sal e morfologia do precipitado sólido obtido nesses processos.

2.1. SOLUBILIDADE DE PROTEÍNAS

Ao se adicionarem cristais de proteína em um solvente livre de proteína, esses cristais irão se dissolver. Se o volume de solvente não for o suficiente, os cristais não se dissolverão totalmente, e o processo irá cessar quando a concentração de proteína na solução alcançar um valor específico. Nesta concentração, os cristais perderão moléculas de proteína na mesma taxa em que essas moléculas de proteína da fase líquida se ligarão ao cristal – o sistema encontra-se em equilíbrio. A concentração de proteína na solução em equilíbrio é a solubilidade (Asherie, 2004). No caso de macromoléculas biológicas, a solubilidade é também definida pelas características do solvente, que consiste geralmente de água contendo componentes químicos que levam a solução ao pH e força iônica desejados, como tampões e sais, respectivamente. Estes compostos podem afetar a solubilidade das proteínas: diretamente, pela interação com diferentes grupos funcionais da proteína, modificando a conformação da macromolécula ou indiretamente, através de modificações da estrutura e propriedades físico-químicas do solvente, por exemplo, mudando-se o pH, modifica-se a carga líquida da proteína (Riès-Kautt e Ducruix, 1992).

Um diagrama esquemático da curva de solubilidade, ilustrando como a solubilidade varia com a concentração do agente precipitante, é apresentado na Figura 2.1. A curva de solubilidade divide as regiões insaturada e supersaturada. Cristais de proteína dissolvem-se na região insaturada, em que a concentração está abaixo da solubilidade da proteína e crescem ou agregam-se na região supersaturada. Acima da curva de solubilidade, a concentração de proteína é maior do que a concentração de equilíbrio para uma dada concentração de sal. Na região metaestável, a supersaturação é pequena e a taxa de nucleação é tão lenta que nenhum cristal se formará mesmo por um longo período de tempo, a menos que a solução seja agitada ou cristais de proteína sejam adicionados (semeadura). Na zona de nucleação, a supersaturação é grande o suficiente para que ocorra uma nucleação espontânea. Próxima à região de precipitação, a cristalização pode ocorrer na forma de microcristais, que podem ser confundidos com precipitado. Finalmente, caso a supersaturação seja elevada, estruturas desordenadas, como agregados ou precipitados podem se formar.

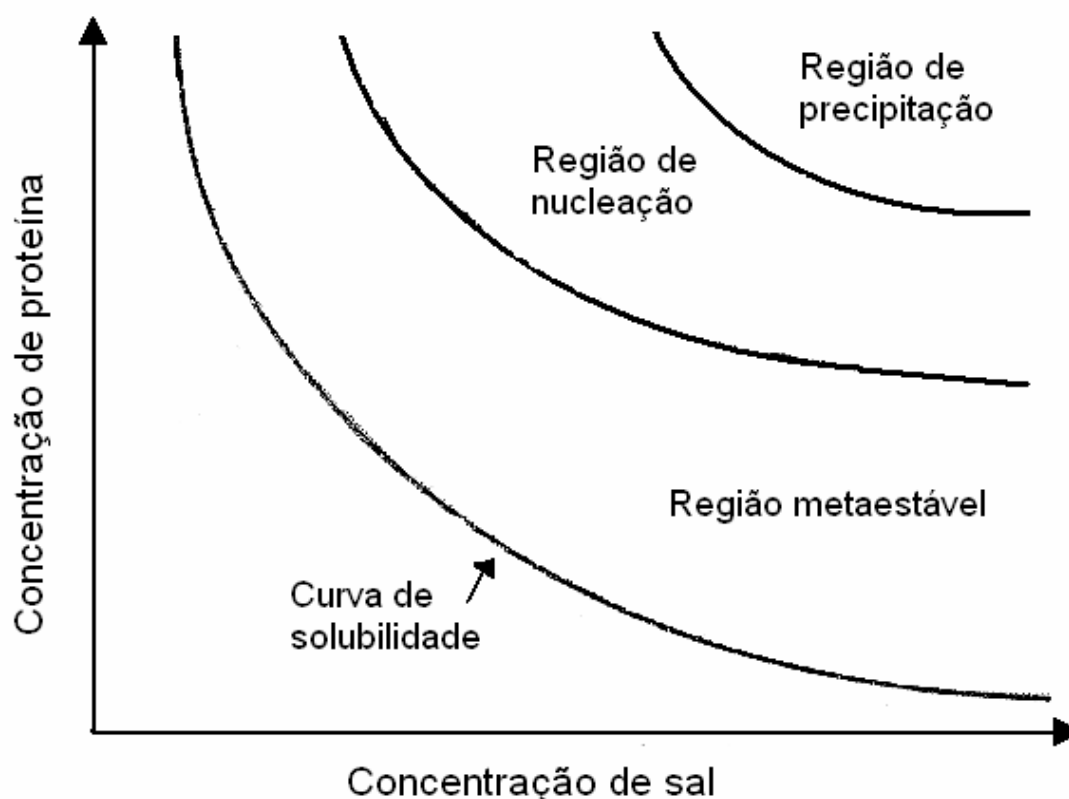


Figura 2.1: Ilustração de um diagrama de fase mostrando a solubilidade de uma proteína em solução em função da concentração do agente precipitante (Riès-Kautt e Ducruix, 1992).

Precipitados amorfos muitas vezes são considerados como estados de não-equilíbrio e análises termodinâmicas são menos definidas para a precipitação do que para a cristalização. No entanto, princípios termodinâmicos são freqüentemente empregados para análise da precipitação utilizando-se parâmetros determinados empiricamente. Por exemplo, a concentração residual de proteína na fase sobrenadante é largamente referida como solubilidade mesmo que uma menor concentração de proteína nessa fase líquida estivesse em equilíbrio com uma fase sólida cristalina (Cheng *et al.*, 2006). Cohn (1925) mostrou que o logaritmo dessa solubilidade varia com a concentração do agente precipitante, geralmente um sal. No entanto, segundo Riès-Kautt e Ducruix (1989)

esta relação é mais consistente para precipitados amorfos do que para sólidos cristalinos. Além disso, a solubilidade de lisozima na forma de cristal é menor do que a concentração de proteína na fase sobrenadante quando o precipitado é amorfo, mostrando que a fase cristalina é mais estável do que a fase densa (Moretti *et al.*, 2000). Outro exemplo de incerteza envolvendo o comportamento de fases da precipitação de proteínas foi notado por Shih *et al.* (1992). A solubilidade aparente medida nos experimentos de precipitação depende, em alguns casos estudados por esses autores, da concentração inicial de proteína, indicando que o valor medido não é a solubilidade verdadeira. Shih *et al.* atribuíram esse comportamento à fase densa, a qual foi considerada líquida e não sólida, como até então era caracterizada.

2.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS POR “SALTING-OUT”

2.2.1. Aspectos gerais da precipitação de proteínas por “salting-out”

A precipitação de proteínas em soluções aquosas, com posterior recuperação do precipitado, constitui uma das mais importantes operações unitárias de processos de recuperação e purificação de proteínas (Boychyn *et al.*, 2000). Para compreender como a precipitação de proteínas ocorre, é fundamental uma investigação sobre as forças que mantêm a conformação estável da proteína e sobre as perturbações causadas por solventes, pH, temperatura e força iônica à solução protéica.

As principais forças intra e entre as cadeias polipeptídicas que promovem a estabilidade conformacional da proteína no estado de energia mínima são: íon-íon, íon-dipolo (incluindo pontes de hidrogênio), dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas. As estruturas da proteína, quando em solução ou associadas a fibras insolúveis, são influenciadas pela natureza do meio aquoso. Assim, moléculas de água, bem como de outras substâncias polares do meio, irão competir com as interações dipolares da proteína. Os íons da solução podem romper as interações iônicas no polipeptídio. Substâncias hidrofóbicas do meio podem alcançar os centros hidrofóbicos da proteína, reorganizando a água ao redor desta. Em muitas

proteínas, o interior da estrutura é protegido do meio aquoso por aminoácidos hidrofóbicos, enquanto o exterior ou superfície da estrutura protéica interage com o meio através de resíduos polares aglomerados ou distribuídos no polipeptídeo. Pequenas áreas de grupos hidrofóbicos localizados na superfície podem causar exclusão local e reorganização da água enquanto a superfície restante será hidratada através da formação de interações íon-dipolo e dipolo-dipolo com grupos polares e iônicos da proteína (Dixon e Webb, 1961). Perturbações destas interações solvente-proteína podem causar transições na estrutura da proteína, rompendo algumas interações e promovendo outras. Se essas novas interações estabelecem-se em um outro mínimo de energia, poderá ocorrer uma mudança para uma outra condição na qual o interior da proteína pode ser desnovelado. Algumas perturbações que podem causar uma mudança conformacional da proteína são: o aumento da temperatura, que pode enfraquecer as interações dipolares como as pontes de hidrogênio e favorecer a formação de interações hidrofóbicas; o decréscimo ou aumento do pH, o qual pode ocasionar a protonação ou a dissociação de prótons de certos grupos da superfície da proteína, respectivamente e a adição de sais (Englard e Seifter, 1990).

A adição de sais é um dos métodos comumente utilizados para a precipitação de proteínas, em que a precipitação ocorre pela diminuição da solubilidade ocasionada pela dissolução do sal, chamada de “salting-out”. Nesta técnica de precipitação, os íons salinos competem com os grupos polares da proteína pelas moléculas de água e, uma vez parcialmente removida a camada de hidratação, as interações proteína-proteína, com destaque para as interações hidrofóbicas, se tornam relevantes levando à formação de agregados insolúveis (Scopes, 1988). Após a precipitação da proteína e subsequente separação das fases tem-se uma fase pobre em proteína (fase sobrenadante) e um precipitado rico em proteína que contém parte da fase pobre em proteína, devido à impossibilidade de uma separação sólido - líquido 100% eficiente. Caso uma separação completa das fases fosse possível, uma fase pobre em proteína e um precipitado livre da fase sobrenadante (fase pobre), que neste trabalho chamaremos de precipitado verdadeiro, seriam encontrados.

Ressalte-se que a fase líquida obtida após a precipitação da proteína será referida ao longo do trabalho como “fase sobrenadante”, enquanto que a mistura dessa fase e do sólido será referenciada apenas como “precipitado”, já que não se trata de uma fase em equilíbrio. A fase sólida obtida caso uma separação completa fosse conseguida foi aqui nomeada de “precipitado verdadeiro”.

O sal utilizado na precipitação por “salting-out” mais comumente relatado na literatura é o sulfato de amônio, devido à sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução (Deutscher, 1990). Aplicações recentes da precipitação de proteínas por “salting-out” usando o sal sulfato de amônio podem ser verificadas nos trabalhos de Nasiri *et al.* (2005) para extração de DNA genômico do sangue; de Freitas *et al.* (2006) para purificação de plasmídeo do DNA, utilizado para liberação de um gene terapêutico; de Yu *et al.*, (2007) para purificação de β -glucosidase extraída de sementes de maçã, de Zhang *et al.* (2007) para purificação do glutamato decarboxilase do germe de arroz e de Peckham *et al.* (2006) para a purificação de GFP (“green fluorescence protein”, proteína verde fluorescente) produzida de suspensão de células de tabaco. Outro sal utilizado na precipitação de proteínas é o sulfato de sódio, um sal efetivo para indução do “salting-out”, segundo Arakawa e Timasheff (1985). O sulfato de sódio foi usado para a indução da precipitação de proteínas nos estudos de Newcombe *et al.* (2005) e Karam *et al.* (2005) na purificação de imunoglobulinas G de soro ovino e de Y da gema de ovo de galinha, respectivamente. O cloreto de sódio é um sal frequentemente utilizado em precipitação e cristalização de proteínas, pois segundo Retailleau *et al.* (2002), ele possui efetividade intermediária para a indução desses processos de purificação, podendo ser utilizado como um sal de referência. Exemplos recentes de uso do cloreto de sódio podem ser verificados nos trabalhos de Poznański *et al.* (2005) no estudo de propriedades termodinâmicas da precipitação de lisozima de clara de ovo de galinha, como o coeficiente virial; Lui *et al.* (2007) na precipitação das proteínas de soja conglícinina e β -conglícinina e na precipitação de insulina animal (Miranda, comunicação pessoal).

2.2.2. Precipitação de proteínas com uso de sal volátil

A necessidade de um tratamento posterior à precipitação para recuperação do sal e purificação da proteína torna o processo de precipitação com uso de sais convencionais oneroso, além de limitado por questões ambientais, já que esse processo produz uma solução concentrada em eletrólito como resíduo. Por exemplo, o sulfato de amônio, largamente utilizado como agente precipitante é corrosivo e de difícil descarte, sendo que resíduos deste sal em alimentos só podem estar presentes em baixa quantidade, sendo tóxico para o uso farmacêutico (Bell *et al.*, 1983). Diante disso, o uso de sais voláteis, que migram à fase vapor com aumento de temperatura ou abaixamento da pressão da solução, pode contribuir para aumentar a viabilidade do processo de precipitação na purificação de proteínas pela diminuição do custo de operação. Como exemplos de sais voláteis pode-se citar o bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), o carbonato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) e o carbamato de amônio ($\text{NH}_4\text{NH}_2\text{COO}$).

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 da forma iônica. Assim, o eletrólito converte-se à forma molecular gasosa e poderia ser diretamente reutilizado, sem necessidade de purificação adicional.

A descrição termodinâmica de 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 considerar 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 de equilíbrio de uma solução de amônia e dióxido de carbono é mínima para uma razão entre nitrogênio e carbono próxima a 2,0 – equivalente a uma solução de carbamato de amônio. Assim, os dados permitem inferir que a condução dos experimentos de precipitação pode ser realizada como na precipitação com outros sais (como o sulfato de amônio), sendo necessária apenas a preocupação de vedar os recipientes em que ocorrerá a precipitação: embora a quantidade eventualmente perdida seja muito pequena, a manutenção contínua de um estado 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. 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):

$$R_{N/C} = \frac{m_{\text{NH}_3}^{(l)} + m_{\text{NH}_4^+} + m_{\text{NH}_2\text{COO}^-}}{m_{\text{CO}_2}^{(l)} + m_{\text{HCO}_3^-} + m_{\text{CO}_3^{2-}} + m_{\text{NH}_2\text{COO}^-}} \quad (2.5)$$

em que m_i é a molalidade da espécie i .

De acordo com as reações de dissociação e a definição da razão $R_{N/C}$ (Equações 2.1 – 2.5), considera-se uma solução de carbamato de amônio àquela que possui $R_{N/C}$ igual a 2,0, solução de bicarbonato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 1,0 e solução de carbonato de amônio comercial de $R_{N/C}$ igual a 1,4 – cabe salientar que o carbonato de amônio comercial não corresponde ao sal da fórmula $(NH_4)_2CO_3$, mas a uma mistura de bicarbonato e carbamato de amônio cuja fração de amônia é de aproximadamente 30% em massa. A razão $R_{N/C}$ influencia a solubilidade dos sais em água. De acordo com dados da BASF (1998, 1999, 2000), a solubilidade a 25 °C do carbamato de amônio é de 790 g/L, do carbonato de amônio é de 320 g/L e do bicarbonato de amônio é de 220 g/L.

A eficiência dos sais voláteis em um processo de precipitação por “salting-out” foi sugerida pela formação de sistemas aquosos bifásicos em substituição ao fosfato de potássio relatado por van Berlo *et al.* (2000). Apesar deste estudo, a utilização de sais voláteis para indução do “salting-out” em técnicas de separação foi iniciada apenas em 2004 pelo nosso grupo de pesquisa, com o trabalho de precipitação de tripsina (Watanabe, 2004), seguido pelo trabalho com lisozima e insulinas bovina e suína com uso de carbamato de amônio (Lima, 2006) e de equilíbrio de fases de lisozima utilizando-se carbamato de amônio neste trabalho; já a precipitação isoelétrica com ácidos ou bases voláteis é também recente, e estudos sistemáticos foram conduzidos somente sobre o uso de um ácido volátil, o dióxido de carbono, na precipitação isoelétrica de caseína (Tomasula *et al.*, 1997), de proteínas de soja (Hofland *et al.*, 2000) e de insulina suína (Tashima, 2007). O uso do ácido volátil dióxido de carbono e o solvente orgânico etanol também têm sido investigado para a precipitação de celulase e β -amilase (Yao *et al.*, 2004) e de albumina de soro bovino e lisozima (Qi *et al.*, 2004).

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

A diminuição da solubilidade da proteína com aumento da concentração de sal (efeito “salting-out”) pode ser expressa matematicamente através da equação de Cohn (1925):

$$\log S = \beta - K_S I \quad (2.6)$$

em que S é a concentração de equilíbrio da proteína em água em mg/g de água, K_S é uma constante específica do sal e da proteína (kg/mol) e β é uma constante que depende da temperatura, do pH e da proteína utilizada e I é a força iônica em mol de sal/kg de água, dada por:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i z_i^2 \quad (2.7)$$

em que z_i é a carga elétrica do íon e m_i é a molalidade da espécie i .

A equação de Cohn é válida para concentrações elevadas de sal e baixas concentrações de proteína e, nestas condições, exprime de modo satisfatório a concentração de equilíbrio da proteína em função da concentração de sal conforme se pode ver, por exemplo, nos dados de Watanabe *et al.* (2006) na precipitação de tripsina com uso de sais voláteis e sulfato de amônio (Figura 2.2).

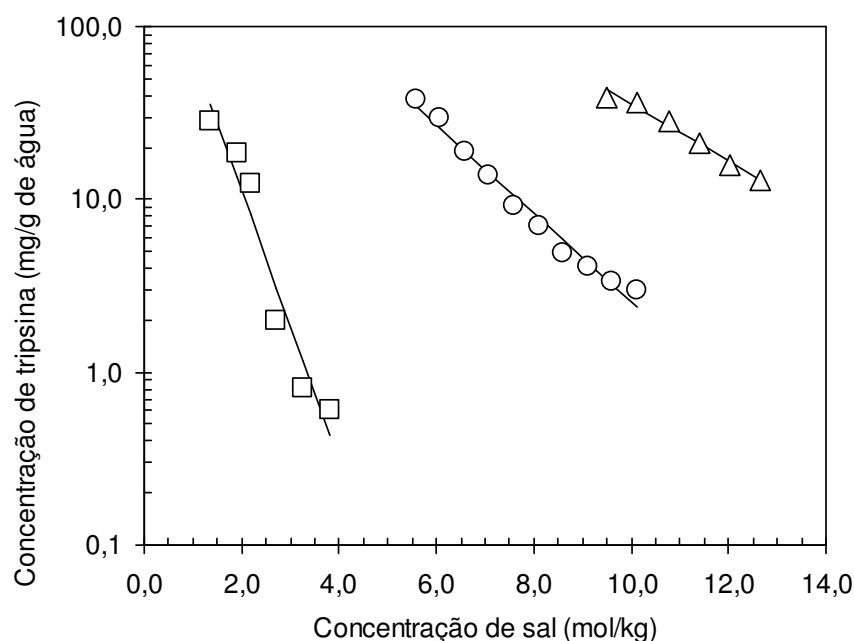


Figura 2.2: Concentrações de equilíbrio da tripsina suína a 4°C em solução de: carbamato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 2,0, ○; sulfato de amônio, □; sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5, Δ. Concentração inicial de tripsina de 40 mg/mL em solução de carbamato de amônio e em sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 e de 30 mg/mL em solução de sulfato de amônio (Watanabe *et al.*, 2006).

Melander e Horváth (1977) relacionaram o efeito da hidrofobicidade na solubilidade da proteína. De acordo com os autores, a precipitação de proteínas por “salting-out” pode ser descrita através de um balanço entre o fenômeno de “salting-in” (aumento da solubilidade da proteína com aumento da concentração de sal) devido a efeitos eletrostáticos do sal e o processo de “salting-out” devido aos efeitos hidrofóbicos:

$$\log S = \beta - (\Omega\sigma - \Lambda)I \quad (2.8)$$

em que Ω é uma constante dependente da área superficial hidrofóbica; σ é o incremento da tensão superficial molal e Λ está relacionado às interações eletrostáticas entre o sal e a proteína.

Comparando-se as equações 2.7 e 2.8, a constante K_S pode ser dada por:

$$K_S = \Omega\sigma - \Lambda \quad (2.9)$$

O tipo de sal utilizado para a indução do “salting-out” determina σ . De acordo com a Equação 2.9 um sal de elevada tensão superficial incremental molal tem também elevado valor de K_S , parâmetro que representa a efetividade do sal na precipitação de proteína (série de Hofmeister). O tipo de proteína essencialmente determina Ω e a magnitude de $\Omega\sigma$ geralmente é maior que Λ . Portanto, a máxima solubilidade da proteína é alcançada a baixas concentrações de sal, e esta solubilidade diminui rapidamente ao aumentar a concentração salina (Bell *et al.*, 1983).

No entanto, a teoria de Melander e Horváth (1977) é válida para proteínas de conformação inerte, o que pode levar a diferenças entre valores experimentais e teóricos do valor de K_S (Przybycien e Bailey, 1989b), pois pode haver mudanças na conformação protéica em virtude das interações proteína-sal em solução. Assim, para uma modelagem mais refinada da precipitação de proteínas por “salting-out”, as expressões de Cohn e de Melander e Horváth devem ser substituídas por outros modelos que considerem as interações proteína-sal e proteína-proteína. Além disso, para sistemas contendo alta concentração de proteína, a equação de Cohn também não é válida, pois o conceito de solubilidade

(concentração do soluto em um solvente estando o soluto em equilíbrio com o soluto sólido puro) não se aplica, já que o precipitado contém quantidades apreciáveis de sal e água. Neste contexto, Shih *et al.* (1992) introduziram um coeficiente de distribuição entre duas fases K_e para representar o equilíbrio de fases:

$$K_e = \frac{c^S}{c^P} \quad (2.10)$$

em que c^S e c^P são as concentrações de proteína na fase sobrenadante e no precipitado, respectivamente. Para uma determinada concentração salina, o coeficiente de partição da proteína, e não sua concentração na fase sobrenadante, torna-se uma função da concentração salina, já que tanto a fase sobrenadante quanto o precipitado são compostos de proteína, água e sal. Esse conceito do coeficiente de partição deve ser utilizado quando o precipitado se trata de uma mistura, enquanto que o conceito de solubilidade aplica-se apenas para precipitados puros. Assim, para um conhecimento mais preciso do fenômeno do “salting-out”, é necessário determinar experimentalmente a composição das fases em equilíbrio, de modo a também subsidiar a utilização de modelos mais consistentes.

A descrição termodinâmica do comportamento da precipitação de proteínas por “salting-out” requer o conhecimento de forças intermoleculares na solução protéica. Shih *et al.* (1992), conforme descrito acima, demonstraram que em algumas situações a precipitação de proteínas corresponde à formação de uma segunda fase aquosa. Em acordo com este fato, diversos trabalhos apresentam estudos termodinâmicos para a precipitação de uma proteína em presença de sal. Coen *et al.* (1995) determinaram as concentrações de proteínas (lisozima e α -quimotripsina) e seus coeficientes de partição em função da força iônica e pH e verificaram que o coeficiente de partição é dependente do pH para elevada força iônica. A descrição termodinâmica da precipitação por “salting-out” foi obtida através de interações específicas entre moléculas de uma proteína. Essas interações foram investigadas a partir do segundo coeficiente virial (B_{22}), determinado pela técnica de espalhamento de luz ou por pressão osmótica em membranas e relacionado ao potencial de força média (W) através de uma

abordagem segundo McMillan e Mayer (1945) composta de um termo de esferas rígidas como referência e um termo atrativo, o potencial de força média (detalhes sobre o coeficiente virial no Apêndice 1):

$$B_{22}(a_1, T) = B_{22}^{hs} - \frac{N_A}{2} \int_{d_2 + 3 \text{ \AA}}^{\infty} \left\{ \exp \left[-\frac{W(r, a_1^0, T)}{kT} \right] - 1 \right\} 4\pi r^2 dr \quad (2.11)$$

em que N_A é o número de Avogadro em 1/mol, r é a distância centro a centro entre duas partículas esféricas de diâmetro d , a_1^0 é a atividade do solvente puro. O limite inferior de integração $d+3 \text{ \AA}$ considera uma camada de água que circunda a proteína. B_{22}^{hs} é a contribuição da esfera rígida para o segundo coeficiente virial dada por:

$$B_{22}^{hs} = \frac{2\pi d^3}{3} \quad (2.12)$$

George e Wilson (1994) mostraram a importância do potencial de força média para a predição de condições favoráveis para a cristalização de proteínas. Os autores estabeleceram um intervalo de valores para B_{22} para a cristalização de soluções protéicas e determinaram que deveria ser entre $-2 \cdot 10^{-4}$ e $-8 \cdot 10^{-4}$ mL.mol/g². Para valores maiores que $-2 \cdot 10^{-4}$ mL.mol/g², a interação proteína-proteína não é suficientemente forte para a formação de cristais, enquanto que valores menores que $-8 \cdot 10^{-4}$ mL.mol/g², favorecem a formação de precipitados amorfos devido à forte atração proteína-proteína, de modo que as moléculas de proteína não são capazes de se orientar para a formação do cristal. Estudos posteriores utilizando o segundo coeficiente virial para a identificação das condições favoráveis à cristalização e precipitação foram realizados por Rosenbaum e Zukoski (1996), Curtis *et al.* (2002) e Demoruelle *et al.* (2002).

Destaca-se aqui que em todos esses trabalhos de modelagem termodinâmica, a abordagem é considerada “molecular”. Apesar da proteína ser dotada de carga, a descrição é feita somente em termos de interações específicas entre moléculas de proteínas.

2.3. DIAGRAMAS DE FASE

De maneira geral, os diagramas de fase são “mapas” que representam o estado de um sistema em função de suas condições como temperatura e concentração. Para soluções protéicas, essas variáveis são: a concentração de proteína, a temperatura e as características do solvente (pH, força iônica, concentração do tampão ou de qualquer outro aditivo). No contexto deste trabalho, diagramas de fases são representações de composições de fases em equilíbrio de sistemas mantidos a pH e temperatura constantes.

A eficiência de algumas operações biotecnológicas relevantes (por exemplo, precipitação de proteínas, separação de proteínas em duas fases aquosas, cristalização e renaturação de proteínas) depende da localização das fases nos diagramas de equilíbrio (Curtis e Lue, 2006). Diagramas de fase também revelam informações sobre as interações entre os componentes da solução e podem auxiliar na predição de condições, nas quais a proteína pode ser precipitada ou cristalizada, ou pelo menos, reduzir o número de condições que inicialmente devem ser examinadas (Asherie, 2004). Os diagramas de fase são também fundamentais para o entendimento e manipulação do comportamento de soluções protéicas, e muitas doenças podem ser relacionadas à agregação de proteínas e separação de fases, como as neurodegenerativas (como por exemplo, a doença de Alzheimer), catarata e anemia falciforme (Prausnitz, 2003). A obtenção de diagramas de fase completos é também de grande importância na modelagem dos sistemas. Caso ocorra a formação de uma única fase sólida, o potencial químico da proteína será igual para todas as concentrações das fases em equilíbrio, mas com a formação de mais de uma fase sólida no sistema, pode ocorrer uma variação descontínua do potencial químico. No entanto, caracterizar completamente o comportamento de fases de soluções protéicas é difícil pela variedade de fases densas que podem se formar, a cinética que determina a aproximação do equilíbrio, o caráter multicomponente da solução e as condições que necessitam ser ajustadas como temperatura, força iônica e tipo de agente precipitante (Cheng *et al.*, 2006).

Os diagramas de fase de processos de precipitação e cristalização freqüentemente determinados teórica e experimentalmente são aqueles que apresentam: (a) separação de fases líquido-sólido coexistindo com uma região metaestável líquido-líquido, como no caso da lisozima (Broide *et al.*, 1996; Muschol e Rosenberger, 1997; Carpinetti e Piazza, 2004); (b) uma pequena região dentro do diagrama de fases em que cristais de proteína podem ser mais facilmente obtidos (George e Wilson, 1994; Haas e Drenth, 1998; Manno *et al.*, 2003; Pellicane *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004) e (c) dados quantitativos de entalpia e entropia da proteína nas fases sólida e líquida através de relações termodinâmicas (Ross e Subramanian, 1981; Petsev *et al.*, 2003; Wszelaka-Rylik e Zielenkiewicz, 2006). Porém, dados experimentais para determinação de diagramas de fase completos contendo composições da proteína nas fases em equilíbrio ainda são raros, restringindo-se aos trabalhos de Dervichian (1949) com gelatina, Dervichian e Mossé (1953) com pseudoglobulinas e albumina de soro, de Coen *et al.* (1995) com quimotripsina e lisozima de ovo e de Moretti *et al.* (2000) com lisozima de ovo. Ainda mais raros são os diagramas de fase que apresentam as composições do sólido e análises do tipo de precipitado encontrado (cristal, agregado amorfo, gel ou coacervado) como foram realizados por Dervichian (1949) e Moretti *et al.* (2000). Exemplos de diagramas de fase são apresentados nas Figuras 2.3 e 2.4. O conhecimento da composição e morfologia do sólido encontrado nos processos de precipitação e cristalização é importante para a escolha do melhor sistema a ser utilizado em processos de purificação, já que sólidos de proteína cristalina contendo baixas concentrações de impurezas (sal, por exemplo) são mais adequados pela necessidade de menor número de técnicas de purificação subseqüentes.

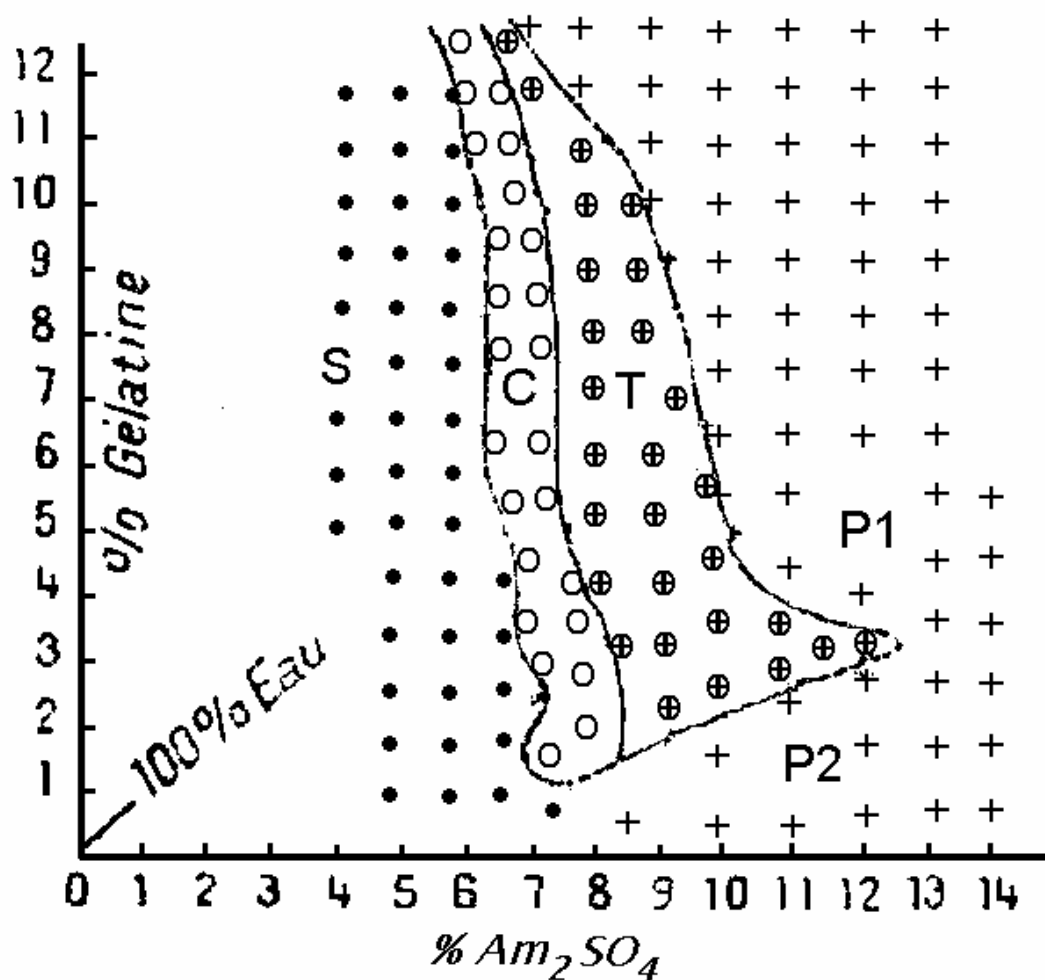


Figura 2.3: Diagrama de fase do sistema gelatina-sulfato de amônio-água em pH igual a 4,0 e temperatura de 37°C. Região S: região de uma única fase; região C: duas fases coexistentes (solução e coacervado); região T: região de três fases (coacervado, solução e precipitado); regiões P₁ e P₂: solução rica em sal em equilíbrio com o precipitado (Dervichian, 1943).

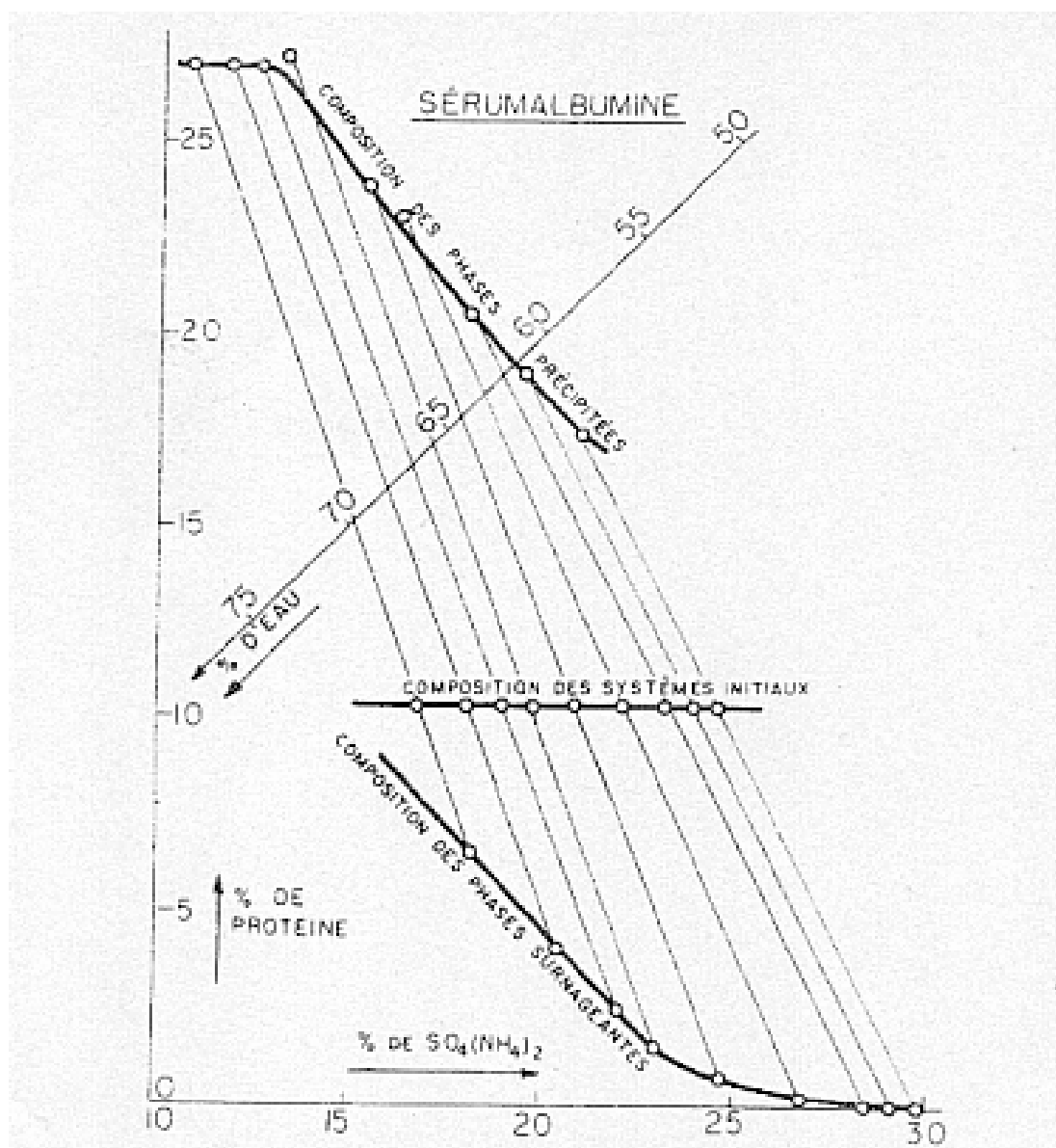


Figura 2.4: Diagrama de fase do sistema albumina de soro-sulfato de amônio-água (Dervichian e Mossé, 1953).

2.4. LISOZIMA

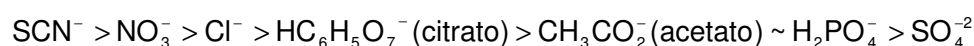
A lisozima é definida como a 1,4- β -N-acetilmuramidase que rompe as ligações glicosídicas entre o C-1 do ácido N-acetilmurâmico e o C-4 da N-acetilglucosamina em peptídeoglicano de bactérias (Jollès e Jollès, 1984). Esta proteína possui massa molecular de cerca de 14,6 kDa, ponto isoelétrico aproximadamente igual a 11,35 e está presente na clara do ovo, lágrima, saliva, leucócitos e no soro humano (Osserman, 1967). A lisozima é assim chamada porque pode “lisar” ou degradar as paredes celulares protetoras de algumas famílias de bactérias, atuando como agente bactericida (Lehninger *et al.*, 1995), aditivo alimentício e em fármacos para o tratamento de úlcera e infecções (Su e Chiang, 2006). Além disso, é uma das proteínas mais extensivamente estudadas na precipitação e cristalização devido à sua disponibilidade, à facilidade com que pode ser precipitada e cristalizada, à possibilidade de obtenção de múltiplos cristais e à disponibilidade de informações sobre a solubilidade de cristais em função da concentração de sal, pH e temperatura (Moretti *et al.*, 2000).

A lisozima foi primeiramente cristalizada em condições ácidas por Alderton e Fevold (1946) em cloreto de sódio e posteriormente em sulfato de amônio contendo tampão acetato. Porém, tem sido sugerido que esta cristalização da lisozima em sulfato de amônio ocorreu pela presença de acetato e não do sal sulfato de amônio (Riès-Kautt *et al.*, 1994). Apesar de o sulfato de amônio ser largamente utilizado como agente precipitante de lisozima, a cristalização da proteína com o uso deste sal foi obtida apenas recentemente. Esforços para a cristalização de lisozima em sulfato de amônio foram realizados por Riès-Kautt e Ducruix (1989), os quais, no entanto, obtiveram um gel devido às altas concentrações de proteína e sal utilizadas. Riès-Kautt *et al.* (1994) obtiveram cristais de proteína em ânion sulfato a partir de lisozima dessalinizada e, posteriormente, Forsythe *et al.* (1997) foram capazes de cristalizar lisozima em sulfato de amônio no intervalo de pH de 4,0 a 7,8 utilizando elevada concentração de proteína e baixa concentração de sal (menor que 0,6 mol/L). Forsythe *et al.* (1997, 1999) verificaram que a morfologia de cristais de lisozima obtidos em sulfato de amônio varia com a concentração inicial de proteína. Concentrações de lisozima inferior a 100 mg/mL originam cristais tetraédricos, enquanto que

concentrações maiores de 150 mg/mL fornecem grande quantidade de cristais ortorrômnicos frágeis. Além disso, mudanças na morfologia dos cristais de lisozima podem ser verificadas também em função da temperatura. Estudos de Guilloteau *et al.* (1992), Rosenberger *et al.* (1993), Forsythe e Pusey (1994), Forsythe *et al.* (1999) mostraram que à temperatura de 15,0°C cristais tetraédricos e ortorrômnicos foram encontrados, enquanto que acima de 25,0°C somente cristais de lisozima ortorrômnicos se formaram.

A solubilidade da lisozima cristalizada foi avaliada em função de parâmetros como concentração de sal, pH, temperatura e tipo de sal. A solubilidade da proteína sempre diminui com o aumento da concentração de sal; a região de “salting-in”, não foi relatada até 1997 por Rettaileau *et al.* e uma busca recente da bibliografia disponível também não encontrou outros indícios de tal fenômeno para esta proteína. No caso de cristais tetraédricos, a solubilidade da lisozima em cloreto de sódio foi determinada e nenhuma tendência em relação ao pH foi revelada, sendo que a solubilidade parece variar com a concentração do agente precipitante, enquanto os cristais ortorrômnicos mostraram diminuição da solubilidade com aumento de pH (Ataka e Tanaka, 1986; Cacciopo e Pusey, 1991; Ewing *et al.*, 1994). Quanto à temperatura, a solubilidade de lisozima aumenta com elevação da temperatura e maior variação da solubilidade é verificada em baixa força iônica (Howard *et al.*, 1988).

A efetividade dos sais para precipitar e cristalizar lisozima está relacionada com seus ânions e cátions, representada pela série de Hofmeister. Estudos de Ataka e Tanaka (1986), Riès-Kautt e Ducruix (1989), Rettaileau *et al.* (2002) e Bénas *et al.* (2002) mostraram que o íon cloreto é mais efetivo do que íon acetato ou citrato na diminuição da solubilidade da lisozima – ou seja, o inverso da série de Hofmeister. Isso sugere que a efetividade dos ânions na diminuição da solubilidade da lisozima cristalizada diminui conforme:



Porém, ainda não há uma teoria específica para explicar as causas desse fenômeno e algumas tentativas nesse sentido têm sido realizadas. Segundo Riès-Kautt e Ducruix (1997), proteínas ácidas ($\text{pI} < 7,0$) a pH acima do seu ponto

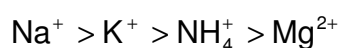
isoeletrico (pI) seguem a série de Hofmeister, enquanto proteínas básicas (pI > 7,0), como a lisozima, a pH abaixo do seu pI, seguem o reverso da série de Hofmeister. Esses autores propõem que as ligações entre ânions do sal e resíduos básicos das proteínas ocorrem por um processo análogo à adsorção, tal qual ocorre em cromatografia, em que as proteínas básicas são adsorvidas pelos grupos sulfônicos da matriz. No caso de proteínas básicas, como a lisozima, que possuem carga líquida positiva, a adsorção dos ânions pelos resíduos básicos diminuiria a carga líquida, tornando a proteína “menos positiva” e, conseqüentemente diminuindo a sua solubilidade. Por outro lado, a adsorção de ânions às proteínas ácidas, que possuem carga líquida negativa e resíduos básicos, implicaria em um aumento da carga líquida e da solubilidade.

No entanto, a consideração de adsorção feita por Riès-Kautt e Ducruix (1997) não explica por que proteínas interagem diferentemente em ânion tiocianato (SCN^-) e cloreto (Cl^-). Para tal, experimentos de espalhamento de luz de solução de lisozima para a caracterização da influência de diferentes sais nas interações proteína-proteína foram realizados por Ducruix *et al.* (1996), Muschol e Rosenberger (1996) e Chodankar *et al.* (2007). De acordo com esses autores, as interações proteína-proteína em uma solução concentrada em lisozima a pH 4,5 são repulsivas e com a adição de sal essas interações tornam-se atrativas. A eficiência em alterar as interações de repulsão para atração é dependente do ânion, seguindo o reverso da série de Hofmeister.

Boström *et al.* (2003) e Moreira *et al.* (2006) introduziram um termo de potencial de dispersão iônico, que atua entre cada íon e a interface da proteína, para esclarecer a diferença na especificidade do íon pela proteína. A altas concentrações de sal, a distância entre as espécies carregadas diminui e ocorrem mais ligações iônicas e aglomeração de sal na superfície da proteína. Aumentando-se ainda mais a concentração de sal, as proteínas são protegidas por uma camada de íons, que faz com que as proteínas comportem-se como moléculas de dipolo neutro (Melander e Horváth, 1977). Nessa condição de elevada concentração de sal, essa camada de proteção reduz o potencial eletrostático e o potencial de dispersão iônico domina completamente a interação. Através de cálculos desse modelo, consistentes com dados experimentais de

lisozima em soluções de sais tiocianato e cloreto de sódio, Boström *et al.* (2003) e Moreira *et al.* (2006) determinaram um potencial de dispersão iônico (atrativo) mais forte para o SCN^- comparando-se com o Cl^- , o que poderia ser uma das razões para que a interação proteína-proteína seja mais atrativa em presença de íons tiocianato do que em íons cloreto. Uma outra possibilidade para maior efeito do ânion SCN^- em relação ao Cl^- em solução de lisozima foi abordada por Boström *et al.* (2005), considerando os efeitos dos íons como contra-íons e co-íons. Segundo esses autores, os ânions do sal são considerados contra-íons em solução de proteína a pH inferior ao valor do pI da proteína, enquanto que estes ânions são co-íons em solução protéica a pH superiores ao pI da proteína. Abaixo do ponto isoelétrico ocorre uma forte adsorção de contra-íons tiocianato. Isso leva a uma redução do número total de íons entre as interfaces da proteína e uma redução da repulsão, quando comparada ao caso correspondente com íons cloreto. Acima do ponto isoelétrico pode ocorrer uma adsorção de co-íons tiocianato. Isso leva a uma maior concentração de contra-íons (Na^+) entre as duas superfícies das proteínas. Nessa situação, a adsorção do co-íon SCN^- é menor do que Cl^- , conforme pode ser observado na Figura 2.5.

Quanto aos cátions, considerando-se ainda os efeitos dos íons dos sais como contra e co-íons, Boström *et al.* (2005) verificaram que abaixo do ponto isoelétrico da lisozima (cátions são co-íons) ocorre um aumento da repulsão entre as proteínas ao substituir o cátion Na^+ pelo cátion K^+ . Isso explicaria os resultados de Ataka e Tanaka (1986), Riès-Kautt e Ducruix (1989), Rettaileau *et al.* (2002) e Bénas *et al.* (2002), que observaram uma diminuição da solubilidade de cristais de lisozima com o aumento da eletronegatividade de acordo com a seguinte ordem, a qual concorda com a série de Hofmeister:



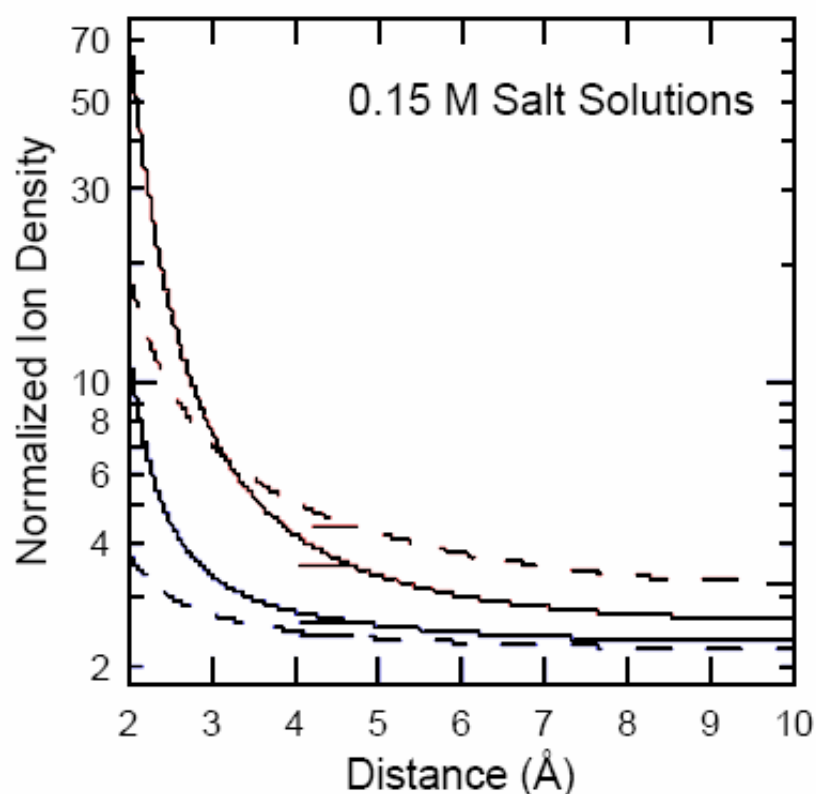


Figura 2.5: Densidade de íons (ânions e cátions) em relação a duas superfícies (carregadas com a mesma densidade de cargas e grupos carregados da lisozima) separadas a 20 Å . As duas curvas superiores foram determinadas a pH igual a 4,0, enquanto as duas curvas inferiores a pH igual a 12. As linhas sólidas correspondem a estudos com NaSCN e as linhas tracejadas a estudos com NaCl (Boström *et al.*, 2005).

Estudos de solubilidade de lisozima precipitada por “salting-out” em função de concentração inicial de proteína, pH e tipo de sal são mais escassos, limitando-se ao trabalho de Shih *et al.* (1992). O efeito do pH foi verificado e uma redução da solubilidade foi verificada para valores de pH menores que 5,0. Resultados experimentais demonstraram que a solubilidade da proteína precipitada é fortemente dependente do ânion, sendo que sais com ânions polivalentes são mais efetivos para a indução do “salting-out” e que estes seguem a ordem de

Hofmeister. Quanto à concentração inicial de proteína, a solubilidade da lisozima mostra-se independente deste parâmetro, ou seja, a valores fixos de concentração de sal e pH, a concentração de lisozima na fase sobrenadante é independente da concentração inicial. Resultados experimentais de Shih *et al.* (1992) mostraram que a concentração de proteína no precipitado também é independente da concentração inicial de proteína.

A determinação experimental de diagramas de fases de sistemas contendo lisozima também é rara, destacando-se os trabalhos de Coen *et al.* (1995) e Moretti *et al.* (2000). Este último obteve diagramas completos de lisozima em sulfato de amônio em pH iguais a 4,0 e 8,0 e precipitados na forma de agregado amorfo, cristalino e gel, demonstrando a dificuldade inerente em distinguir a fase de equilíbrio verdadeiro de uma morfologia ocasionada pela cinética.

A cinética da precipitação e cristalização de lisozima em sulfato de amônio foi avaliada por Cheng *et al.* (2006), que observaram que a concentração de lisozima na fase líquida, após a cristalização, representa a solubilidade da proteína no equilíbrio verdadeiro, e que a precipitação corresponde a uma separação metaestável líquido-líquido frustrada pela presença de flocos e agregados de proteína, sendo o precipitado uma fase líquida densa interrompida cineticamente. A relação entre a formação de agregados na precipitação devido à separação metaestável líquido-líquido já tinha sido sugerida por Muschol e Rosenberger (1997) e Tanaka *et al.* (1997), que determinaram que a curva em que coexistem duas fases líquidas localiza-se abaixo da curva sólido-líquido e que, no interior da região de duas fases líquidas, ocorre um aumento da nucleação e formação de precipitados microcristalinos (Figura 2.6). Externamente a esta região, uma transição sol-gel foi encontrada a altas concentrações de sal. A separação de fases líquido-líquido e a formação de géis estão relacionadas às duas formas freqüentemente encontradas: turvação e precipitado amorfo. A formação de precipitado amorfo é atribuída à rápida agregação que prevalece em condições de supersaturação. Segundo Muschol e Rosenberger (1997) uma possível razão para a formação de precipitados amorfos é a presença de uma transição sol-gel dentro da região em que coexistem sólidos e líquidos.

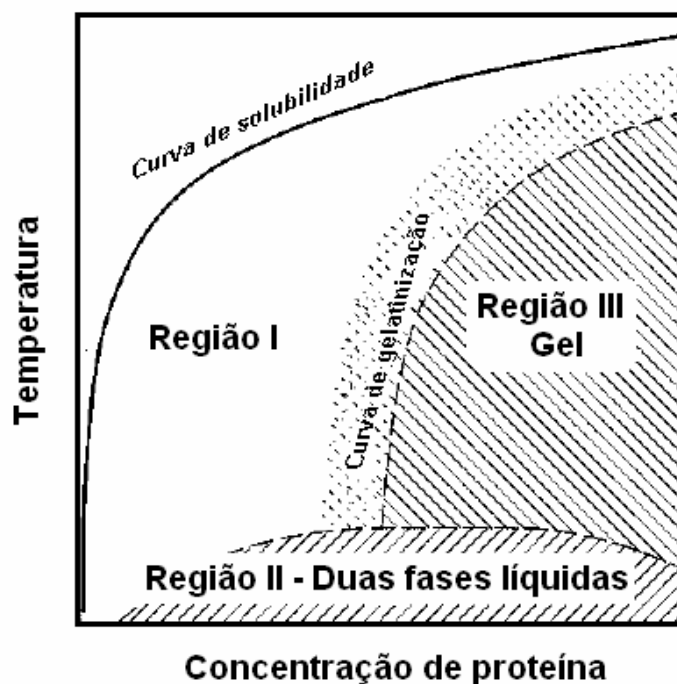


Figura 2.6: Diagrama de fases para proteínas globulares. Condições da solução abaixo da curva de solubilidade são metaestáveis considerando-se a cristalização. Região I: região ótima para a cristalização da proteína. Região II: separação em duas fases líquidas metaestáveis imiscíveis (formação de um precipitado de turvação). Na região da curva de gelatinização, formação incompleta do gel (precipitado amorfo). Formação de gel na Região III (Muschol e Rosenberger, 1997).

2.5. ALBUMINA

A albumina consiste de uma única cadeia polipeptídica de massa molecular igual a 67 ± 2 kDa. A albumina de plasma bovino possui entre 566 a 621 resíduos de aminoácidos, enquanto que a albumina humana contém entre 569 a 613 resíduos de aminoácidos (Spector, 1975). A palavra albumina deriva do latim *albus*, branco, devido à albumina de ovo, a qual parece branca após a coagulação.

Albumina é a mais abundante proteína encontrada no sistema circulatório e presente no sangue em concentrações de 5 g/100 mL, contribuindo por 80% da pressão osmótica sangüínea. Além disso, a albumina é uma proteína de transporte multifuncional e, sobretudo, responsável pela manutenção do pH sangüíneo (Michnik *et al.*, 2005). Ela está localizada em todos os tecidos e secreções do corpo, com a proteína extracelular contendo 60% da albumina total. Em mamíferos, a albumina é sintetizada pelo fígado e possui uma meia-vida de 19 dias na circulação. Apesar da grande importância da albumina na circulação do plasma, a ausência de albumina ou analbuminemia, ainda que rara, tem sido observada em muitos indivíduos. A albumina se expressa nesses indivíduos, porém em baixo nível. Manifestações clínicas de analbuminemia não são completamente entendidas, mas incluem fadiga crônica, hiperlipidemia e, em ratos, um aumento à suscetibilidade a câncer (Carter e Ho, 1994).

As principais características da albumina são:

- (1) caráter ácido, já que o ponto isoelétrico da proteína, quando ligada a ácidos graxos é de aproximadamente 4,8;
- (2) elevada solubilidade, pois soluções de 30% (m/v) de albumina em pH neutro são facilmente preparadas e usadas em sorologia. A albumina em soluções de pH na faixa de 6,0 - 7,0 é solúvel em altas concentrações de sulfato de amônio (até 2,1 mol/L) ou em etanol (até 40% v/v) a -5°C, mas pode ser precipitada por adição de ácido em pH 5,0. A proteína albumina possui elevada solubilidade em altas temperaturas e sua recuperação a partir de soluções de etanol pode ser realizada diminuindo a temperatura de -5 a -15°C (Peters Jr., 1985);
- (3) alta estabilidade, sendo que a molécula pode suportar aquecimento de até 60°C por 10 h na presença de estabilizantes como ácido caprílico. Na faixa de pH 1,0 - 2,0, a molécula de albumina expande-se e alonga-se, podendo retornar para a sua configuração nativa reversivelmente. Albumina é relativamente estável a pH 9,0 - 11,0, mas pode sofrer desamidação (Peters Jr., 1985).

A albumina pode ser obtida através de precipitação de plasma sangüíneo por adição de sais conforme relatado por Butler *et al.* (1935), que obtiveram albumina através da precipitação de plasma com sulfato de potássio de

concentração de 2,0 a 3,0 mol/L; Chanutin e Curnish (1960) também obtiveram albumina com a precipitação de plasma em pH 4,2 por “salting-out” com cloreto de sódio a 1,0 mol/L.

Shih *et al.* (1992) estudaram o efeito da concentração inicial de albumina de soro bovino em sua solubilidade, definindo o coeficiente de distribuição (Equação 2.10) para explicar os resultados que sugerem a dependência da solubilidade da proteína em relação a sua concentração inicial: para um valor constante de concentração de sal e pH, as concentrações de albumina nas fases sobrenadante (c^S) e precipitado (c^P) são proporcionais à concentração inicial de proteína. O coeficiente de distribuição é constante e independente da concentração inicial de proteína. Shiau e Chen (1997) analisaram o efeito da concentração inicial de proteína e observaram um pico de solubilidade para a albumina precipitada com sulfato de amônio. Uma possível razão dada pelos autores para o aumento da solubilidade e posteriormente sua queda foi: a uma concentração de sal constante, uma elevada concentração inicial de proteína induziria a formação de partículas maiores, porém em menor quantidade e, portanto, uma menor área superficial total estaria disponível para a precipitação. Dessa forma, ocorreria um aumento da solubilidade com aumento da concentração inicial de proteína. No entanto, o tamanho das partículas se reduziria, pois agregados maiores tenderiam a se partir devido às forças hidrodinâmicas impostas. A quebra dos agregados aumentaria a área superficial para a precipitação de moléculas, reduzindo a solubilidade da albumina.

A albumina pode ser facilmente cristalizada. Albumina eqüina foi primeiramente cristalizada em 1894, e a cristalização é empregada como uma etapa de purificação em escala industrial. O processo inicia-se com a redução do pH até o ponto isoelétrico da proteína, com aditivos como decanol, apesar de ser possível a obtenção de cristais sem a presença de aditivos (Peters Jr., 1985). Cristalização da albumina de soro bovino em sulfato de amônio foi realizada por Tessie *et al.* (2002) e Jia e Liu (2005).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

A lisozima de clara de ovo de galinha (L6876), três vezes cristalizada, dialisada e liofilizada foi obtida da Sigma (Alemanha e EUA) e utilizada sem purificação adicional. A pureza da lisozima fornecida pelo fabricante foi de 95%, sendo que as principais impurezas são os sais acetato de sódio e cloreto de sódio. A albumina de soro bovino (A7906), liofilizada e de pureza superior a 98% foi obtida da Sigma (Alemanha).

O sal sulfato de amônio de pureza superior a 99,5% foi obtido da Merck (Alemanha), contendo cálcio (menos de 0,001%) como principal impureza. O sal sulfato de sódio de pureza maior que 99%, tendo o potássio (menos de 0,002%) como principal impureza foi obtido da Merck (Alemanha). O sal carbamato de amônio de 99% de pureza foi obtido da Aldrich (Alemanha). Hidróxido de sódio e ácido fosfórico utilizados para o ajuste de pH foram obtidos da Merck (Alemanha). Os reagentes Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 utilizados para o preparo das soluções tampão foram obtidos da Riedel-de Hën e Merck (Alemanha). Para o preparo de solução tampão, tris(hidroximetil)aminometano foi obtido da Merck (Alemanha). Para os ensaios de atividade da lisozima utilizou-se o substrato *Micrococcus lysodeikticus* (M3770) da Sigma (EUA).

3.1.2. Equipamentos

Durante os ensaios de equilíbrio de fases, todas as soluções (proteína, sal, tampão, soluções ácida e básica) foram dosadas através de medida de massa realizadas em balanças analíticas Metler Toledo (EUA) e Quimis (Brasil). Água ultrapura utilizada nos ensaios foi obtida com a utilização do aparelho Milli-Q da Millipore (EUA). O pH das soluções foi medido através de pHmetros modelo PMX3000 da WTW (Alemanha) e modelo WD-35616 da Oakton (EUA). A temperatura foi mantida constante através de banhos termostáticos modelo F25 da Julabo (Alemanha) e TE-2000 da Tecnal (Brasil). Centrífugas Heraeus Sepatech (Alemanha) e modelo 5804R da Eppendorf (Alemanha) foram utilizadas para a separação da fase sobrenadante e do precipitado após o equilíbrio de fases. Para a determinação da quantidade de proteína em cada fase, medidas de absorbância foram obtidas através de espectrofotômetros modelo 8452A da Hewlett Packard (EUA) e modelo DU650 da Beckman (EUA). Concentrações de sulfato de amônio e sulfato de sódio na fase sobrenadante foram determinadas em cromatógrafo iônico (modelo HIC-6A, Shimazu, Alemanha) com o uso de uma coluna de troca aniônica modelo I-524A da Shodex (Alemanha) e por condutividade através do condutivímetro modelo DM-31 da Digimed (Brasil). A remoção de água do precipitado foi realizada através de liofilização no equipamento modelo GT2 da Lyovac (Alemanha) e modelo L101 da Liobras (Brasil). A determinação de sulfato de sódio foi realizada através de incineração em mufla Heraeus Sepatech (Alemanha). A morfologia do precipitado foi examinada em microscópio óptico Leitz Orthoplan (Alemanha). Variações na vazão de sal adicionado à solução de proteína foram realizadas através do equipamento Dosimat 665 da Metrohm (Suíça).

O espectrofotômetro modelo DU650 da Beckman (EUA) foi também utilizado para a determinação da atividade enzimática. Durante esses ensaios, a temperatura foi mantida constante com o auxílio de um banho termostático TE-2000 da Tecnal (Brasil).

3.2. PROCEDIMENTOS

Os procedimentos de preparo das soluções de proteínas e sais, de precipitação das proteínas lisozima e BSA e de determinação dos componentes da fase sobrenadante e do precipitado são apresentados em detalhes a seguir. Estes procedimentos estão também sintetizados na Figura 3.4.

3.2.1. *Preparo das soluções de proteína e sal*

Soluções de lisozima e BSA em água foram preparadas e o pH ajustado para o valor desejado através de adição de soluções de hidróxido de sódio ou ácido fosfórico. Como a solução de lisozima e BSA em água resultaram em soluções de pH aproximadamente 4,0 e 7,0, respectivamente, para ensaios a estes valores de pH, nenhum ajuste de pH foi necessário. Para a solução de lisozima a pH igual a 2,0, elevada quantidade de ácido fosfórico foi adicionada à solução de proteína para se alcançar o pH desejado, o que pode ter levado a alguma interferência do ácido nas medidas de concentração dos sais sulfato de amônio e sulfato de sódio. Soluções tampão de pH igual a 2,0, 4,0, 7,0 e 9,0 foram preparadas utilizando-se Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e H_3PO_4 nas devidas proporções e adicionadas à solução de lisozima e BSA para manutenção do pH desejado. Para a solução de BSA de pH igual a 9,0, solução tampão tris(hidroximetil)aminometano-HCl 0,020 mol/L foi preparada e adicionada à solução protéica.

Soluções de sais foram preparadas em água em concentrações próximas aos seus valores de saturação. No caso do sulfato de sódio, para se alcançar altas concentrações de sal na precipitação, em alguns ensaios o sal foi utilizado na sua forma cristalina. As concentrações mássicas iniciais de proteína e sal são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Concentrações mássicas iniciais das soluções de proteínas e sais utilizados nos sistemas de equilíbrio de fases.

Sistema		Concentração inicial de solução de sal (g sal/g água)	Concentração inicial de solução de proteína (g proteína/g água)
Proteína - Água	Sal		
Lisozima - Água	Sulfato de amônio	0,40	0,15
	Sulfato de sódio	0,20	0,20
		Sal cristalino	0,05
	Cloreto de sódio	0,25	0,15
	Carbamato de amônio	0,35	0,15
BSA - Água	Sulfato de amônio	0,40	0,20

3.2.2. Precipitação das proteínas

A precipitação das proteínas foi realizada segundo um protocolo que consistiu em adicionar diferentes massas de solução de sal gota a gota a diferentes massas de solução de proteína contidas em tubos de centrífuga, de modo a produzir 5 g de uma mistura de composição desejada (Figura 3.1). No caso do sulfato de sódio, sal na forma cristalina foi adicionado à solução de proteína para obter elevada concentração de sal. A seguir, a mistura foi mantida sob agitação à temperatura constante (5,0, 15,0 e 25,0°C) em banho termostático por aproximadamente 24 h para a temperatura de 25,0°C e de 96 h para os ensaios realizados a 5,0 e 15,0°C. Intervalos de tempo diferentes dependendo da temperatura, determinados neste trabalho, foram necessários para que se alcançasse o equilíbrio do sistema (dados não apresentados). Após atingir o

equilíbrio, a fase sobrenadante e o precipitado foram separados por centrifugação a 2000 g durante 3 h. Com o auxílio de uma seringa acoplada a um filtro de tamanho de poro de 0,2 μm , a fase sobrenadante foi retirada e medida de massa dessa fase realizada, enquanto que o precipitado permaneceu no tubo de centrífuga, para posterior dissolução em água e determinação dos componentes dessa mistura sólida.

Na precipitação de proteína no sistema lisozima - sulfato de amônio - água a pH igual a 10,0, a dessorção de amônia para o ambiente pode ter ocorrido devido ao alto valor de pH da solução protéica.

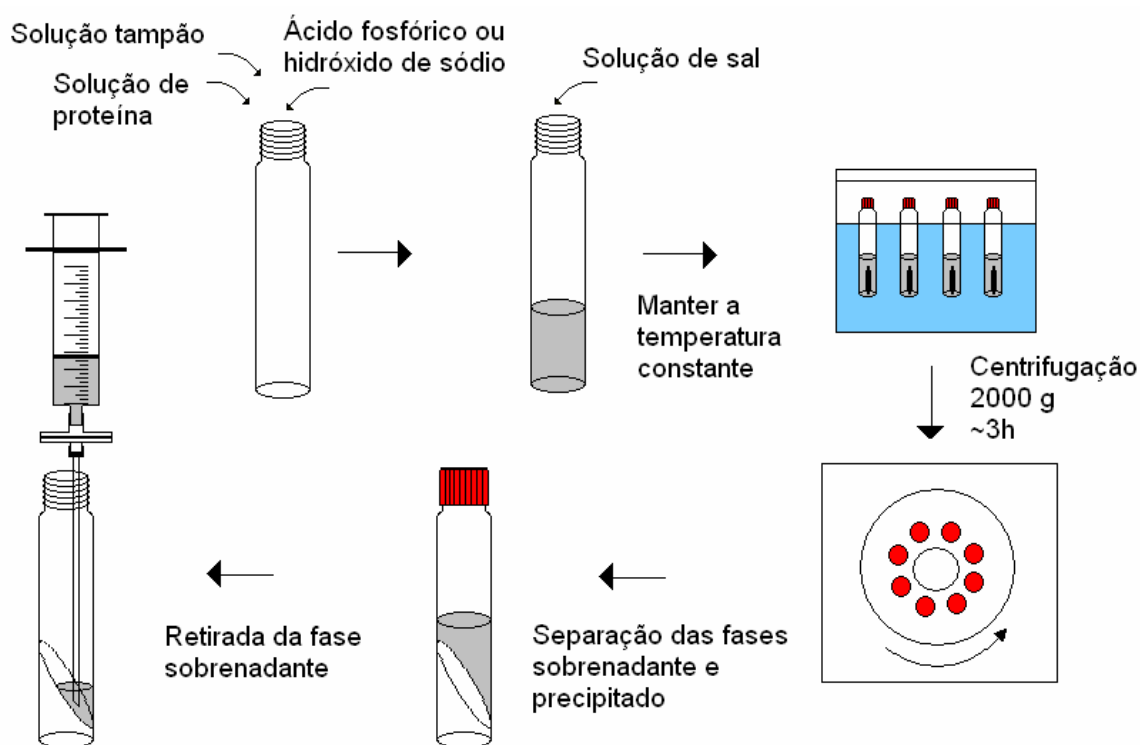


Figura 3.1: Ilustração da metodologia utilizada para a precipitação das proteínas.

3.2.3. Determinação das concentrações de proteína, água e sal na fase sobrenadante

Para a determinação da concentração de proteína na fase sobrenadante, uma alíquota desta fase foi diluída de 10 a 200 vezes em água e medidas de absorbância foram realizadas (Figura 3.2). Para baixas concentrações de proteína na fase sobrenadante (0,001 a 0,1 mg proteína/g água) foi utilizado o comprimento de onda de 205 nm, enquanto que para concentrações maiores de proteína (0,1 a 0,8 mg proteína/g água), medidas de absorbância foram realizadas a 280 nm. Devido à maior concentração de sal na fase sobrenadante, curvas de calibração considerando a influência do sal nas absorbâncias a 205 e 280 nm foram determinadas (Apêndice 2). Para os sistemas lisozima-carbamato de amônio-água e lisozima-cloreto de sódio-água, medidas de concentração de proteína na fase sobrenadante foram realizadas utilizando-se apenas o comprimento de onda de 280 nm, devido à elevada influência do sal nas medidas a 205 nm. A incerteza experimental na determinação da concentração de proteína (desconsiderando-se o fator de diluição) é de aproximadamente $2,0 \cdot 10^{-4}$ g/g.

A determinação da quantidade de sal sulfato de amônio e sulfato de sódio na fase sobrenadante foi realizada de duas maneiras distintas, de acordo com a disponibilidade de equipamentos encontrados na Alemanha e no Brasil, sendo que a concentração de sulfato de amônio e sulfato de sódio foi obtida por cromatografia de troca iônica na TU – KL (Alemanha) e por medida de condutividade na UNICAMP (Brasil). As concentrações de carbamato de amônio e cloreto de sódio na fase sobrenadante foi determinada apenas por condutividade. Através da cromatografia de troca iônica, a concentração de íons sulfato foi determinada aplicando-se a metodologia segundo Crompton (1996). O eluente utilizado na cromatografia era composto de uma solução aquosa de 2,0 mmol/L de ácido ftálico, 1,84 mmol/L de tris(hidroximetil)aminometano e 300 mmol/L de ácido bórico. Solução de nitrato de sódio de concentração 0,01 g nitrato de sódio/g água foi utilizado como solução padrão. A incerteza experimental da concentração de sal da fase sobrenadante é de cerca de $4 \cdot 10^{-3}$ g/g. Para a determinação da quantidade de sal por condutividade, uma curva de calibração de condutividade em função da concentração do sal foi preparada. O efeito da concentração de

lisozima na medida de condutividade do sal foi avaliada e considerada desprezível (Apêndice 2). A determinação da quantidade de água na fase sobrenadante foi obtida através de balanços de massa.

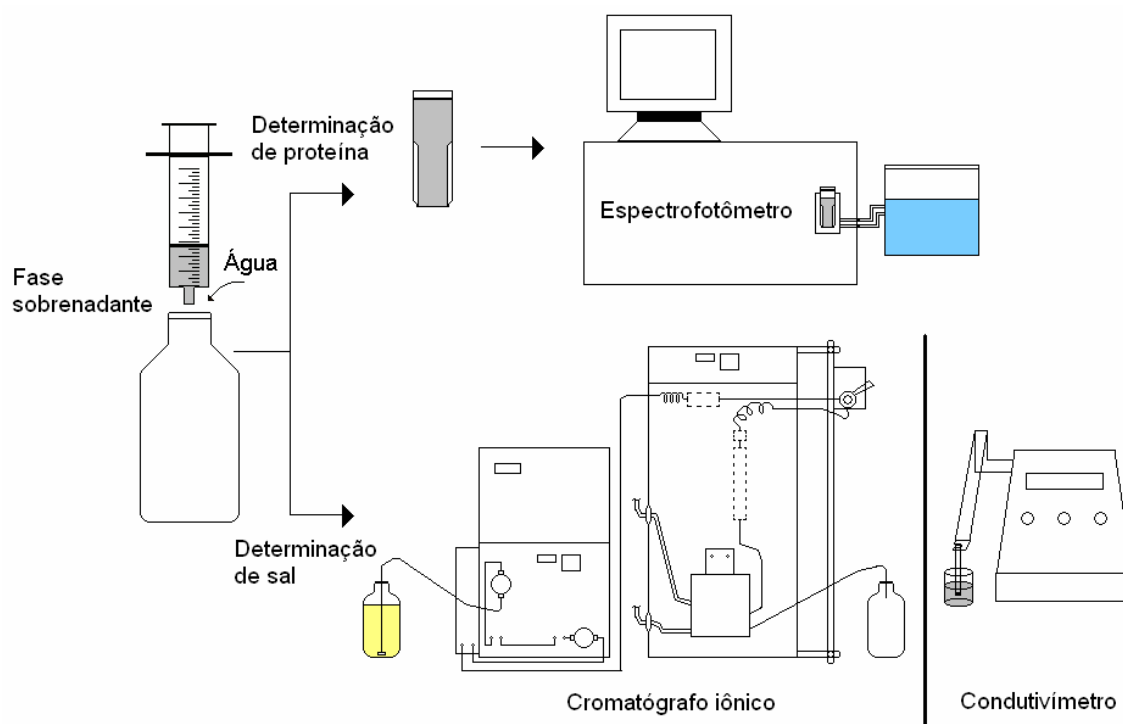


Figura 3.2: Ilustração da metodologia utilizada para determinação de proteína, água e sal da fase sobrenadante.

3.2.4. Determinação das concentrações de proteína, água e sal do precipitado

A determinação das concentrações de proteína, água e sal no precipitado foi também realizada de forma seqüencial (Figuras 3.3 e 3.4). Primeiramente, o precipitado, mantido no tubo de centrífuga após a retirada da fase sobrenadante, foi dissolvido em água (aproximadamente 5 mL de água). A seguir, esse precipitado foi transferido para outro recipiente, de massa previamente conhecida, o qual foi levado para liofilização a 10 mbar por cerca de 72 h. Após este período

de tempo, a medida de massa do recipiente contendo proteína e sal, livre de água, foi realizada para a determinação da quantidade de água do precipitado, cuja incerteza experimental é de aproximadamente 0,02 g/g. A seguir, uma amostra do precipitado liofilizado (0,02 a 0,08 g), livre de água, foi dissolvido em aproximadamente 50 g de água para a determinação da concentração de proteína através de medida de absorbância a 280 nm. A incerteza experimental na determinação da concentração de proteína nessa fase é de 0,001 g/g. Quando o sal utilizado foi sulfato de sódio, a quantificação deste foi possível através de incineração a 700°C por aproximadamente 5 h, uma vez que o resíduo final consistia apenas de óxido de sódio, a incerteza experimental envolvida nessa medida de massa de sal é de $5 \cdot 10^{-3}$ g/g. Para os sais sulfato de amônio, cloreto de sódio e carbamato de amônio, balanços de massa foram realizados para a determinação das concentrações dos sais no precipitado, após a determinação das concentrações de proteína e água.

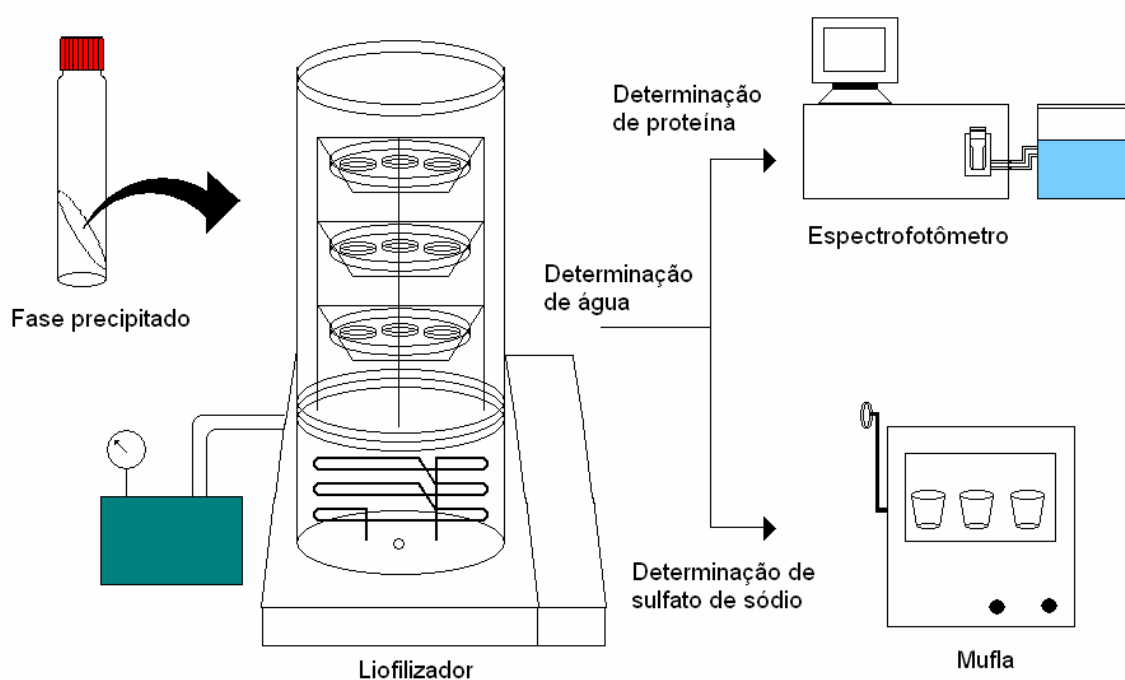


Figura 3.3: Ilustração da metodologia utilizada para determinação de proteína, água e sal do precipitado.

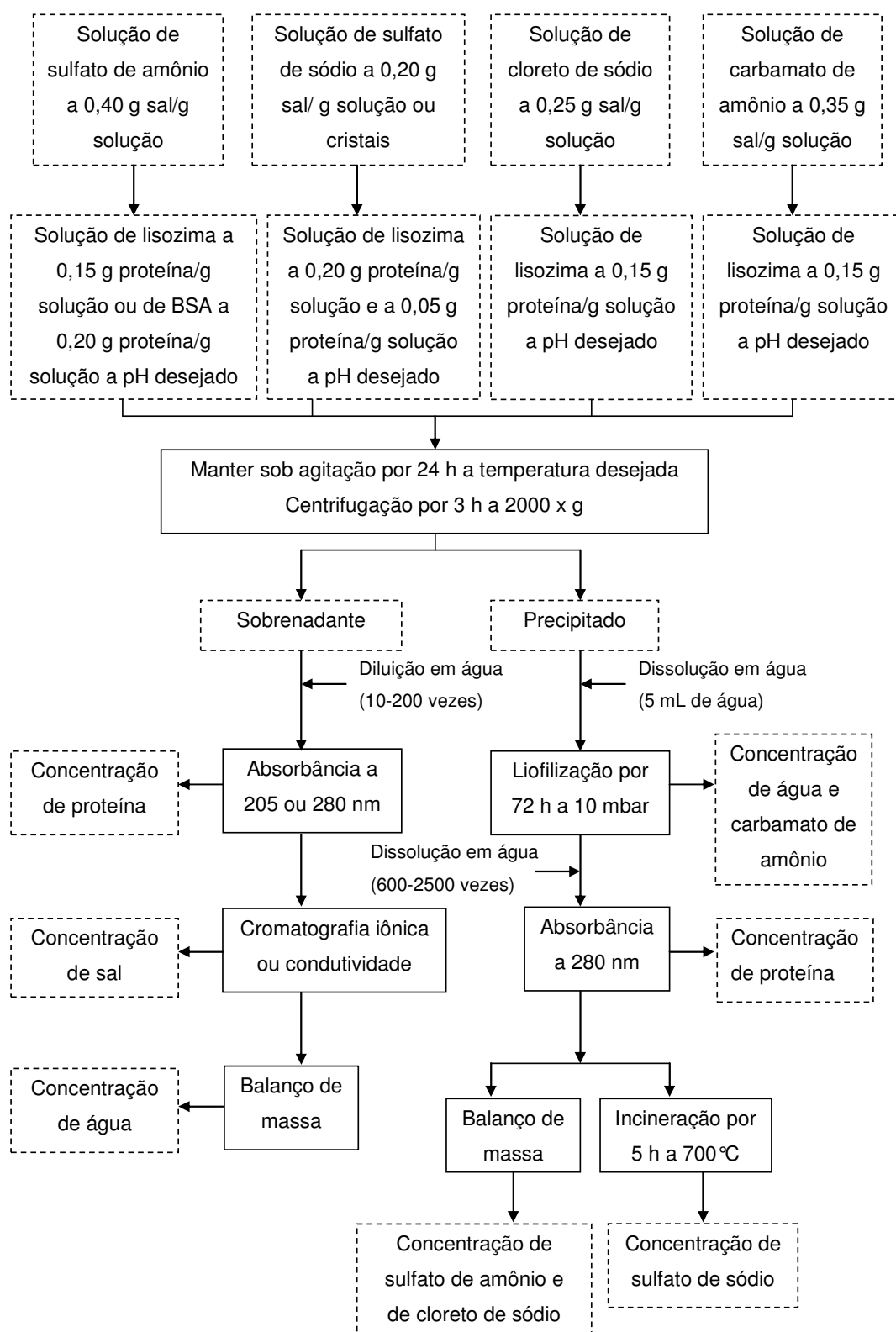


Figura 3.4: Fluxograma dos ensaios de precipitação e da metodologia utilizada para a determinação de proteína, sal e água dos sistemas em equilíbrio.

3.2.5. Determinação da atividade da lisozima, da faixa operacional da taxa de reação de degradação do substrato e da influência do sal na atividade da lisozima

A determinação da atividade enzimática de lisozima foi adaptada a partir do método apresentado por Shugar (1952) e consistiu no acompanhamento da taxa de degradação de células de microorganismos utilizados como substrato pela proteína, medida através da variação da absorbância a 450 nm com o tempo. Em uma cubeta de polipropileno de capacidade 3,0 mL adicionou-se 100 µL de solução de lisozima 0,05 mg/mL em solução tampão fosfato de potássio 0,066 mol/L a pH 6,24. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de solução do substrato *Micrococcus lysodeikticus* 0,015% (m/v), preparado na mesma solução tampão da proteína. Após rápida homogeneização, registrou-se a variação da absorbância a 450 nm durante aproximadamente 5 min, utilizando-se um espectrofotômetro acoplado a um banho termostatizado a 25,0°C (Figura 3.5). A unidade de atividade (UA) é dada pela quantidade de lisozima que degrada o substrato *Micrococcus lysodeikticus* a uma taxa de variação de absorção a 450 nm de 0,001 por minuto nessas condições. A atividade específica, que expressa o número de unidades de atividade por miligrama de proteína é dada pela expressão a seguir:

$$\text{Atividade específica (UA/mg)} = \frac{(\Delta A_{450\text{nm}} / t)}{0,001 \cdot (V_{\text{lisozima}}) \cdot (C_{\text{lisozima}})} \quad (3.1)$$

em que $\Delta A_{450}/t$ é a inclinação obtida da curva absorbância a 450 nm em função do tempo; V_{lisozima} é o volume de lisozima adicionado na reação de hidrólise (0,1 mL); C_{lisozima} é a concentração de lisozima da solução enzimática (mg/mL).

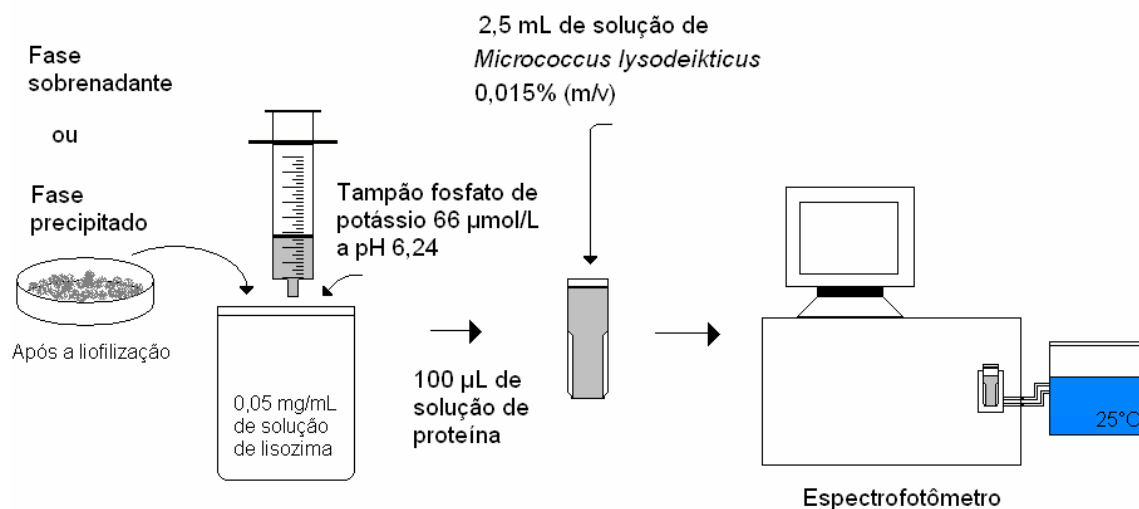


Figura 3.5: Ilustração da metodologia utilizada para determinação da atividade biológica da lisozima na fase sobrenadante e no precipitado.

Como parte da implementação do ensaio de atividade da lisozima determinou-se a faixa operacional da taxa de reação de “lise” do substrato *Micrococcus lysodeikticus* a ser utilizada (Apêndice 5). O procedimento realizado foi a determinação da atividade enzimática, exceto pela variação da concentração de lisozima utilizada (0,001 a 0,1 mg/mL em solução tampão fosfato de potássio 0,066 mol/L a pH 6,24). A seguir, procedeu-se a determinação da atividade específica (Equação 3.1) para cada ensaio a diferentes concentrações de lisozima. Como o valor da unidade de atividade específica (UA/mg) da lisozima é único para qualquer concentração de proteína, determinou-se a faixa operacional da taxa de degradação do substrato *Micrococcus lysodeikticus* em que isto se verifica, ou seja, a faixa de $\Delta 450/t$ no qual a atividade específica da lisozima determinada era constante.

A verificação da influência do sal na atividade da proteína foi determinada através de medidas de atividade de uma mesma solução de lisozima a diferentes concentrações dos sais estudados (Apêndice 5). Para tal, adicionou-se às cubetas de polipropileno de capacidade 3,0 mL, 0,05 mL de solução de lisozima 0,1 mg/mL em solução tampão fosfato de potássio 0,066 mol/L a pH 6,24, 2,5 mL de

substrato *Micrococcus lysodeikticus* 0,015% (m/v) e 0,05 mL de solução de sal a diferentes valores de concentração mássica (Tabela 3.2). Após rápida homogeneização, registrou-se a variação da absorbância a 450 nm com o tempo e calculou-se a atividade específica da proteína segundo Equação 3.1.

Tabela 3.2: Valores de concentração de sal utilizados nos ensaios de atividade de lisozima para verificação da influência desses sais na atividade da proteína.

Sal	Concentração (g de sal/g de solução)				
Sulfato de amônio	0,30,	0,20,	0,10,	0,05,	0,02
Sulfato de sódio	0,20,	0,15,	0,10,	0,05,	0,02
Carbamato de amônio	0,30,	0,20,	0,10,	0,05,	0,02
Cloreto de sódio	0,20,	0,15,	0,10,	0,05,	0,02

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo apresentam-se os resultados deste trabalho e as respectivas discussões. Os diagramas de fase da lisozima em sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio, contendo as composições das fases em equilíbrio são apresentados. Destaca-se o uso da técnica de intersecção dos prolongamentos das linhas de amarração obtidas experimentalmente, que possibilitou a determinação da composição do precipitado verdadeiro, interpretado como a composição da fase sólida efetivamente formada. As composições da lisozima na fase sobrenadante em função da concentração do sal, ou seja, as curvas de concentrações de equilíbrio, são também apresentadas na forma de diagramas bidimensionais em função do pH (2,0, 4,0, 7,0 e 10,0) e da temperatura (5,0, 15,0 e 25,0°C) para uma discussão sobre a influência destes parâmetros. Modificações dos valores de pH foram realizadas apenas para os sistemas lisozima - sulfato de amônio - água e lisozima - sulfato de sódio - água e análises microscópicas da fase sólida destes sistemas são mostradas. Na sequência, resultados de verificação da manutenção da atividade enzimática da lisozima são apresentados na forma de balanços de atividade da proteína. Por último, curvas de concentrações de equilíbrio a diferentes valores de pH são apresentadas, assim como os respectivos diagramas de fases do sistema BSA - sulfato de amônio - água. Reforça-se aqui que a fase líquida obtida após a precipitação das proteínas será referida como fase sobrenadante, e a mistura da fase líquida e do sólido será referenciada apenas como precipitado, já que não se trata de uma única fase em equilíbrio. A fase sólida, que poderia ser determinada caso uma separação completa fosse alcançada, é o precipitado verdadeiro.

4.1. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA LISOZIMA - SULFATO DE AMÔNIO-ÁGUA

4.1.1. Efeito do pH no equilíbrio de fases do sistema lisozima - sulfato de amônio - água à temperatura de 25°C

O equilíbrio de fases dos sistemas lisozima - sulfato de amônio - água a valores de pH 2,0, 4,0, 7,0 e 10,0 a temperatura de 25,0°C são representados nos diagramas de fase das Figuras 4.1 a 4.4. As concentrações dos componentes lisozima, sal e água da fase sobrenadante e do precipitado foram determinadas e são apresentadas em fração mássica (g componente/g fase). Ressalta-se que no Apêndice 3, demonstra-se como os componentes podem ser determinados nos diagramas ternários e no Apêndice 4 encontram-se os valores numéricos de concentração mássica de proteína, sal e água da alimentação, da fase sobrenadante e do precipitado. Apesar da adição de ácido ou base para ajuste de pH e adição de solução tampão, ou seja, do caráter multicomponente do sistema, para efeito de análise e construção dos diagramas consideraram-se somente os componentes majoritários: proteína, sal e água.

Nos diagramas dos sistemas lisozima - sulfato de amônio - água a diferentes valores de pH verificou-se que as concentrações da proteína na fase sobrenadante foram aproximadamente constantes e próximas de zero (valores de cerca de 10^{-5} – 10^{-3} g lisozima/g fase¹) a altas concentrações de sal e aumentaram com a diminuição da concentração de sulfato de amônio. Notou-se também que as concentrações de sal nos precipitados foram menores do que na fase sobrenadante, indicando uma partição desigual do sal entre as fases, o que freqüentemente não é considerado nos estudos de equilíbrio de fases de soluções protéicas, que descrevem o precipitado como uma fase sólida de proteína pura.

¹ Acima do nível de detecção do método analítico de absorção a 205 nm, que segundo Stoscheck (1990) é de 10^{-6} a 10^{-3} g.

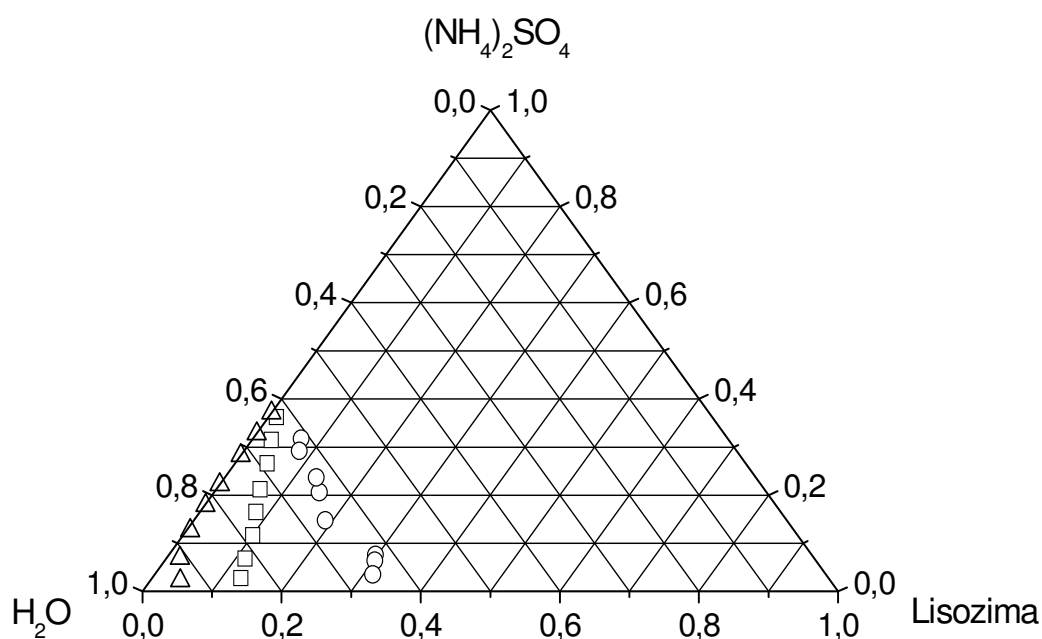


Figura 4.1: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○).

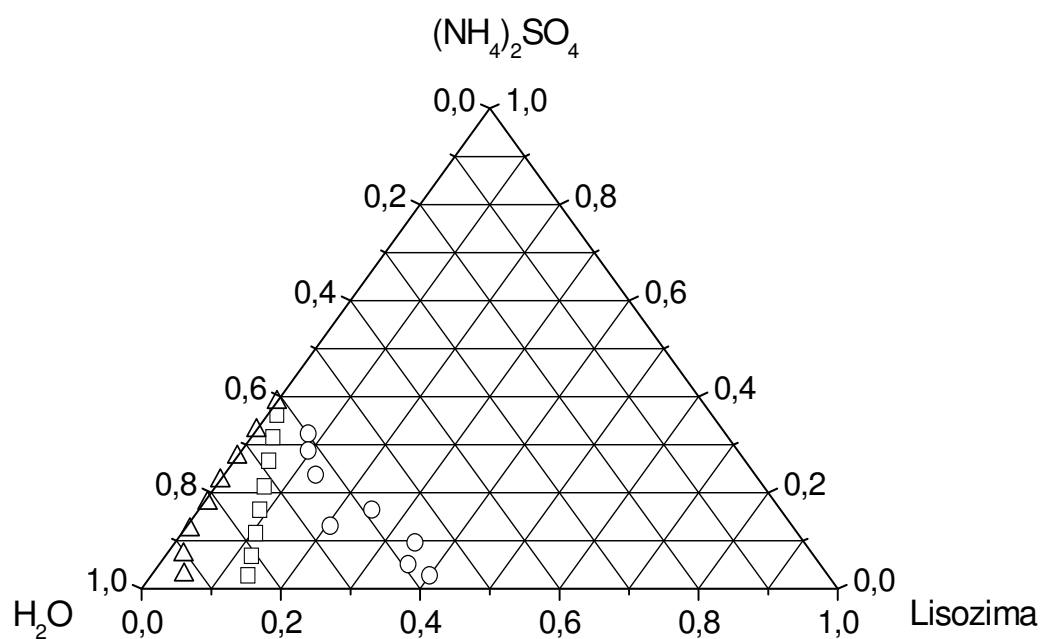


Figura 4.2: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○).

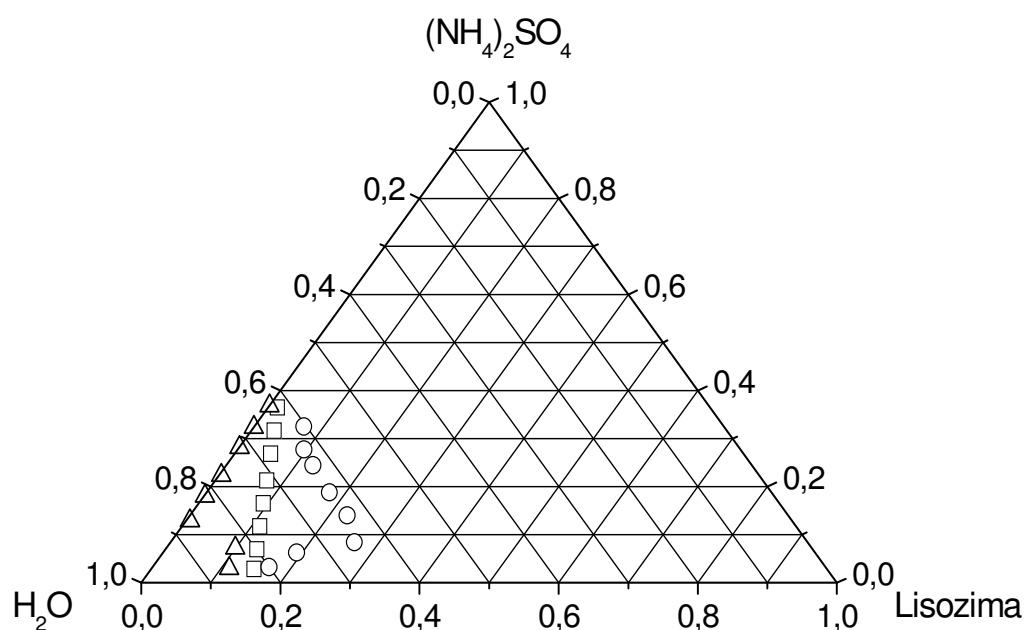


Figura 4.3: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$).

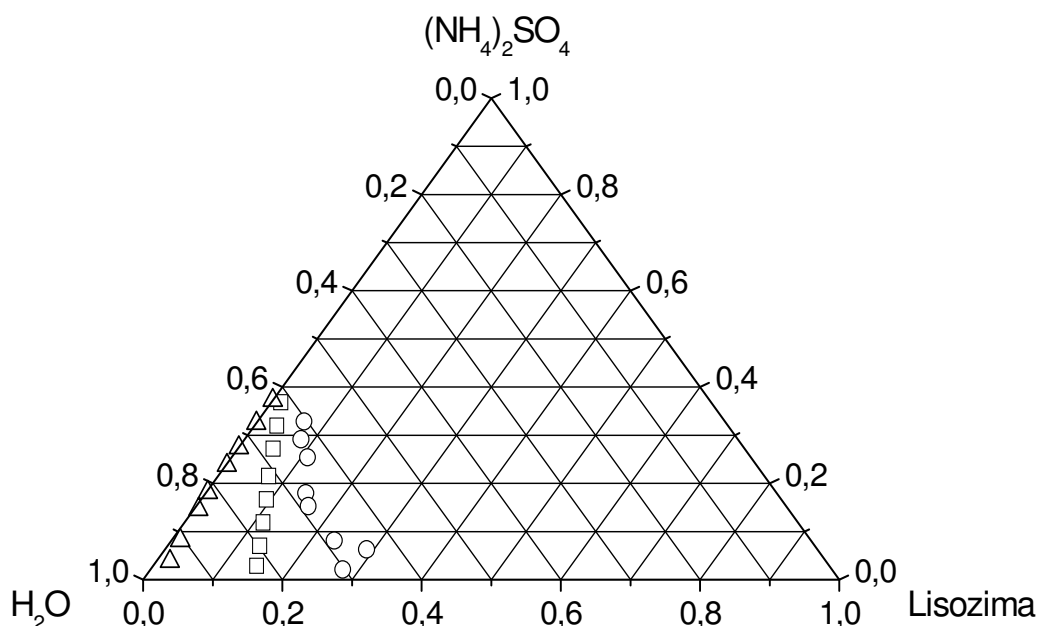


Figura 4.4: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 10,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○).

As concentrações mássicas de lisozima na fase sobrenadante a diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 7,0, 10,0) representando as concentrações de equilíbrio da proteína, foram determinadas a 25,0°C em função das concentrações mássicas do sal sulfato de amônio e podem ser melhor visualizadas na Figura 4.5. As curvas de concentração de equilíbrio de lisozima em soluções de sulfato de amônio, para todos os valores de pH apresentaram uma diminuição da concentração de proteína na fase sobrenadante com o aumento da concentração de sal, evidenciando o efeito “salting-out” na precipitação de lisozima.

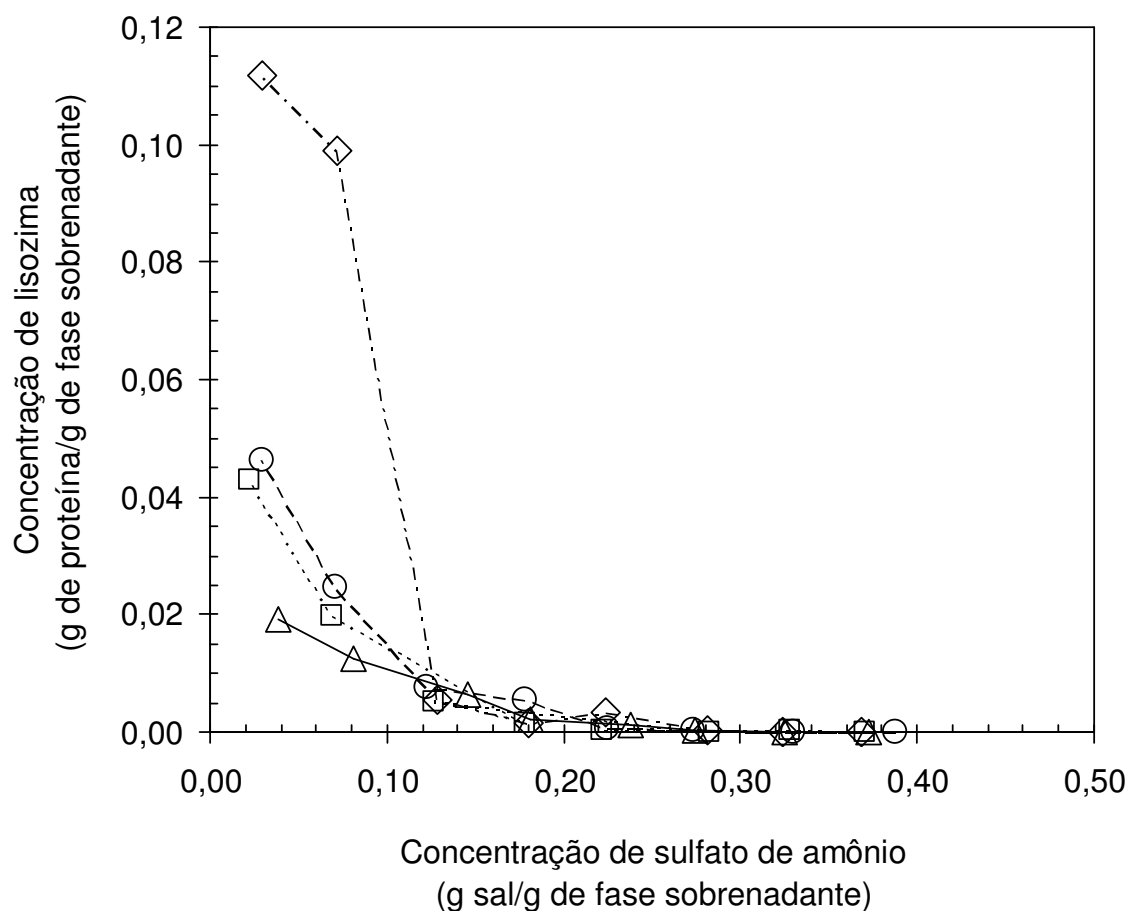


Figura 4.5: Concentrações de equilíbrio de lisozima em solução de sulfato de amônio a 25,0°C e diferentes valores de pH: 2,0 (□), 4,0 (○), 7,0 (◇), 10,0 (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 2,0 (···□···), 4,0 (---○---), 7,0 (—◇—), 10,0 (—△—).

O efeito dos diferentes valores de pH nas concentrações de equilíbrio de lisozima em sulfato de amônio não é muito claro, mas para baixas concentrações de sal, observou-se que a lisozima apresentou maior solubilidade a pH igual a 7,0, enquanto que a pH 10,0 obteve-se a menor solubilidade da proteína. A baixa solubilidade de lisozima em pH igual a 10,0 pode ser explicada pela proximidade do ponto isoelétrico da proteína (pH 11,3). Neste pH, a carga líquida da molécula é nula, e a repulsão eletrostática das moléculas é mínima, prevalecendo as interações hidrofóbicas proteína - proteína (Scopes, 1988). Verificou-se também

que a solubilidade da proteína diminuiu para valores de pH iguais a 2,0 e 4,0 (pH ácidos) comparando-se com a solubilidade da lisozima a pH 7,0, concordando com os resultados obtidos por Shih *et al.* (1992). Segundo esses autores isso ocorre pela ligação dos ânions do sal à proteína, reduzindo a carga líquida positiva da proteína e, portanto, diminuindo a solubilidade da lisozima.

4.1.2. Determinação da composição do precipitado verdadeiro

As composições da fase sobrenadante e do precipitado que coexistem em equilíbrio na precipitação de lisozima podem ser conectadas por linhas de amarração. Devido a uma separação necessariamente incompleta da fase sobrenadante e do precipitado, é razoável assumir que a fase sobrenadante não contém precipitado, mas o precipitado contém quantidades apreciáveis de fase sobrenadante. Assim, o precipitado rico em proteína é uma mistura da fase pobre em proteína e do precipitado protéico sólido, que chamaremos de precipitado verdadeiro. A composição deste precipitado verdadeiro deve estar sobre as linhas que conectam a fase sobrenadante e o precipitado. Assim, extrapolando-se as linhas de amarração nos diagramas de fase, verificou-se que estas se encontram em dois pontos de composições distintas, pontos que se propõe neste trabalho que sejam a composição da fase sólida formada, sem a presença da fase líquida que inevitavelmente acompanha o precipitado. Estes pontos serão denominados precipitados verdadeiros.

Ressalte-se que, como o precipitado obtido experimentalmente compreende uma mistura de fases (sobrenadante e precipitado verdadeiro) e não uma única fase em equilíbrio com a fase pobre em proteína, as composições deste precipitado não deveriam constar no diagrama de fases. No entanto, para compreender como os precipitados verdadeiros podem ser determinados, assim como para uma melhor visualização do processo de precipitação, tanto a alimentação como o precipitado (mistura de fases) obtido experimentalmente serão apresentados nos diagramas de fases, fazendo-se assim um uso extensivo da expressão “diagramas de fase” neste trabalho.

Desta maneira, notou-se a presença de dois precipitados verdadeiros de composições análogas em todos os diagramas de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a diferentes valores de pH (Figura 4.6): um precipitado verdadeiro ocorreu a altas concentrações de sal e possuía em sua composição (em fração mássica) aproximadamente 0,37 g lisozima/ g fase, 0,14 g sal/g fase e 0,49 g água/g fase; e um outro precipitado verdadeiro foi encontrado a baixas concentrações de sal e era composto por 0,86 g lisozima/g fase e 0,14 g água/g fase. Apenas para o sistema a pH igual a 2,0 obteve-se uma pequena quantidade de sal no precipitado (0,03 g sal/g precipitado), provavelmente devido à interferência do ácido fosfórico adicionado à solução para a redução do pH. Na Tabela 4.1 tem-se as concentrações mássicas dos componentes dos precipitados verdadeiros nas duas regiões de alta e baixa concentração de sal a diferentes valores de pH.

A altas concentrações de sal, poder-se-ia considerar que a adsorção dos ânions do sal pelos resíduos básicos da lisozima seria forte o suficiente para ocasionar a precipitação do sal juntamente com a proteína, o que justificaria a composição do precipitado verdadeiro encontrado na região de elevada concentração de sal, como um complexo de proteína-sal-água.

Como visto no item anterior, a solubilidade da lisozima é dependente do pH da solução, sendo que a máxima solubilidade da proteína ocorreu em pH neutro, enquanto que a pH igual a 10,0 teve-se a menor solubilidade. Por analogia, poder-se-ia esperar que as composições dos precipitados verdadeiros fossem distintas, de acordo com o pH da solução: a precipitação de lisozima a pH igual a 10,0, próximo de seu ponto isoelétrico, deveria levar à formação de um precipitado verdadeiro contendo uma fração mássica de lisozima maior do que a obtida a pH igual a 4,0, por exemplo. No entanto, essa expectativa não se verificou. As composições dos precipitados verdadeiros obtidos a partir de soluções de lisozima a diferentes valores de pH apresentaram-se análogas, o que sugere que o precipitado verdadeiro não depende do pH da solução de proteína. Uma razão para este fato é o princípio da eletroneutralidade das fases em equilíbrio. Esse princípio rege que fases em equilíbrio são eletricamente neutras, ou seja, as fases podem ter íons salinos, tampões, proteínas em solução e

agregados de proteína (precipitado) que contêm cargas locais, mas a somatória das cargas da fase deve ser nula. Assim, o precipitado verdadeiro deve ser uma fase neutra, que independe do valor da carga da solução (pH) na qual está contida, e por isso, as composições dos precipitados verdadeiros obtidas experimentalmente para sistemas de diferentes valores de pH foram aproximadamente análogas.

Como o precipitado obtido experimentalmente é uma mistura da fase sobrenadante e da fase sólida, variações da velocidade (2000, 1500, 1000 e 500 g) e tempo de centrifugação da mistura (5, 15, 30, 60 e 180 min) foram realizadas. O intuito deste ensaio era eventualmente modificar a quantidade de fase pobre em proteína no sólido, ou seja, observar a possibilidade de deslocamento do precipitado na linha de amarração, direcionando-se mais próximo ou mais distante do precipitado verdadeiro encontrado. Inicialmente fixou-se a velocidade de centrifugação em 2000 g e variou-se o tempo de centrifugação e, posteriormente, manteve-se o tempo de 15 min e procederam-se variações da velocidade. Verificou-se que para os menores valores de velocidade (500 g) e de tempo (5 min), a interface sólido-líquido não era suficientemente nítida para a coleta da fase sobrenadante e do precipitado, separadamente. Para os demais valores de velocidade e tempo de centrifugação, observou-se que as massas do precipitado e as concentrações de lisozima nas fases pobre e rica em proteína, para as regiões de alta e baixa concentração, não sofreram nenhuma alteração significativa (Tabelas A4.24 e A4.25 do Apêndice 4).

Para avaliação da influência da vazão de alimentação do sal, adicionado à mistura protéica, na separação de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água, a solução de sal foi colocada manualmente (taxa de adição de aproximadamente 2,2 mL/h) e a taxas de 22,0 e 0,22 mL/h. Observou-se que a quantidade do precipitado, bem como as composições de lisozima, sulfato de amônio e água na fase sobrenadante e no precipitado apresentaram valores semelhantes (Tabela A4.26 do Apêndice 4), independente da taxa de adição de sal utilizada, demonstrando que esta variável não afeta o equilíbrio de fases do sistema nessas condições.

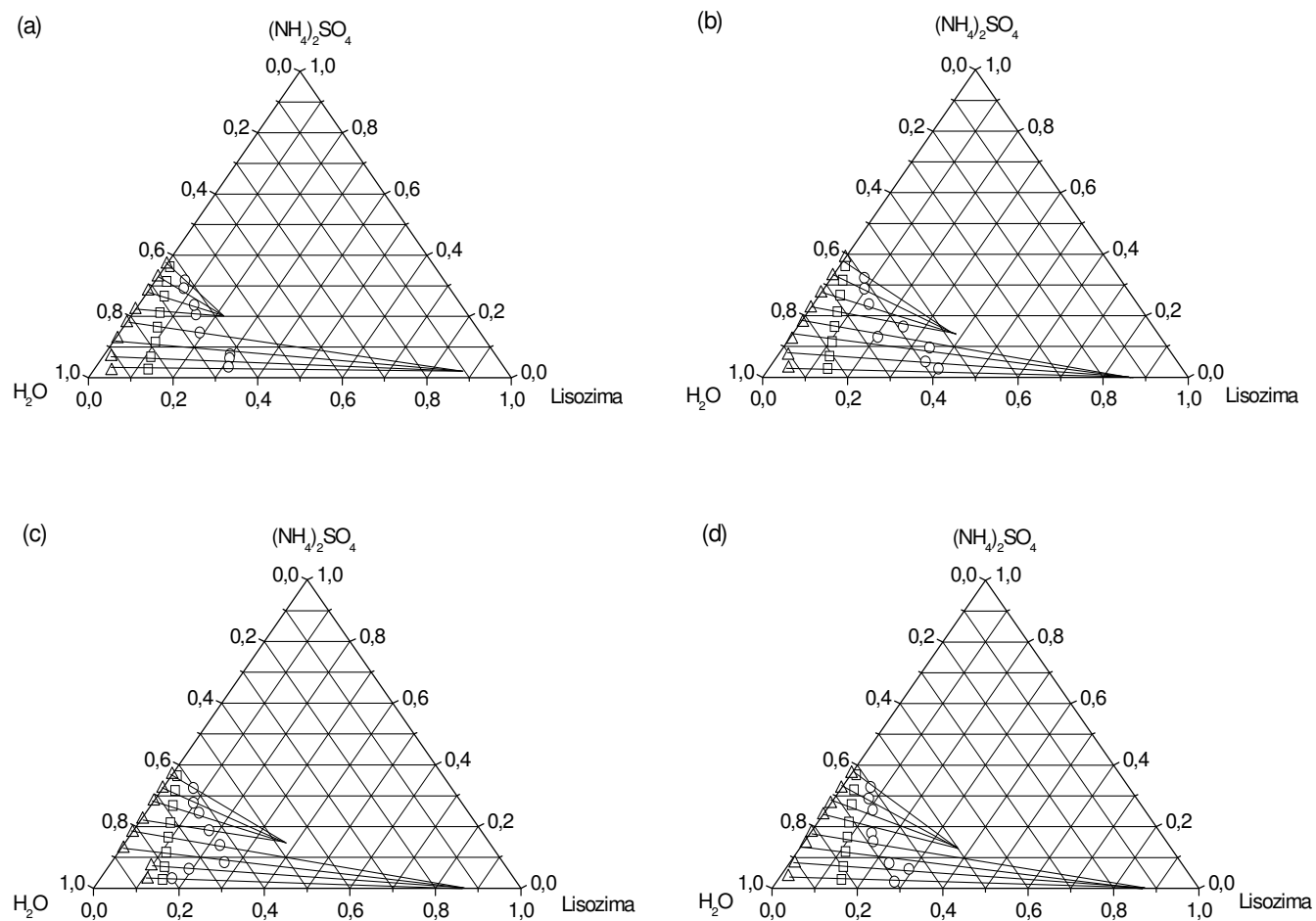


Figura 4.6: Diagramas de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água, com a presença dos precipitados verdadeiros, a 25,0°C e diferentes valores de pH: (a) 2,0; (b) 4,0; (c) 7,0; (d) 10,0. Composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

Tabela 4.1: Concentrações mássicas de lisozima, água e sal do precipitado verdadeiro nas regiões de alta e baixa concentração de sal, nos sistemas lisozima-sulfato de amônio-água a temperatura igual a 25,0 °C e a diferentes valores de pH.

Região de concentração de sal	pH	Lisozima (g proteína/g fase)	Sulfato de amônio (g sal/g fase)	Água (g água/g fase)
Alta	2,0	0,21	0,20	0,59
	4,0	0,37	0,14	0,49
	7,0	0,37	0,15	0,48
	10,0	0,37	0,13	0,50
Baixa	2,0	0,87	0,03	0,10
	4,0	0,86	-	0,14
	7,0	0,86	-	0,14
	10,0	0,86	-	0,14

Comparando-se os dados de equilíbrio de fases da precipitação de lisozima em sulfato de amônio de valores de pH iguais a 4,0 e 7,0 obtidos neste trabalho, com os determinados por Moretti *et al.* (2000) a pH iguais a 4,0 e 8,0 (Figuras 4.7 e 4.8), verificou-se praticamente uma sobreposição dos resultados de concentração de proteína na fase sobrenadante. Os resultados de concentração de lisozima no precipitado rico em proteína a pH 4,0 e 7,0, principalmente na região de baixa concentração de sal, em uma primeira análise, parecem divergirem. No entanto isso ocorre, pois os precipitados obtidos nesta região por Moretti *et al.* (2000) foram totalmente secos para remoção da água dos interstícios dos cristais, o que não foi realizado com os precipitados aqui obtidos. Mas a fração mássica de lisozima encontrada pelos autores foi de aproximadamente 0,85, valor próximo ao encontrado neste trabalho, mostrando uma concordância dos resultados deste trabalho com os obtidos por Moretti *et al.* (2000).

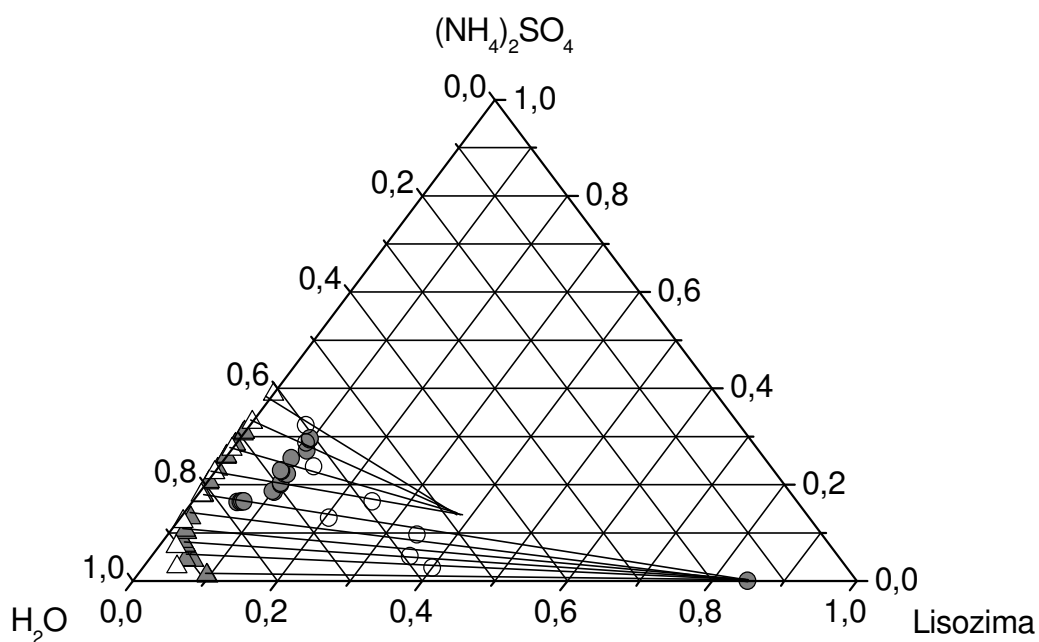


Figura 4.7: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução (neste trabalho) e 0,1 - 0,25 g proteína/g solução (Moretti *et al.*, 2000); concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da fase sobrenadante ($\triangle$, $\blacktriangle$), composição do precipitado ($\circ$, $\bullet$); dados deste trabalho (símbolos abertos), dados de Moretti *et al.*, 2000 (símbolos cheios).

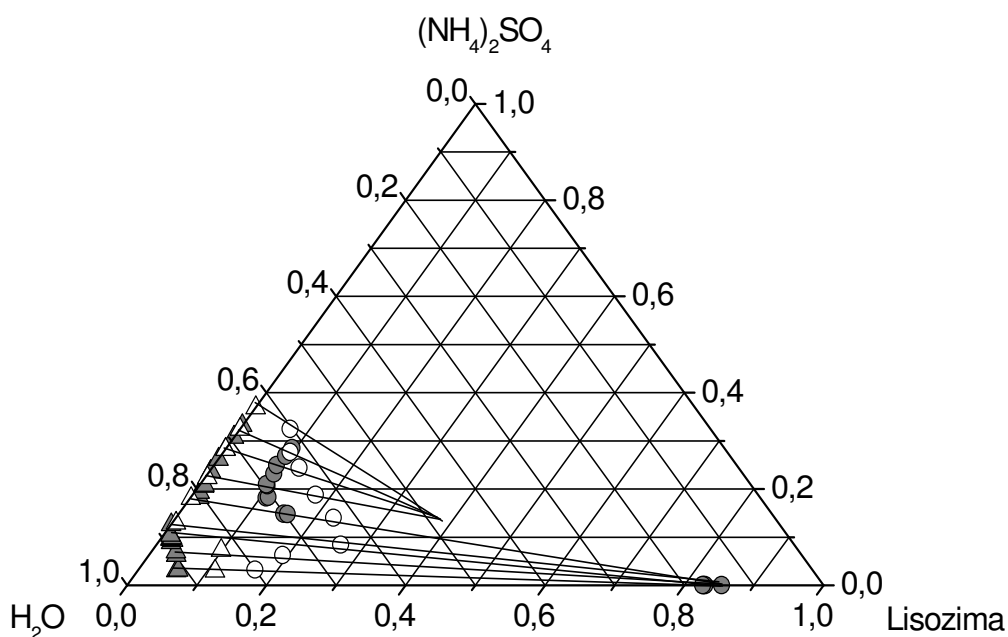


Figura 4.8: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0 (neste trabalho) e pH=8,0 (Moretti *et al.*, 2000). Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução (neste trabalho) e 0,1 - 0,25 g proteína/g solução (Moretti *et al.*, 2000); concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da fase sobrenadante ($\triangle$, $\blacktriangle$), composição do precipitado ($\circ$, $\bullet$); dados deste trabalho (símbolos abertos), dados de Moretti *et al.*, 2000 (símbolos cheios).

4.1.3. Efeito da temperatura no equilíbrio de fases do sistema lisozima - sulfato de amônio - água a pH igual a 7,0

Os diagramas de fase do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e a temperaturas de 5,0 e 15,0°C contendo as composições mássicas dos componentes na alimentação, fase sobrenadante e precipitado são apresentados nas Figuras 4.9 e 4.10.

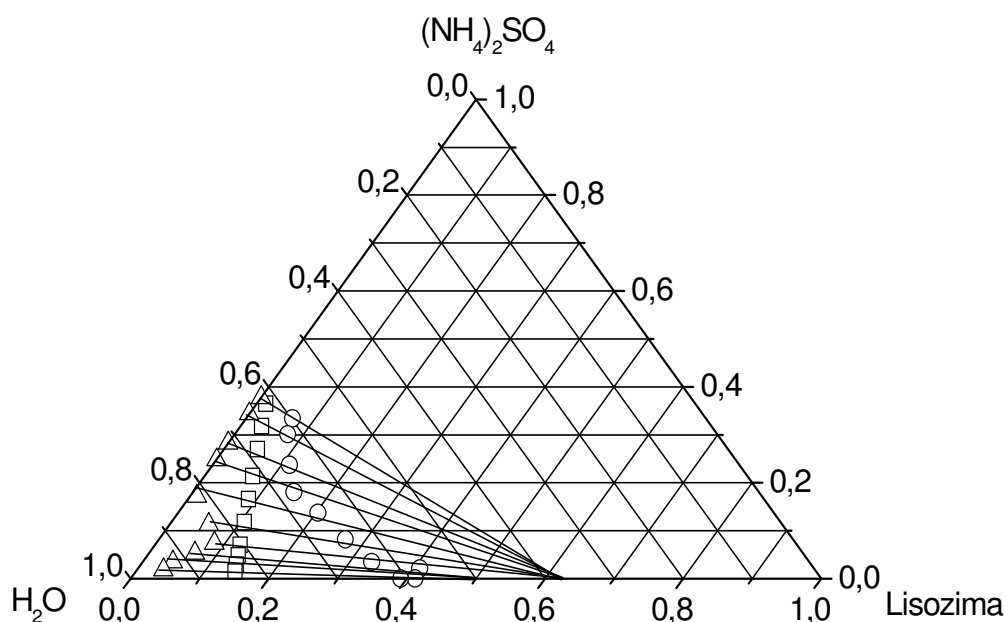


Figura 4.9: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 5,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

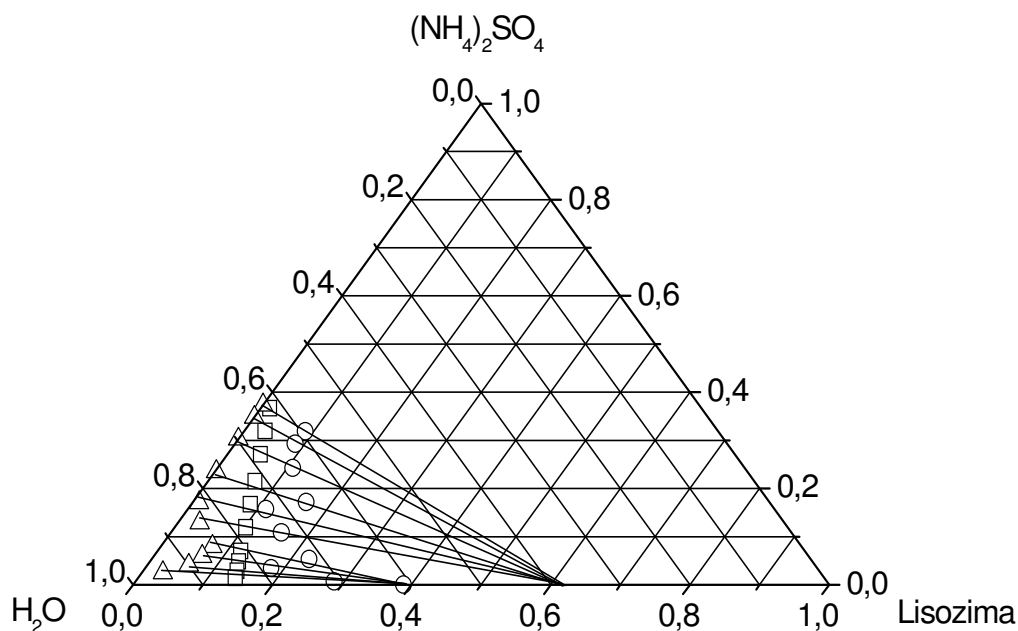


Figura 4.10: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 15,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

Verificou-se nos diagramas de fase, uma região de “salting-in” (a baixas concentrações de sal) e uma de “salting-out” (a altas concentrações de sal). As extensões das linhas de amarração interceptaram-se em dois pontos distintos, os precipitados verdadeiros, que correspondem às regiões de “salting-in” e “salting-out”, ou seja, as linhas de amarração que conectam as fases em equilíbrio da região de “salting-in” encontraram-se em um ponto, dando origem a um precipitado verdadeiro, enquanto que as linhas de amarração que ligam as fases em equilíbrio da região de “salting-out” levaram a um outro precipitado verdadeiro.

Os dois precipitados verdadeiros encontrados nos diagramas de fase a 5,0 e 15,0°C foram sólidos de lisozima-água, livres de sal, cujas composições

mássicas diferiram apenas na quantidade de água: precipitado da região de “salting-in” possuía 0,39 g/g de lisozima e o precipitado da região de “salting-out” tinha em sua composição 0,62 g/g de lisozima. Uma possível explicação para a presença dos dois precipitados verdadeiros pode estar na estrutura cristalina da proteína: a baixas concentrações de sal, cristais de lisozima apresentam a forma tetraédrica e a altas concentrações de proteína, tem-se a forma ortorrômbica (Forsythe *et al.*, 1997). Os diagramas de fase mostraram exatamente dois tipos de precipitado verdadeiro para as regiões de baixa (“salting-in”) e alta concentração de sal (“salting-out”) assim como as composições dos precipitados. Porém, para comprovação da morfologia dos precipitados encontrados nas regiões de “salting-in” e “salting-out” uma análise mais aprofundada através de difração de raios-X é necessária, mas não será tratada neste trabalho. As concentrações mássicas dos componentes lisozima, sal e água dos precipitados verdadeiros obtidos a diferentes valores de temperatura são apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Concentrações mássicas de lisozima, água e sal do precipitado verdadeiro nas regiões de alta e baixa concentração de sal, nos sistemas lisozima-água-sulfato de amônio a pH 7,0 e diferentes temperaturas.

Região de concentração de sal	T (°C)	Lisozima (g proteína/g fase)	Sulfato de amônio (g sal/g fase)	Água (g água/g fase)
Alta	5	0,62	-	0,38
	15	0,62	-	0,38
	25	0,37	0,15	0,48
Baixa	5	0,48	-	0,52
	15	0,39	-	0,62
	25	0,86	-	0,14

As curvas de concentrações de equilíbrio da lisozima na fase sobrenadante em solução de sulfato de amônio a pH igual a 7,0 e temperaturas de 5,0, 15,0 e 25,0°C e já apresentadas nos diagramas ternários, são mostradas na Figura 4.11.

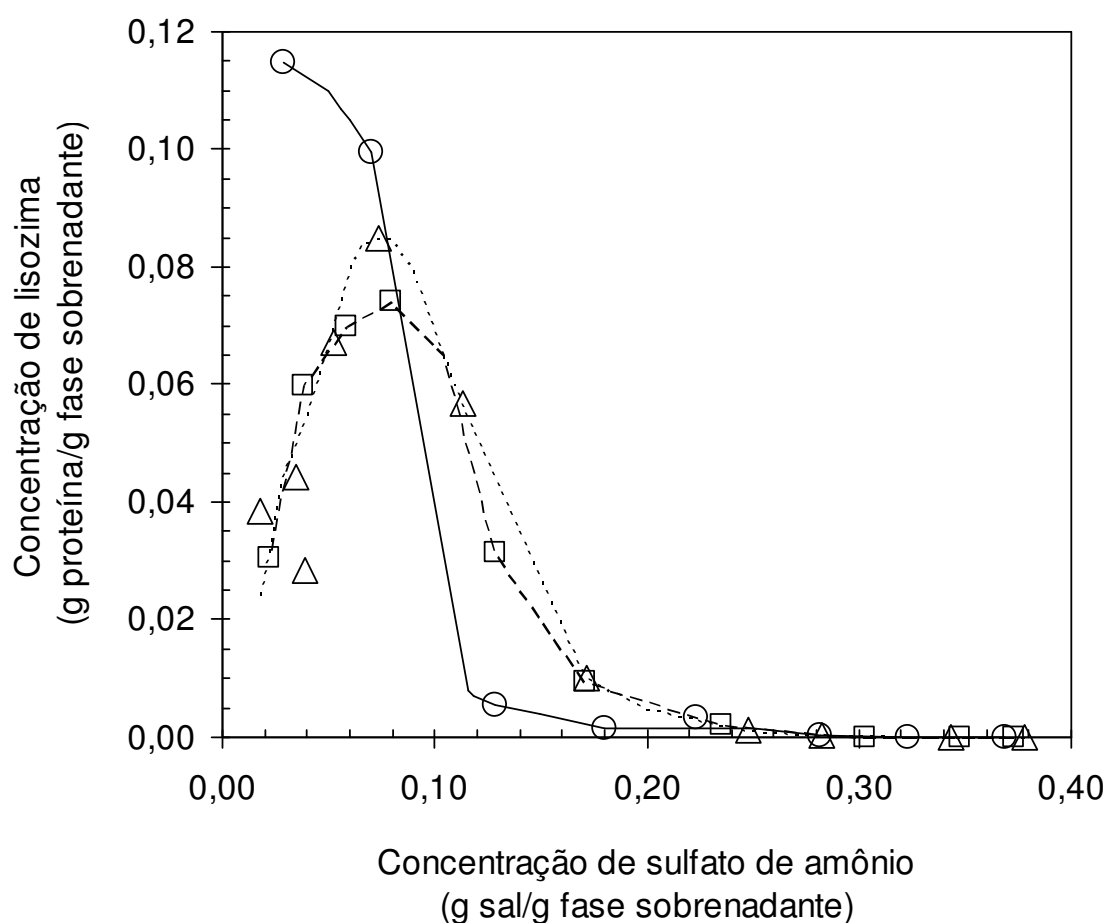


Figura 4.11: Concentrações de equilíbrio de lisozima em sulfato de amônio a pH 7,0 e a diferentes temperaturas: 25,0°C (○), 15,0°C (□), 5,0°C (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 25,0°C (—○—), 15,0°C (---□---), 5,0°C (···△···).

O efeito “salting-in” pode ocorrer, segundo Arakawa e Timasheff (1985), a baixas concentrações de sal, pois a molécula de proteína encontra-se em uma atmosfera iônica com excesso de cargas positivas. Nessa condição, a energia livre eletrostática da molécula diminui, resultando em redução da atividade da proteína e aumento de sua solubilidade. O efeito “salting-in”, até o momento, ainda não havia sido relatado na literatura disponível para soluções de lisozima.

A presença da região de “salting-in” na curva de concentração de equilíbrio da lisozima pode ter sido ocasionada pela mudança de morfologia dos cristais de lisozima, conforme mencionado anteriormente. Cristais tetraédricos da proteína ocorrem à baixa concentração de lisozima ou a temperaturas inferiores a 20,0°C e cristais ortorrômnicos de lisozima surgem à elevada concentração de proteína ou a temperaturas superiores a 25,0°C (Forsythe *et al.*, 1997). Segundo Riès-Kautt e Ducruix (1992), a solubilidade da lisozima na forma tetragonal é menor quando comparada à solubilidade da proteína na sua forma ortorrômica. Para concentração mássica de sal inferior a 0,08 g de sal/g de fase sobrenadante, de fato verificou-se que a lisozima a 5,0 e 15,0°C (cristais possivelmente na forma tetraédrica) possuía menor solubilidade do que a 25,0°C (cristais possivelmente na forma ortorrômica), concordando com os resultados da literatura.

Para altas concentrações de sal, na região de “salting-out”, nenhuma relação entre a solubilidade de lisozima e temperatura pode ser percebida, uma vez que para concentrações mássicas de sal entre 0,12 e 0,25 g de sal/g de fase sobrenadante, a solubilidade aumentou com a redução da temperatura, enquanto que para concentrações mássicas de sulfato de amônio acima de 0,28 g de sal/g de fase sobrenadante, a solubilidade da proteína aumentou com elevação da temperatura. Além disso, o tempo necessário para que ocorresse a precipitação de lisozima em sulfato de amônio na região de “salting-in” foi distinto de acordo com a temperatura utilizada. A precipitação de lisozima a baixas concentrações de sal sulfato de amônio a temperatura de 25,0°C ocorreu em 24 h, enquanto que para as temperaturas de 5,0 e 15,0°C foram necessárias aproximadamente 96 h. Isso indica que o tempo de indução da lisozima é longo, ou seja, o tempo que transcorre antes que a concentração de proteína se reduza com aumento da força iônica aumenta com a diminuição da temperatura. Cheng *et al.* (2006) determinou

24 h como o tempo de indução da lisozima em sulfato de amônio 6,0 mol/kg a 25,0°C. Esse tempo de indução mostrou não ser afetado pela concentração inicial de proteína, mas sensível à concentração de sal.

4.1.4. Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima - sulfato de amônio - água a 25°C e a diferentes valores de pH

Análises microscópicas do precipitado do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e diferentes valores de pH foram realizadas para a verificação da diferença entre os precipitados das regiões de alta e baixa concentração de sal. É importante destacar a dificuldade em se obter as imagens do precipitado, devido ao cuidado necessário para evitar a evaporação do solvente, e a conseqüente presença de partículas sólidas não relacionadas ao equilíbrio sólido-líquido. As Figuras 4.12 - 4.14 apresentaram uma amostra do precipitado sólido para cada uma das regiões. A taxa de agitação e de adição de sal e proteína não foram controladas, já que o intuito deste trabalho era a determinação da composição da fase sobrenadante e do precipitado. Apesar da possibilidade de quebra das partículas durante a agitação pelo uso de barra magnética, condição que levam a diferentes taxas de nucleação e crescimento dos cristais, algumas observações podem ser realizadas. Verificou-se uma diferença entre os precipitados obtidos para as áreas de alta concentração de sal (S2) e de baixa concentração de sal (S1). Uma diferença mais acentuada pode ser verificada no sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH igual a 4,0. Para este sistema, notou-se na região S2, a presença de pequenos cristais, enquanto que na região S1, cristais maiores e de formas cristalinas semelhantes foram observados, o que é indício da presença de cristais de lisozima. Reforça-se a isso, as concentrações de sal nas regiões S1 e S2, que são de aproximadamente 0,03 e 0,27 g de sal/ g de fase e as concentrações de lisozima são cerca de 0,24 e 0,08 g de proteína/g de fase, respectivamente.

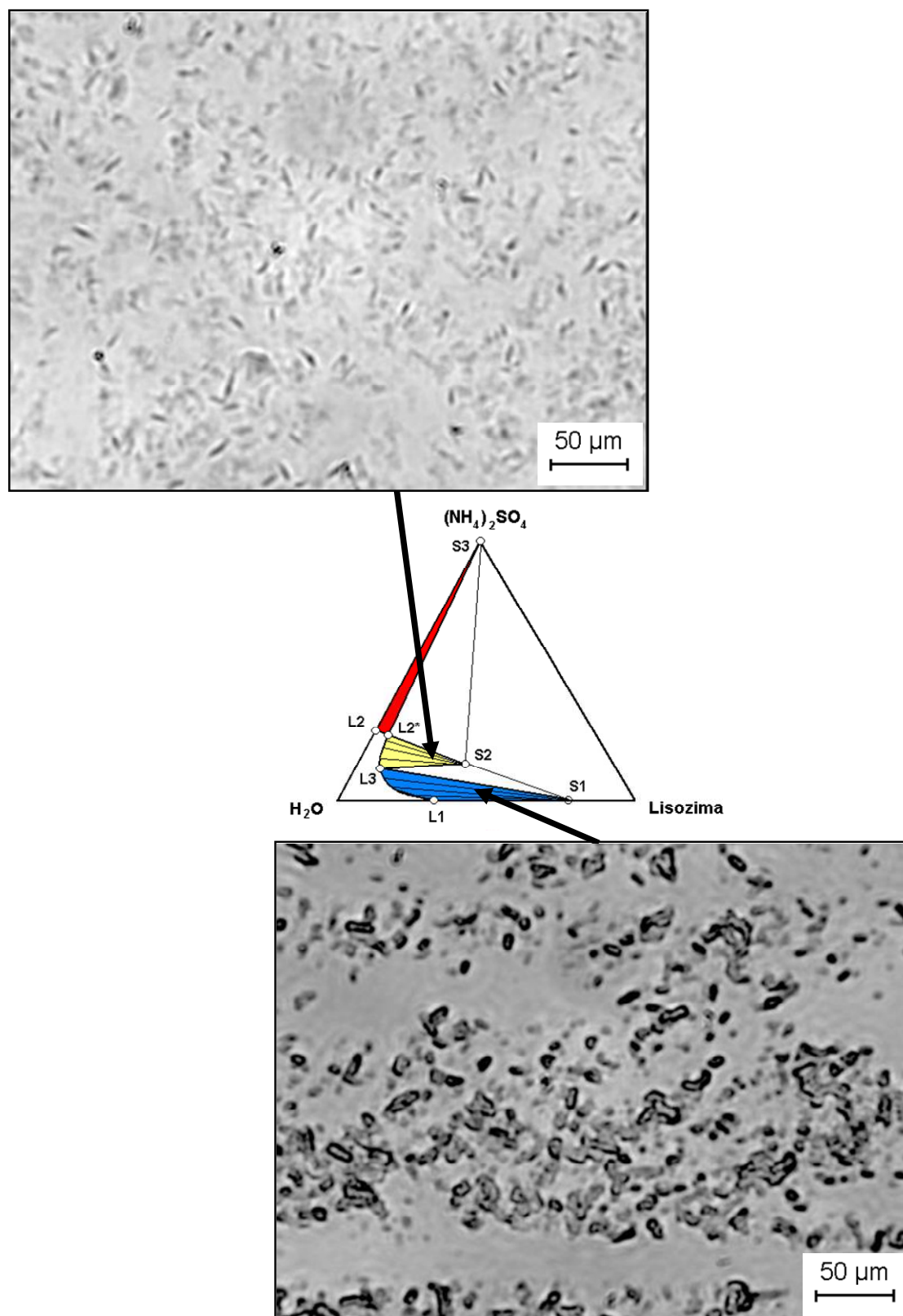


Figura 4.12: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0.

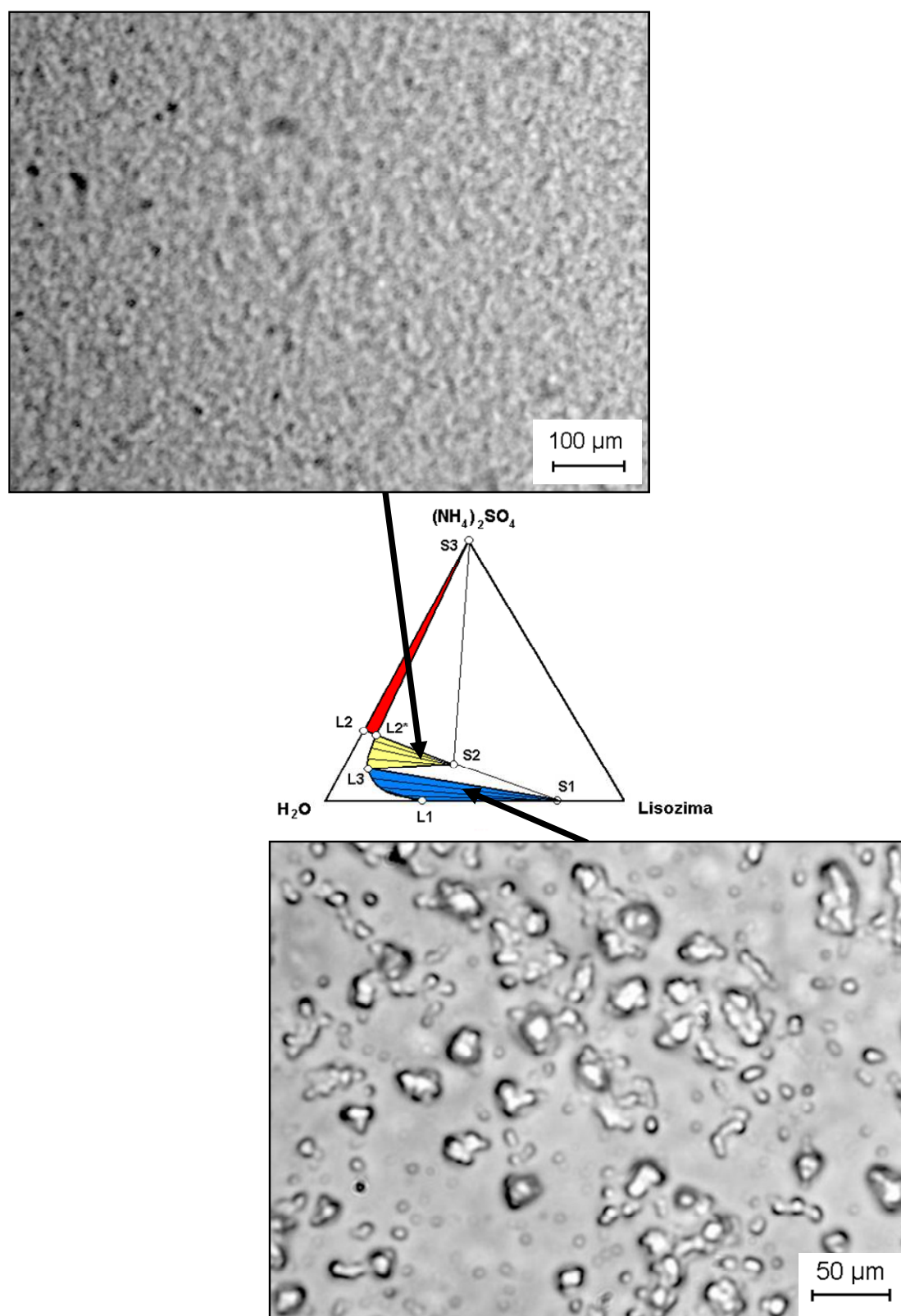


Figura 4.13: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a $25,0^\circ\text{C}$ e pH igual a 4,0.

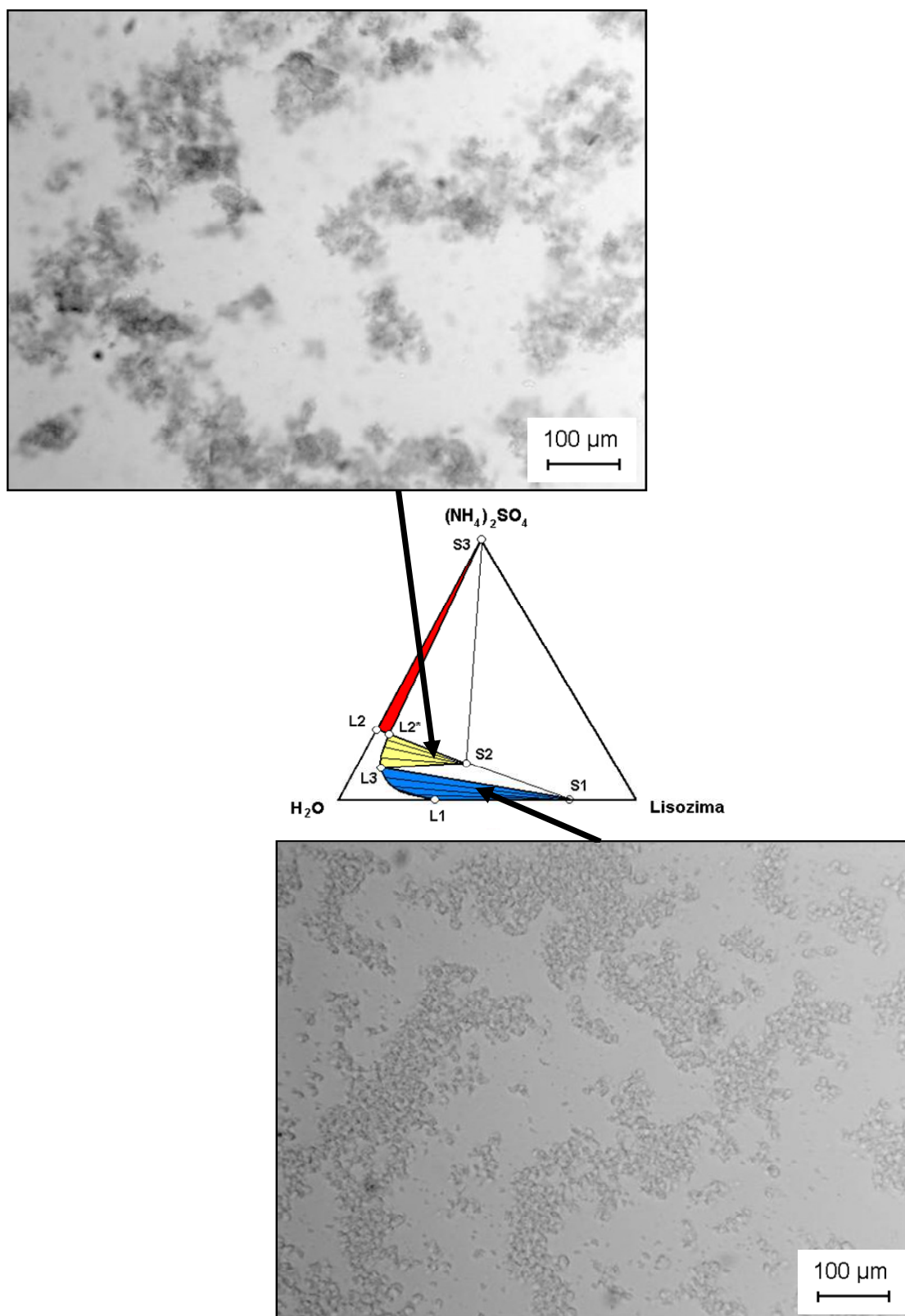


Figura 4.14: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0.

4.2. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA LISOZIMA - SULFATO DE SÓDIO - ÁGUA

4.2.1. Efeito do pH no equilíbrio de fases do sistema lisozima - sulfato de sódio - água à temperatura de 25,0°C

As concentrações mássicas de lisozima, sal e água da fase pobre e do precipitado rico em proteína após a precipitação de lisozima em sulfato de sódio a temperatura de 25,0°C e a diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 7,0 e 10,0) foram determinadas e são apresentadas na forma de diagramas de equilíbrio de fases (Figuras 4.15 - 4.18). O comportamento do equilíbrio de fases da precipitação de lisozima em sulfato de sódio assemelhou-se àquele encontrado com o sulfato de amônio a diferentes valores de pH. Verificou-se uma baixa concentração de lisozima na fase sobrenadante para altas concentrações de sal e que aumentou com a redução da concentração de sal (efeito “salting-out”) e notou-se também a partição desigual do sal sulfato de sódio na fase sobrenadante e no precipitado.

As extrapolações das extensões das linhas de amarração também indicaram a presença de precipitados verdadeiros: um complexo de proteína, sal e água a altas concentrações de sal e um sólido livre de sal e composto de proteína-água a baixas concentrações de sulfato de sódio. Notou-se que as composições mássicas dos precipitados verdadeiros a valores de pH de 2,0, 4,0, 7,0 e 10,0 na região de alta concentração de sal possuíam concentrações de proteína, água e sal diferentes (Tabela 4.3), enquanto que as composições dos precipitados verdadeiros na região de baixa concentração de sal foram aproximadamente iguais (0,86 g lisozima/g fase e 0,14 g água/g fase) para todos os valores de pH. A pequena concentração de sal (0,04 g de sal/g fase) encontrada no precipitado verdadeiro do sistema a pH igual a 2,0 e localizado na região de baixa concentração de sal, pode ser devida à presença de ácido fosfórico utilizado para a redução do pH da solução de proteína.

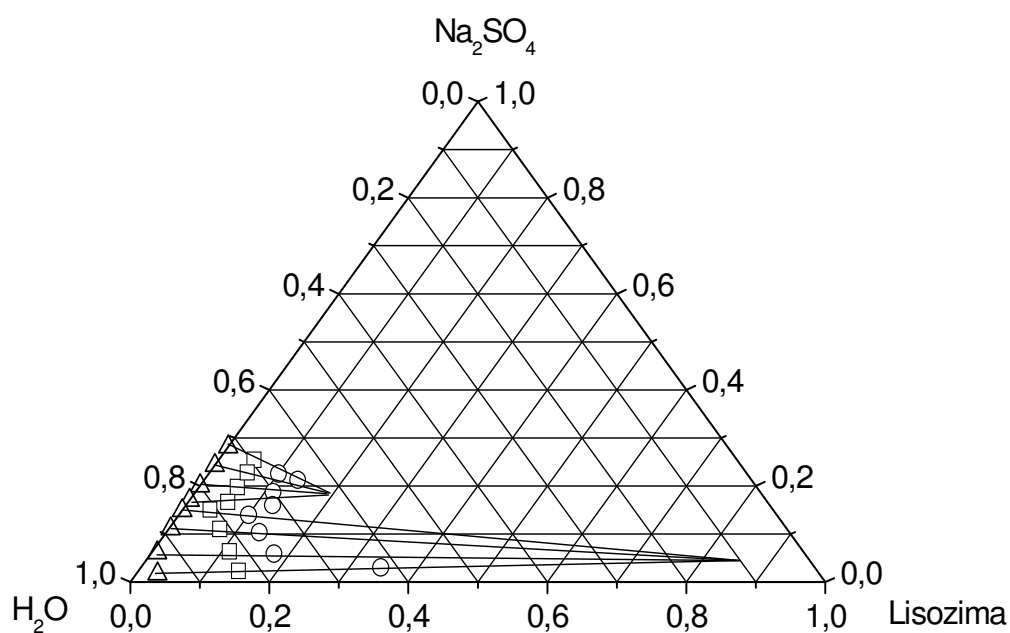


Figura 4.15: Diagrama de fases do sistema lizozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0. Concentração mássica inicial de solução de lizozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—).

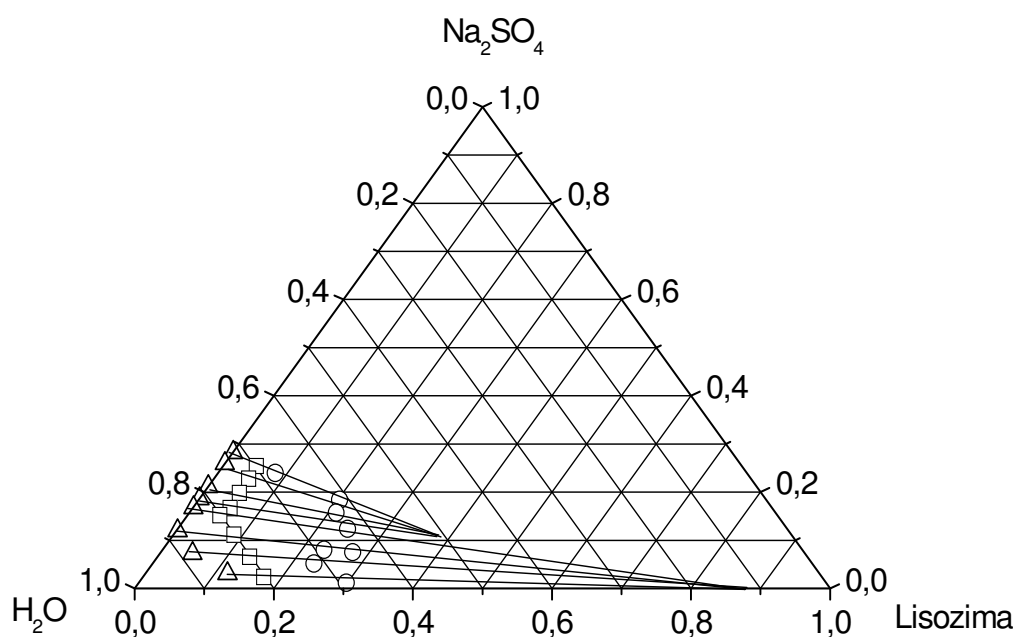


Figura 4.16: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

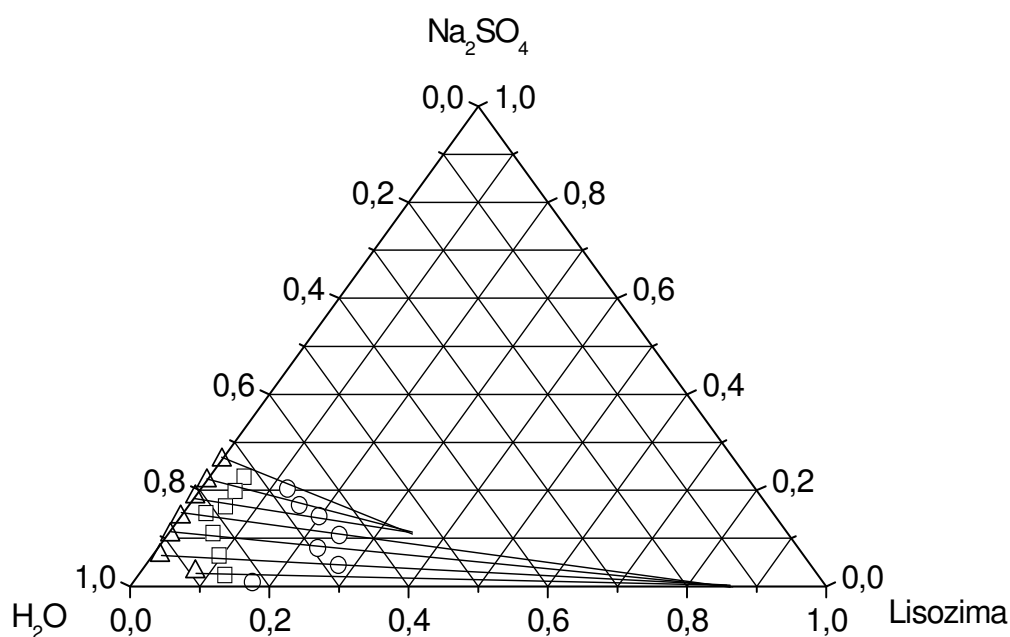


Figura 4.17: Diagrama de fases do sistema lizozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lizozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

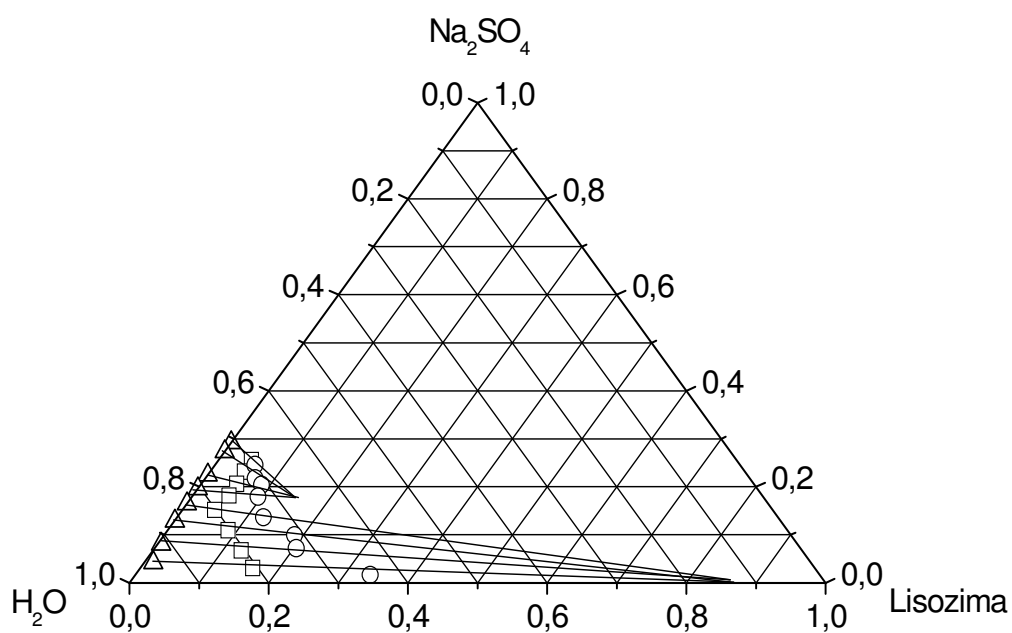


Figura 4.18: Diagrama de fases do sistema lizozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 10,0. Concentração mássica inicial de solução de lizozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—).

Tabela 4.3: Composições de lisozima, água e sal do precipitado verdadeiro na região de alta concentração de sal, nos sistemas lisozima-água-sulfato de sódio a temperatura igual a 25,0°C e a diferentes valores de pH.

pH	Lisozima (g proteína/g fase)	Sulfato de sódio (g sal/g fase)	Água (g água/g fase)
2,0	0,20	0,18	0,62
4,0	0,37	0,11	0,52
7,0	0,35	0,11	0,54
10,0	0,14	0,18	0,68

Para uma análise do efeito do pH nas concentrações de equilíbrio da lisozima em solução de sulfato de sódio, as concentrações da proteína na fase sobrenadante, anteriormente contidas nos diagramas de fase, são apresentadas em função da concentração de sulfato de sódio a temperatura de 25,0°C na Figura 4.19. Assim como com sulfato de amônio, o efeito não é muito claro, mas pode-se notar que a solubilidade da lisozima diminui com o aumento da concentração de sal. O efeito dos diferentes valores de pH nas concentrações de equilíbrio de lisozima em sulfato de sódio mostra que a lisozima foi mais solúvel a pH igual a 4,0, enquanto que a pH 10,0 obteve-se a menor solubilidade da proteína, devido possivelmente à proximidade do ponto isoelétrico da lisozima (pH 11,3).

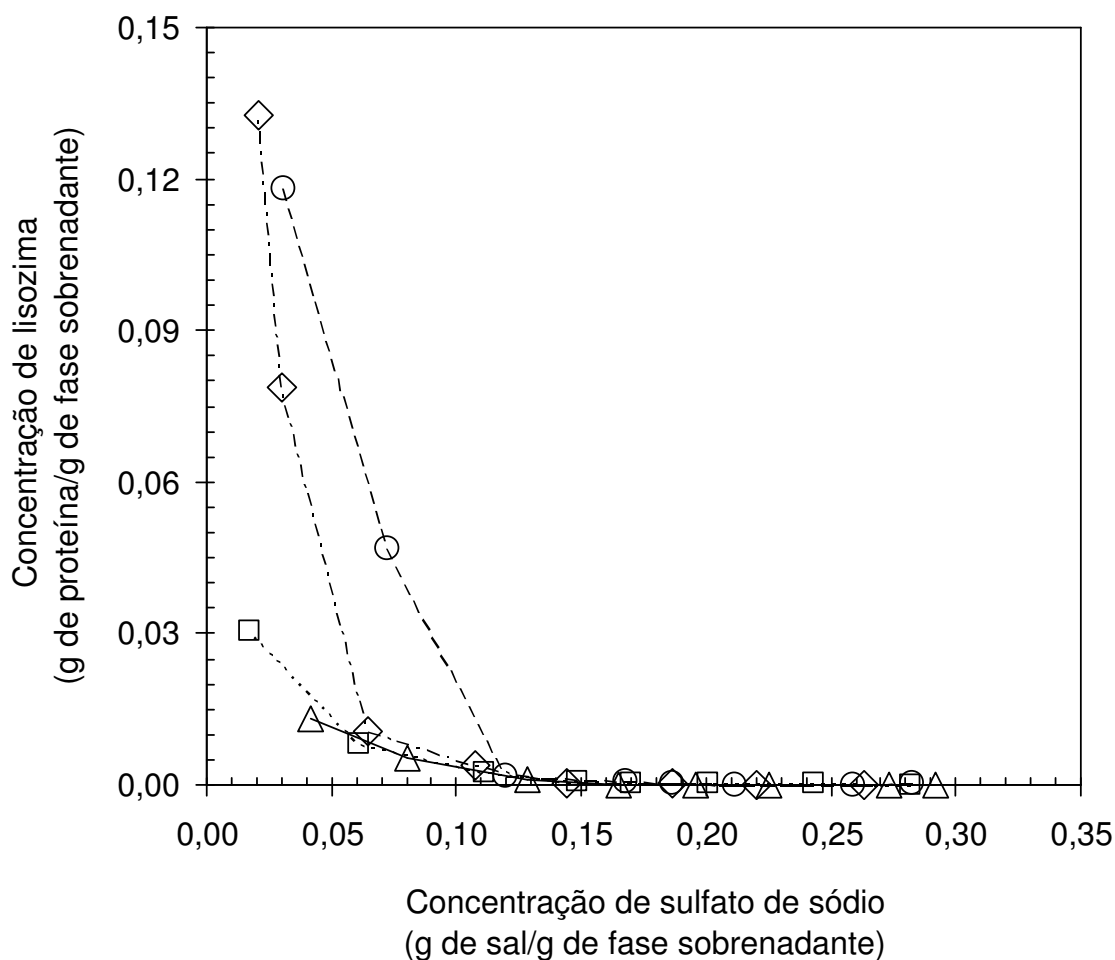


Figura 4.19: Concentrações de equilíbrio de lisozima em solução de sulfato de sódio a 25,0°C e diferentes valores de pH: 2,0 (□), 4,0 (○), 7,0 (◇), 10,0 (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 2,0 (···□···), 4,0 (---○---), 7,0 (—◇—), 10,0 (—△—).

4.2.2. Efeito da temperatura no equilíbrio de fases do sistema lisozima - sulfato de sódio - água a pH igual a 7,0

Diagramas de fase do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a pH igual a 7,0 e temperaturas de 5,0 e 15,0°C foram determinados para o estudo do efeito da temperatura (Figuras 4.20 e 4.21) e verificou-se a existência de dois precipitados

verdadeiros a 5,0 e 15,0°C, que se mostraram análogos aos determinados a pH igual a 7,0 e a 25,0°C (Figura 4.17). O precipitado verdadeiro localizado na região de alta concentração de sal continha 0,35 g de lisozima/g fase, 0,10 g de sulfato de sódio/g fase e 0,55 g de água/g fase. O precipitado verdadeiro da região de baixa concentração de sal era composto por um sólido de proteína (0,87 g lisozima/g fase) e água (0,12 g água/g fase), livre de sal. Os valores da composição dos precipitados verdadeiros estão compilados na Tabela 4.4.

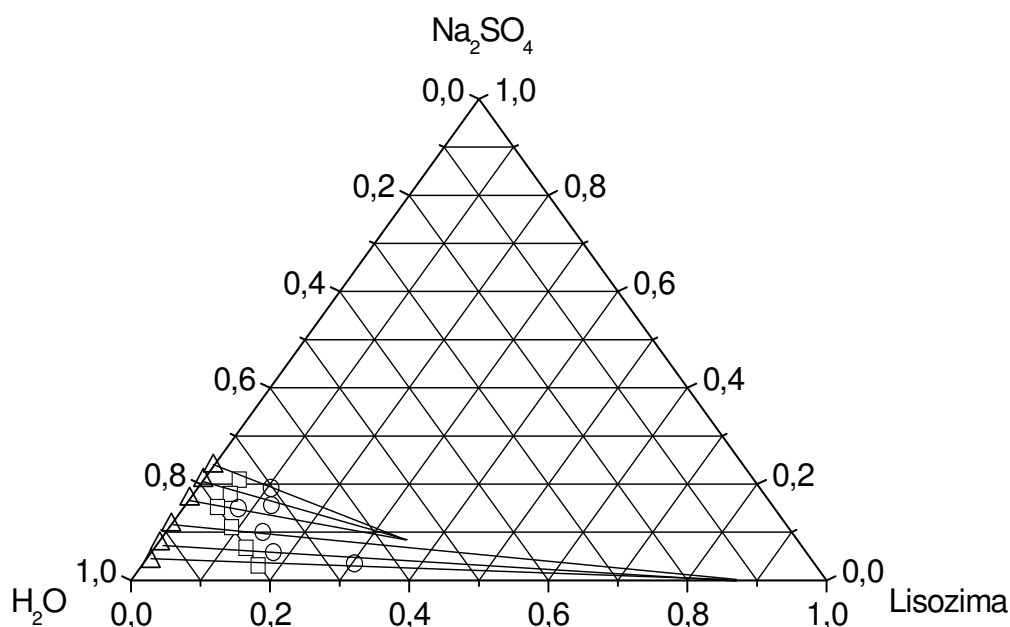


Figura 4.20: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 5,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20 g proteína/g solução; Concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (Δ), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—).

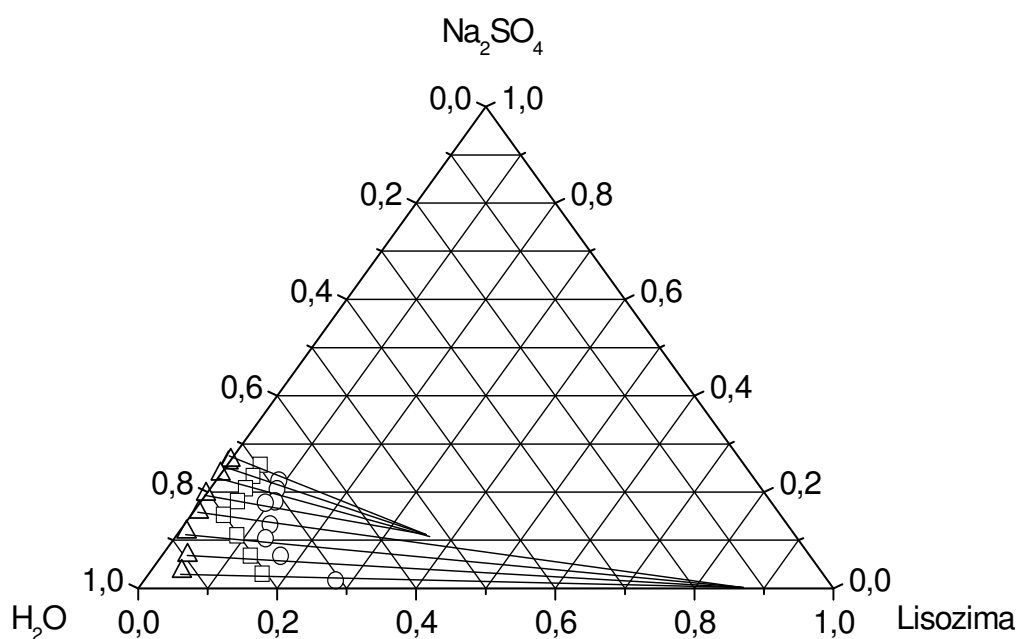


Figura 4.21: Diagrama de fases do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 15,0°C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,20 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—).

Tabela 4.4: Concentrações mássicas de lisozima, água e sal do precipitado verdadeiro nas regiões de alta e baixa concentração de sal, nos sistemas lisozima-água-sulfato de sódio a pH 7,0 e diferentes temperaturas.

Região de concentração de sal	T (°C)	Lisozima (g proteína/g fase)	Sulfato de sódio (g sal/ g fase)	Água (g água/g fase)
Alta	5	0,35	0,08	0,57
	15	0,36	0,10	0,54
	25	0,35	0,11	0,54
Baixa	5	0,86	-	0,14
	15	0,86	-	0,14
	25	0,86	-	0,14

As curvas de concentrações de equilíbrio de lisozima em solução de sulfato de sódio apresentaram um efeito “salting-out” para todos os valores de temperatura utilizados (Figura 4.22). Verificou-se que a solubilidade da lisozima em sulfato de sódio é dependente da temperatura, e mostrou-se mais sensível a baixas concentrações de sal de acordo com Howard *et al.* (1988). Além disso, notou-se que a solubilidade da proteína aumentou com elevação da temperatura.

Comparando-se os resultados obtidos para as concentrações de equilíbrio da lisozima em função da temperatura em sulfato de amônio e sulfato de sódio, verificou-se a ausência da região de “salting-in” na precipitação de lisozima com o uso de sulfato de sódio, na faixa de concentração de sal estudada. Como o ânion sulfato é comum para os dois sais estudados, uma comparação entre os cátions Na^+ e NH_4^+ pode ser realizada. Pela série de Hofmeister, sabe-se que o cátion Na^+ é mais efetivo para a indução do “salting-out” do que o cátion NH_4^+ . Apesar dos ânions exercerem uma influência maior do que os cátions na indução do “salting-out” de soluções de proteínas, segundo Bénas *et al.* (2002) os cátions podem

afetar a solubilidade de proteínas em até uma ordem de magnitude na mesma força iônica.

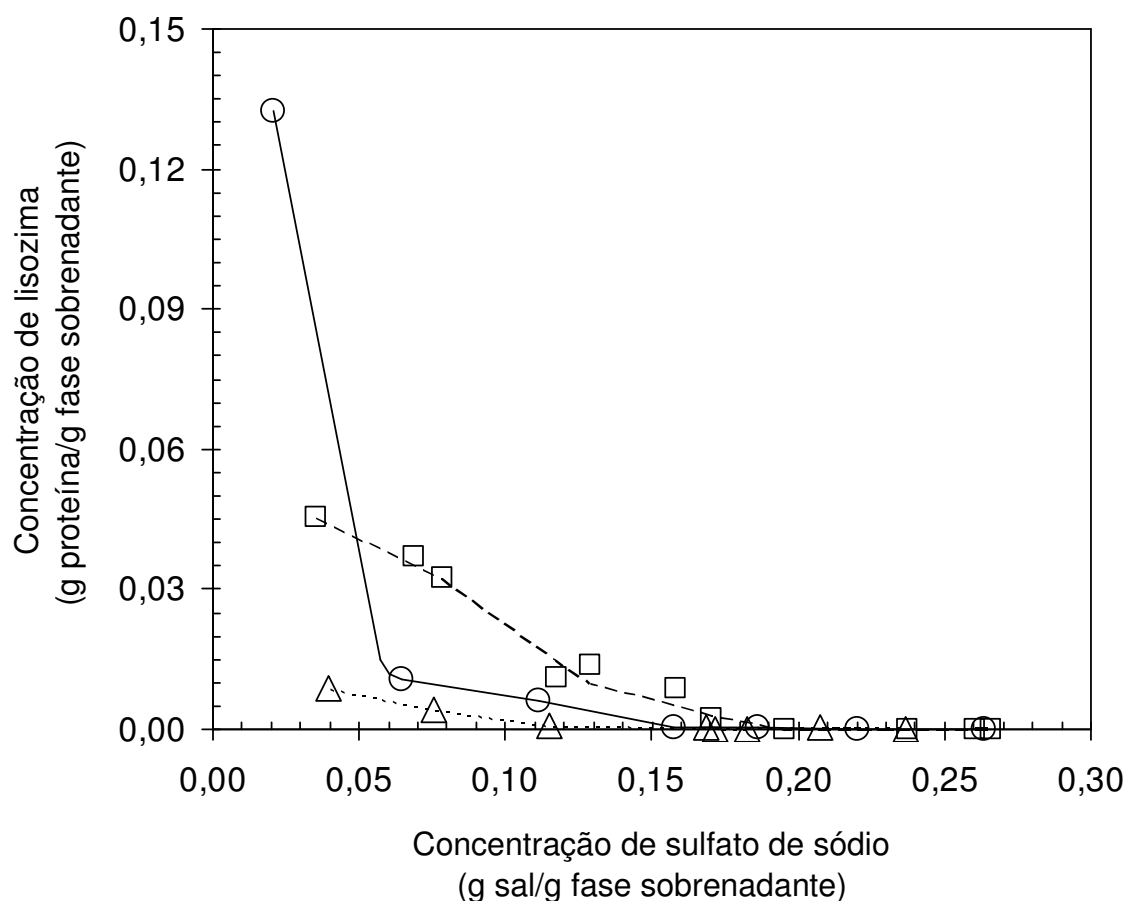


Figura 4.22: Concentrações de equilíbrio de lisozima em sulfato de sódio a pH 7,0 e a diferentes temperaturas: 25,0°C (○), 15,0°C (□), 5,0°C (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,20 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de sódio: 0,20 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 25,0°C (—○—), 15,0°C (---□---), 5,0°C (···△···).

Uma comparação quantitativa também pode ser realizada pela determinação da constante de “salting-out” (K_s). Como essa constante K_s relaciona as interações eletrostáticas no meio e a variação da tensão superficial pela presença do sal (Melander e Horváth, 1977), K_s constitui a base teórica da série de Hofmeister. Resultados obtidos por Green (1932), mostram que a constante de “salting-out” da precipitação de carboxiemoglobina em sulfato de sódio (0,72 L/mol) é maior do que em sulfato de amônio (0,56 L/mol). Neste trabalho, para a temperatura de 15,0°C, por exemplo, o valor de K_s para a precipitação de lisozima em sulfato de sódio (aproximadamente de 17,4 g solução/g de sal) também foi maior do que em sulfato de amônio (cerca de 13,9 g de solução/g de sal). Além disso, Retailleau *et al.* (1997) revelaram a ausência da região de “salting-in” na solubilidade de lisozima em cloreto de sódio (NaCl) em valores de pH de 3,0 a 9,0. Desta maneira, sugere-se que o sal sulfato de sódio apresenta uma maior capacidade de induzir o “salting-out” na precipitação de lisozima do que o sal sulfato de amônio, justificando assim a ausência da região de “salting-in” a temperaturas de 5,0 e 15,0°C, pelo menos na faixa de concentração de sal na fase sobrenadante estudada neste trabalho.

4.2.3. Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima - sulfato de sódio - água a 25,0°C e a diferentes valores de pH

Amostras do precipitado das regiões de alta e de baixa concentração de sal para o sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e diferentes valores de pH são apresentadas nas Figuras 4.23 - 4.25. Verificou-se que os precipitados obtidos para as áreas de alta (S2) e de baixa (S1) concentração de sal foram distintos. Para os sistemas a pH iguais a 2,0 e 7,0 observou-se que os cristais obtidos na região de baixa concentração de sal apresentam formas cristalinas semelhantes. Como nessa região, a concentração de sal é baixa, de aproximadamente 0,05 g de sal/g de fase e a concentração de lisozima é cerca de 0,33 g de proteína/g de fase, é possível que os cristais observados nessa região sejam cristais de lisozima.

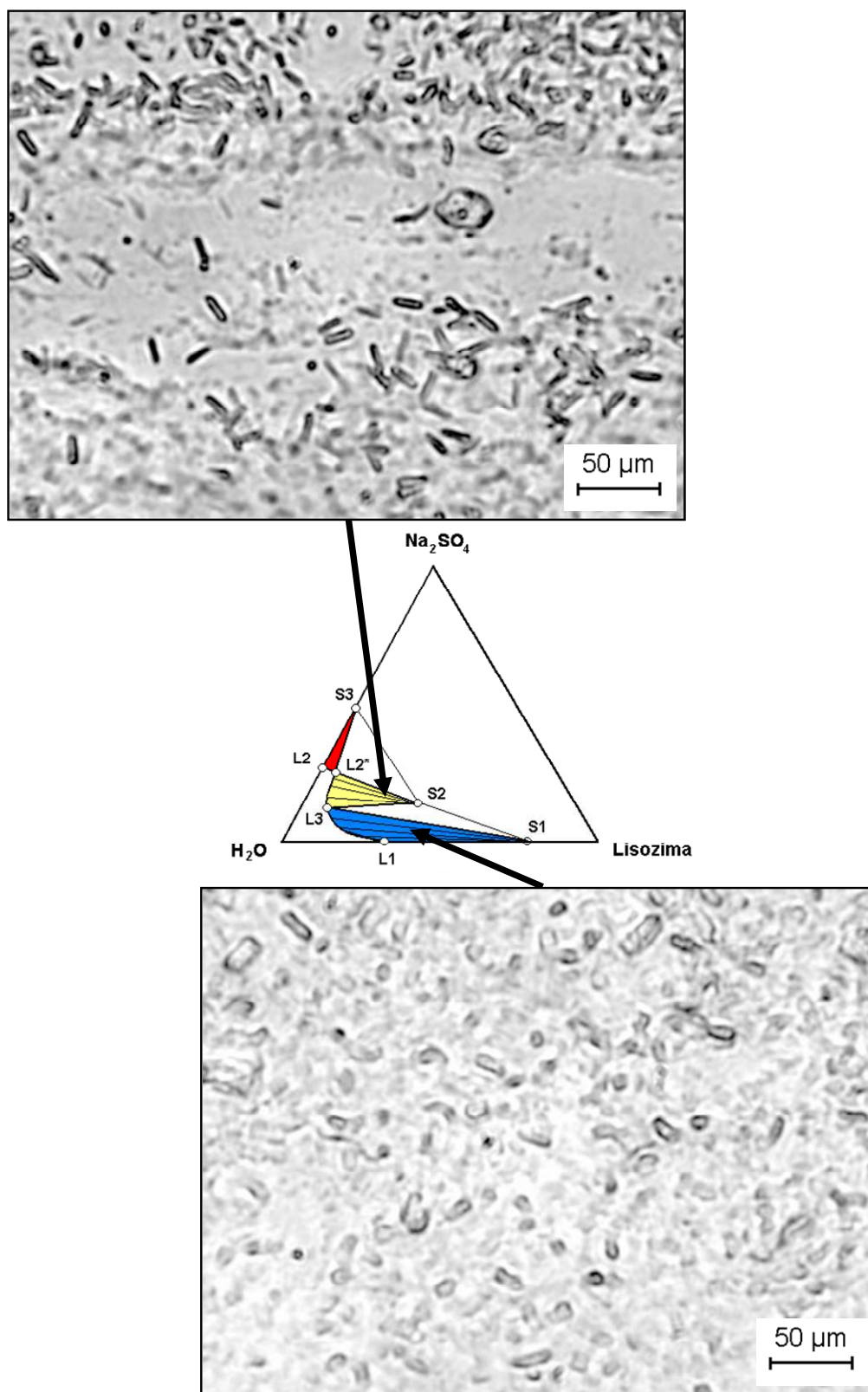


Figura 4.23: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 2,0.

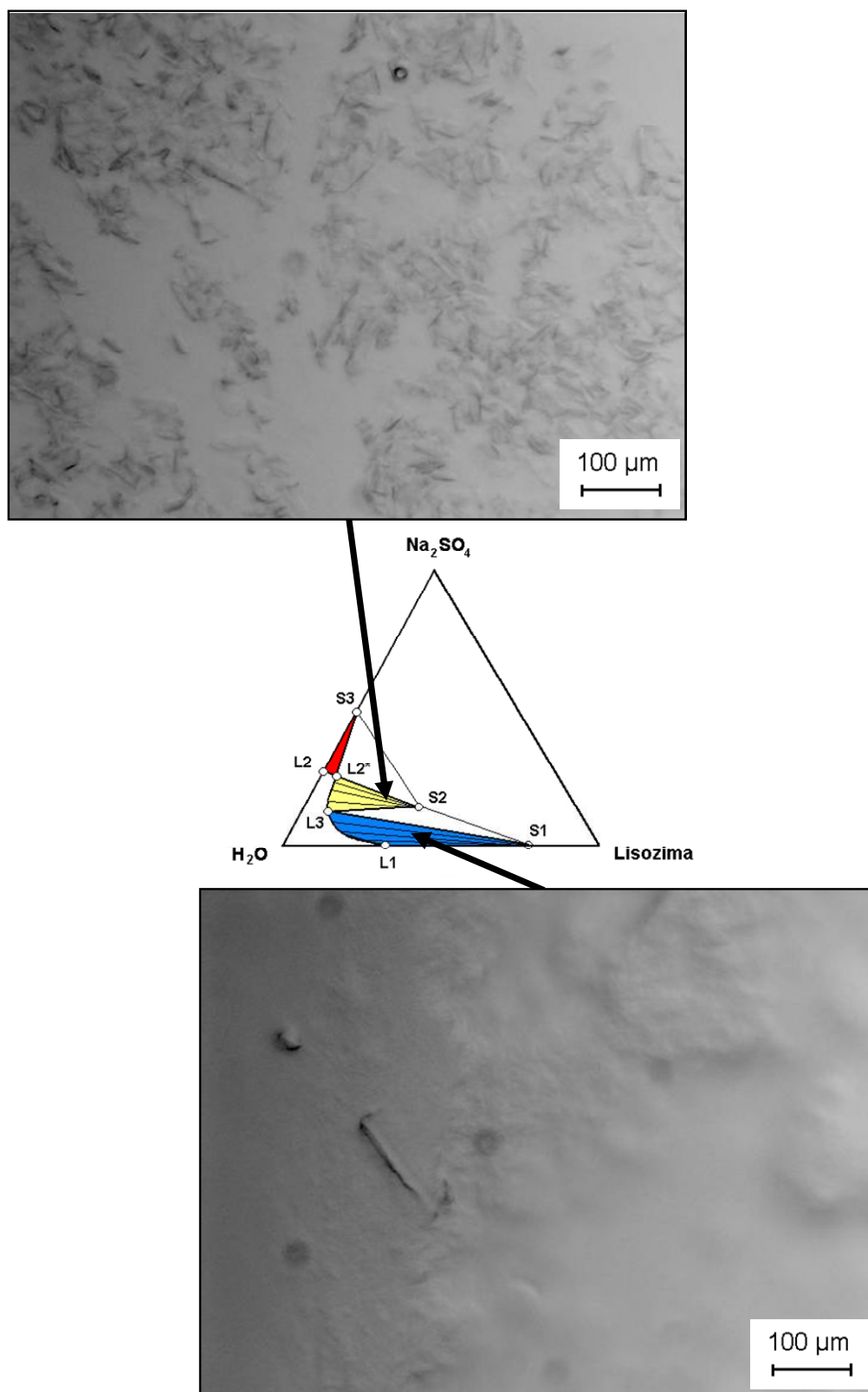


Figura 4.24: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 4,0.

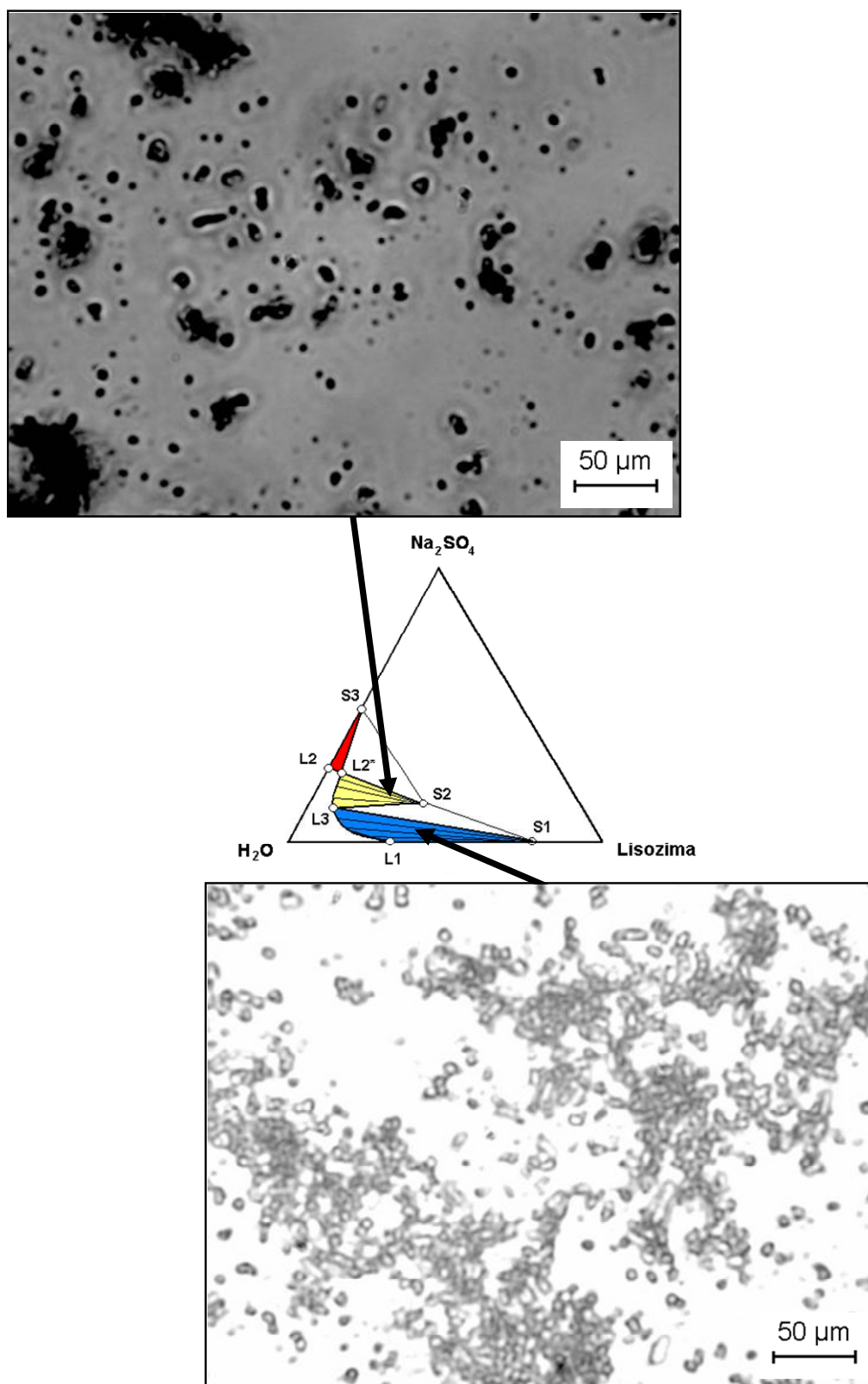


Figura 4.25: Análise de microscopia óptica do precipitado do sistema lisozima-sulfato de sódio-água a 25,0°C e pH igual a 7,0.

4.3. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA LISOZIMA - CLORETO DE SÓDIO - ÁGUA A DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURA

Os diagramas de fase do sistema lisozima - cloreto de sódio - água a pH igual a 7,0 e diferentes valores de temperatura (5,0, 15,0 e 25,0°C) contendo as concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante e no precipitado são apresentados nas Figuras 4.26 - 4.28. As extrapolações das linhas de amarração indicaram a presença de um único precipitado verdadeiro para as temperaturas de 5,0, 15,0 e 25,0°C, composto apenas de proteína e água (0,6 g de proteína/ g de fase e 0,4 g de água/g de fase).

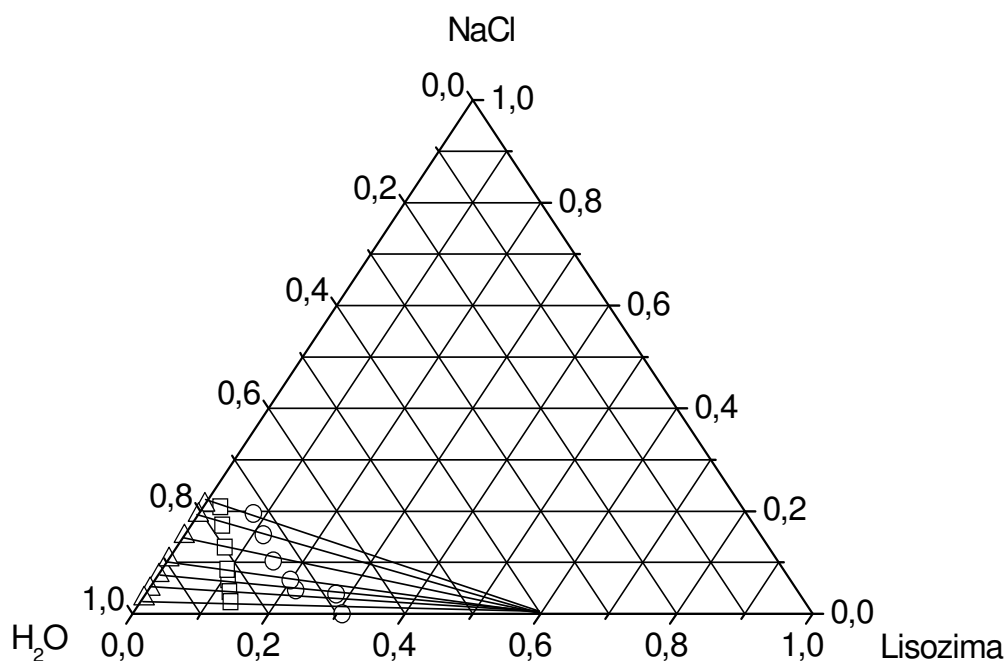


Figura 4.26: Diagrama de fases do sistema lisozima-cloreto de sódio-água a 5,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,25 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—).

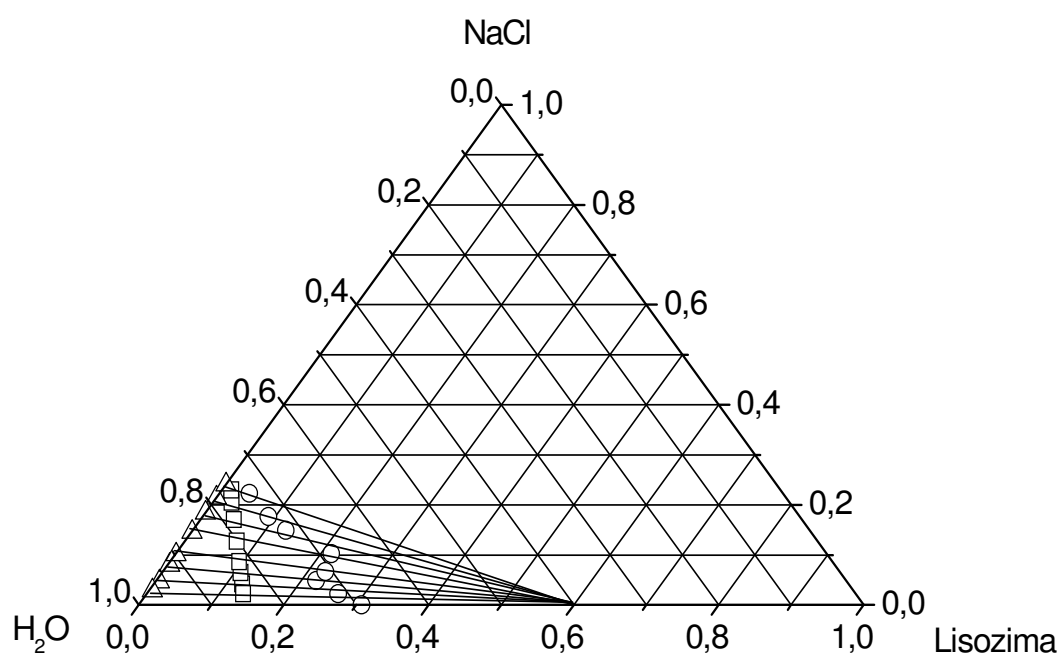


Figura 4.27: Diagrama de fases do sistema lisozima-cloreto de sódio-água a 15,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,25 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—).

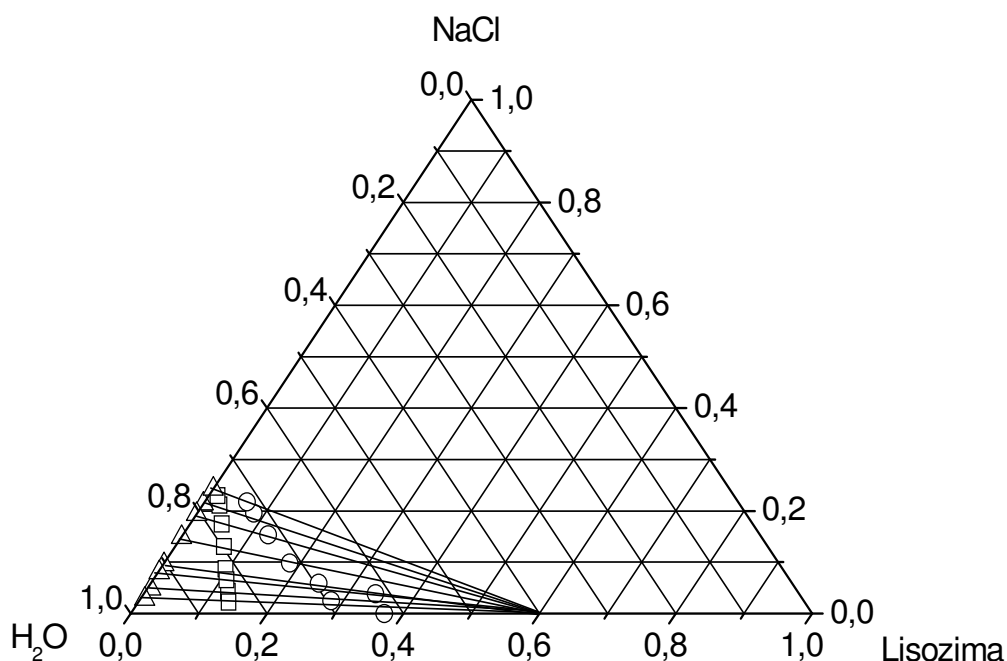


Figura 4.28: Diagrama de fases do sistema lisozima-cloreto de sódio-água a 25,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,25 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (Δ), composição do precipitado (O); linhas de amarração (—).

De acordo com Jollès e Berthou (1972), a lisozima apresenta uma variação na sua forma cristalina, de acordo com o tipo de lisozima (galinha, humana, ganso), tipo e concentração do sal utilizado no processo de cristalização, concentração de proteína, pH e temperatura. Uma vez que o tipo e concentração de lisozima (clara de ovo de galinha) e de sal (cloreto de sódio), bem como o valor do pH (7,0) utilizados foram iguais para os sistemas apresentados nas Figuras 4.26 - 4.28, pode-se avaliar a influência da temperatura na formação de um único

precipitado verdadeiro de composição idêntica para as temperaturas de 5,0, 15,0 e 25,0°C. Berthou e Jollès (1974) estudaram o efeito da temperatura na mudança da forma cristalina da lisozima em solução de cloreto de sódio a valores de pH 4,0 - 7,0 e observaram que nestas condições, a temperaturas de -36,0 a 25,0°C, tem-se a presença de cristais tetraédricos, enquanto que uma segunda forma, a ortorrômbica surge entre 25,0 e 60,0°C, sendo que a 25,0°C, as duas formas cristalinas estão presentes em equilíbrio. Ou seja, a 25,0°C tem-se a temperatura de transição entre a forma tetraédrica para a forma ortorrômbica.

Desta maneira, os precipitados verdadeiros encontrados para os sistemas lisozima-cloreto de sódio-água a 5,0 e 15,0°C, possivelmente encontram-se na forma de cristais tetraédricos de lisozima, conforme largamente relatado na literatura. Para a temperatura de 25,0°C, uma possível razão para a ausência de cristais ortorrômbicos tenha sido a temperatura de transição, pois apesar do relato de Berthou e Jollès (1974), que esta temperatura é de 25,0°C, cristais ortorrômbicos só foram verificados acima de 30,0°C por Ataka e Asai (1988), Pusey e Gernert (1988), Cacciopo *et al.* (1991), Guilloteau *et al.* (1992) e Ewing *et al.* (1994).

Além disso, efeitos cinéticos não podem ser, nesse caso específico, descartados *a priori*, pois segundo Berthou e Jollès (1974) enquanto cristais de lisozima na forma tetraédrica a 20,0°C formaram-se de 3 - 6 h, cristais ortorrômbicos a 40,0°C só foram verificados após 6 - 30 dias. Aquecendo-se a solução de proteína e sal de 20,0°C para a temperatura de 40,0°C, a transição de cristais tetraédricos para ortorrômbicos levou até 60 dias para ocorrer. Essa formação mais lenta dos cristais de lisozima na forma ortorrômbica, quando comparada à forma tetraédrica, também foi sugerida por Ataka e Asai (1988), que observaram a formação de cristais ortorrômbicos após aproximadamente 15 dias. Finalmente, uma última possibilidade talvez seja que o precipitado verdadeiro obtido para o sistema a 25,0°C encontre-se na forma ortorrômbica, porém tenha a mesma composição de proteína e água do precipitado verdadeiro encontrado nos sistemas a 5,0 e 15,0°C.

Curvas de concentrações de equilíbrio, apresentando as concentrações mássicas de lisozima na fase sobrenadante, contidas nos diagramas de fase, em função das concentrações de sal cloreto de sódio podem ser observadas na Figura 4.29. O efeito da temperatura mostrou que a solubilidade da lisozima diminui com a redução da temperatura, em concordância com Howard *et al.* (1988), Cacciopo e Pusey (1991), Guilloteau *et al.* (1992) e Rosenberger *et al.* (1993).

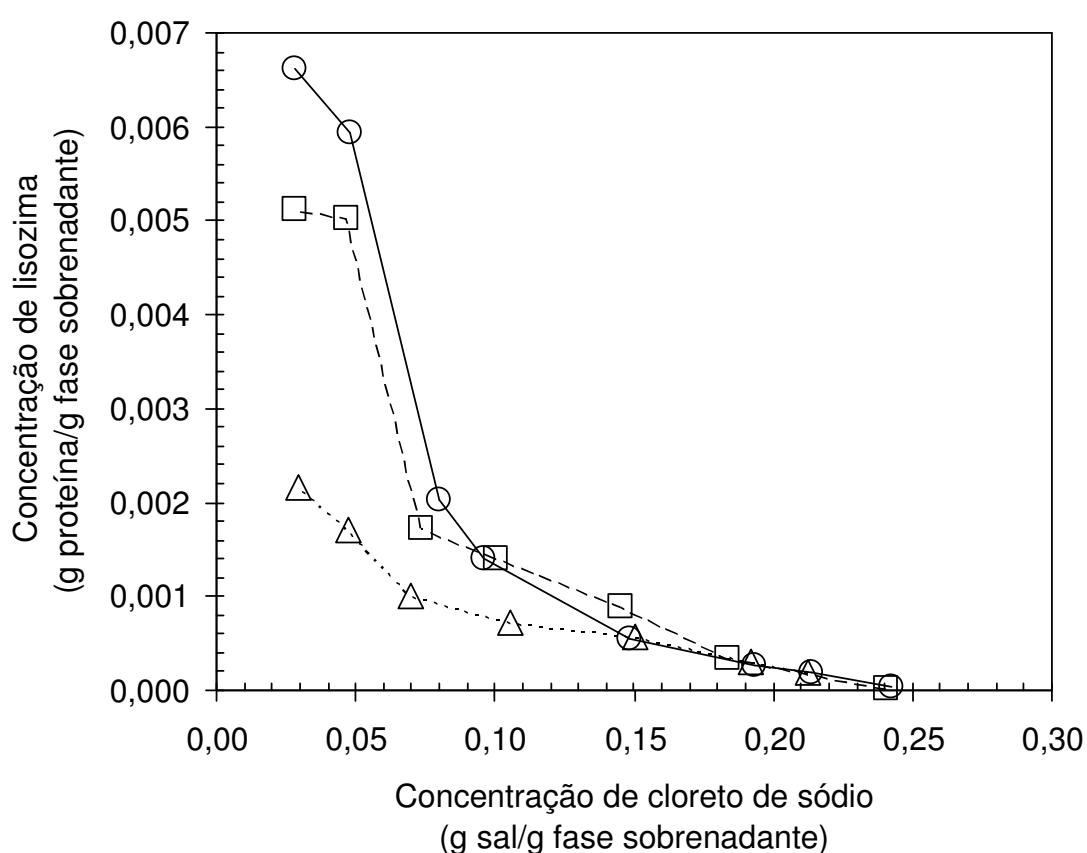


Figura 4.29: Concentrações de equilíbrio de lisozima em cloreto de sódio a pH 7,0 e a diferentes temperaturas: 25,0°C (○), 15,0°C (□), 5,0°C (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de sódio: 0,25 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 25,0°C (—○—), 15,0°C (---□---), 5,0°C (···△···).

Comparando-se os resultados das concentrações de equilíbrio de lisozima a diferentes valores de temperatura com o uso de sulfato de sódio e cloreto de sódio, verifica-se que o sal cloreto de sódio é mais eficaz para a indução do “salting-out” que o sal sulfato de sódio. Para a temperatura de 25,0°C e concentração de sal de aproximadamente 0,02 g de sal/g de solução, por exemplo, enquanto a concentração de lisozima da fase sobrenadante é de 0,13 g de proteína/g de fase utilizando-se sulfato de sódio, a concentração de lisozima em cloreto de sódio é aproximadamente 20 vezes menor (0,006 g de proteína/g de solução). Esses resultados mostram que a efetividade dos ânions na diminuição da solubilidade da lisozima segue o oposto da série de Hofmeister e são consistentes com os trabalhos realizados por Riès-Kautt e Ducruix (1989), Guilloteau *et al.* (1992) e Rettaileau *et al.* (2002).

4.4. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA LISOZIMA - CARBAMATO DE AMÔNIO - ÁGUA A DIFERENTES VALORES DE TEMPERATURA

Concentrações mássicas de proteína, sal volátil e água da fase sobrenadante e do precipitado da precipitação de lisozima com o sal carbamato de amônio a diferentes valores de temperatura (5,0, 15,0 e 25,0°C) são apresentadas nos diagramas de fase das Figuras 4.30 - 4.32. Estudos de variações de pH com o sal carbamato de amônio não foram possíveis por se tratar de um sal volátil, pois a adição de ácidos ou bases para a mudança do pH modifica as reações de equilíbrio envolvidas na formação do sal volátil (Equações 2.1 - 2.4) e também a concentração do carbamato de amônio.

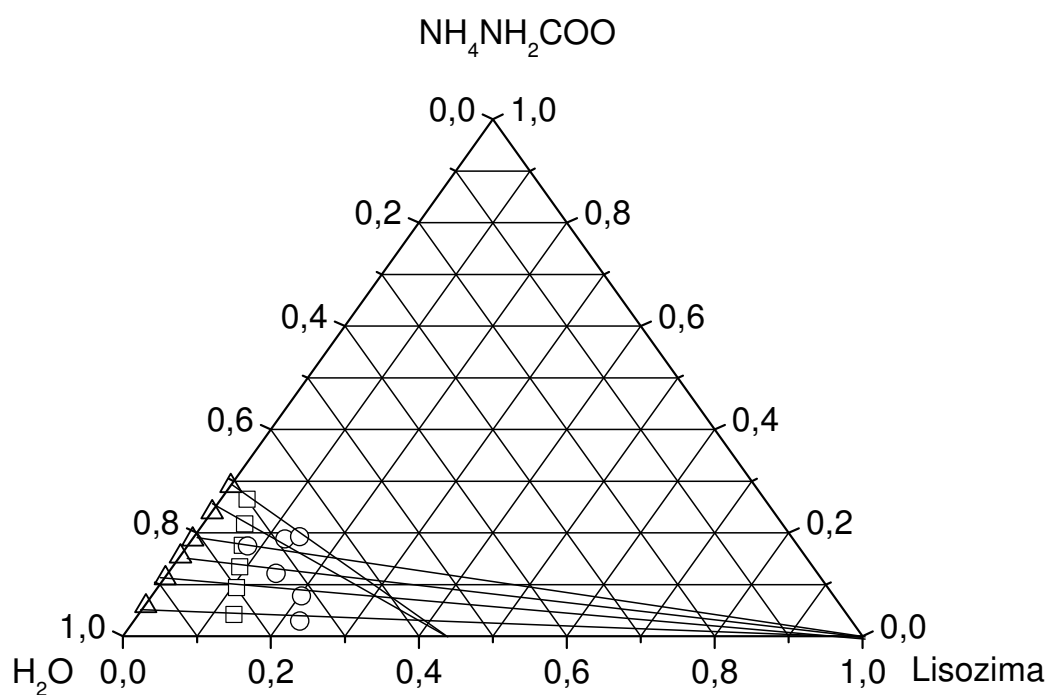


Figura 4.30: Diagrama de fases do sistema lisozima-carbamato de amônio-água a 5,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,35 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

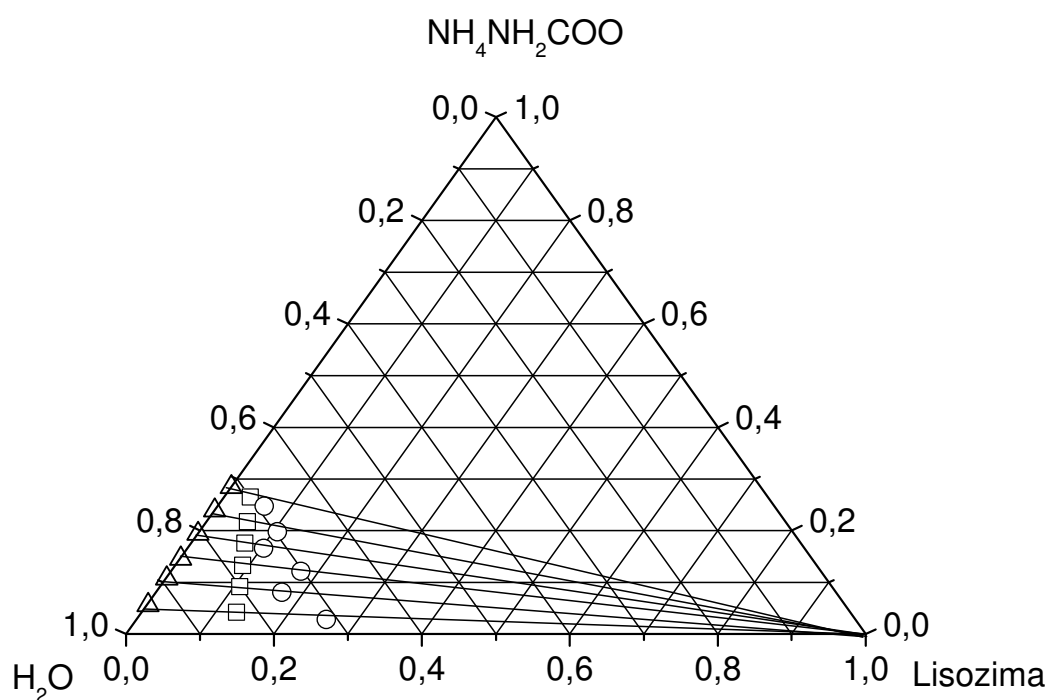


Figura 4.31: Diagrama de fases do sistema lisozima-carbamato de amônio-água a 15,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,35 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—).

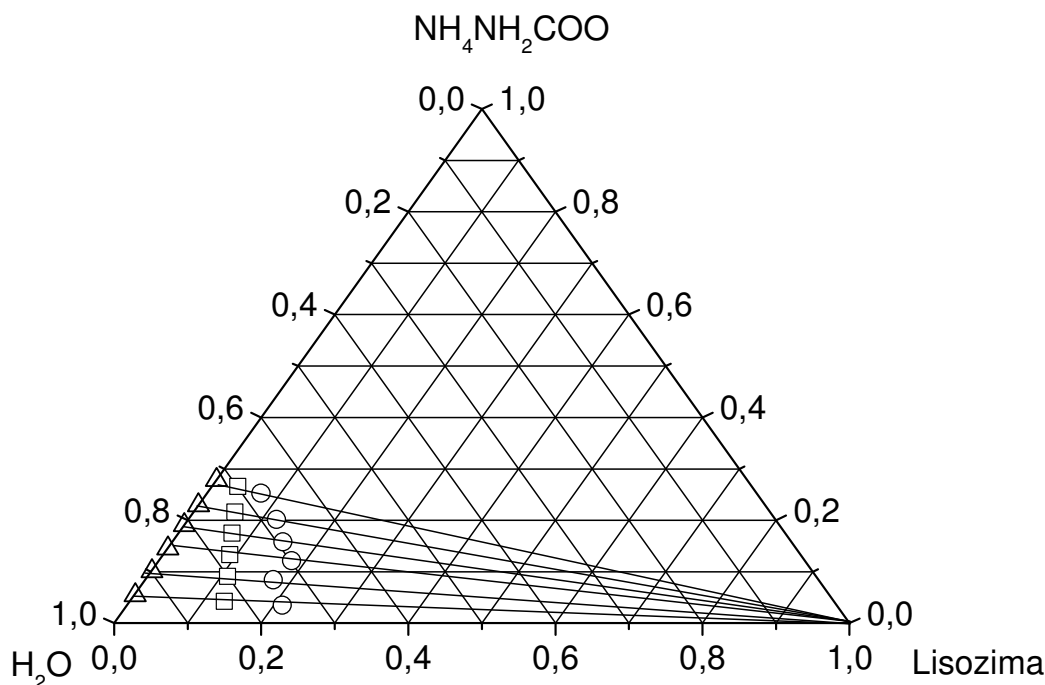


Figura 4.32: Diagrama de fases do sistema lisozima-carbamato de amônio-água a 25,0°C. Concentração mássica inicial de solução de lisozima: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,35 g sal/g solução; composição da alimentação (□), composição da fase sobrenadante (△), composição do precipitado (○); linhas de amarração (—).

Os precipitados verdadeiros obtidos da intersecção de extensões das linhas de amarração foram determinados para a lisozima-sal volátil carbamato de amônio-água. Observou-se um comportamento distinto daquele verificado para lisozima precipitada em sais convencionais: houve a formação de precipitados verdadeiros compostos apenas de proteína e não a formação de complexos de proteína, água e sal. A precipitação de lisozima em carbamato de amônio a temperatura de 25,0 e 15,0°C apresentaram comportamento similar com a presença de um único precipitado verdadeiro composto apenas de proteína. À

temperatura de 5,0°C, nota-se a formação de dois precipitados verdadeiros: na região de alta concentração de sal volátil teve-se a formação de um precipitado verdadeiro composto de lisozima (0,4 g proteína/g fase) e água (0,6 g água/ g fase); na região de baixa concentração de sal, teve-se um precipitado verdadeiro contendo apenas lisozima, como verificado para as demais temperaturas. Uma possível causa para este comportamento distinto talvez seja a metaestabilidade do sistema a baixas temperaturas. Contribui para esta possibilidade o fato de que, se as composições coexistentes correspondem a pontos de equilíbrio estável, as extensões das linhas de amarração não deveriam se cruzar, como ocorre com o sistema a 5,0°C. Sugerindo-se ainda a possibilidade da metaestabilidade do sistema a baixas temperaturas, estudo realizado por Broide *et al.* (1996) indicou que o intervalo de temperatura, no qual ocorre a separação sólido-líquido é de 30 a 50°C. Quando a solução de lisozima é resfriada rapidamente, a temperatura de 0 a 20°C, ocorre uma separação líquido-líquido, anteriormente à cristalização, em uma solução de proteína altamente metaestável. Além disso, Muschol e Rosenberger (1997) observaram que a baixas concentrações de proteína ocorre a formação de cristais muito finos, igualmente encontrados em estudos de cristalização de lisozima a alta pressão, localizados na região metaestável líquido-líquido.

Ressalta-se também que os ensaios a temperatura de 5,0°C foram realizados duas vezes, indicando os mesmos resultados, sugerindo que não se trata de um problema puramente cinético, mas possivelmente de um comportamento metaestável. Portanto, a composição do precipitado verdadeiro do sistema a 5,0°C encontrado a altas concentrações de sal deve ser uma fase metaestável, que não corresponde a um estado de equilíbrio verdadeiro e, por isso, de composição tão distinta àquelas encontradas para temperaturas maiores de 15,0 e 25,0°C.

Após a determinação dos precipitados verdadeiros dos sistemas lisozima-sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio-água, pode-se verificar uma semelhança entre os diagramas de fase dos sistemas contendo lisozima a 25,0°C em que o ânion do sal é o mesmo – sulfato de amônio e sulfato de sódio. O mesmo não ocorreu entre os sais em que o cátion é o mesmo (carbamato de amônio/sulfato de amônio e sulfato de sódio/cloreto de sódio). Isso pode ser um indício de que a hipótese de ligação do ânion do sal como contra-íon na precipitação de lisozima pode ser um fator relevante (item 2.4).

Pelas curvas de concentração de equilíbrio de lisozima em carbamato de amônio a diferentes temperaturas (Figura 4.33) verificou-se também o comportamento “salting-out” como foi visto para a lisozima em sais convencionais. Porém, diferentemente do que ocorreu com os sais anteriormente vistos, a solubilidade da proteína em solução de sal volátil aumentou com a redução da temperatura, ou seja, um comportamento de solubilidade retrógrada. Christopher *et al.* (1998) avaliaram a dependência da solubilidade em função da temperatura de 24 proteínas e constataram que 54% demonstraram comportamento de solubilidade retrógrada. Ainda segundo Christopher *et al.* (1988), a lisozima em solução de acetato de sódio apresenta solubilidade dependente da temperatura, porém não demonstra comportamento retrógrado, indicando que esse fenômeno pode ser devido ao sal volátil carbamato de amônio. Contribui para este fato, os resultados verificados neste trabalho para a lisozima em sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio, os quais não mostraram solubilidade retrógrada, ou mesmo na literatura para a lisozima em tiocianato de sódio e p-toluenosulfonato de sódio (Guilloteau *et al.*, 1992) e em cloreto de sódio (Rosenberger *et al.*, 1993 e Forsythe *et al.*, 1994). A razão para o comportamento de solubilidade retrógrada devido ao sal carbamato de amônio ainda é desconhecida, mas não se podem desprezar os equilíbrios que se estabelecem em uma solução deste sal, que são complexos, envolvendo reações de ionização de amônia e dióxido de carbono, bem como a reação simultânea desses dois componentes (Equações 2.1 - 2.4).

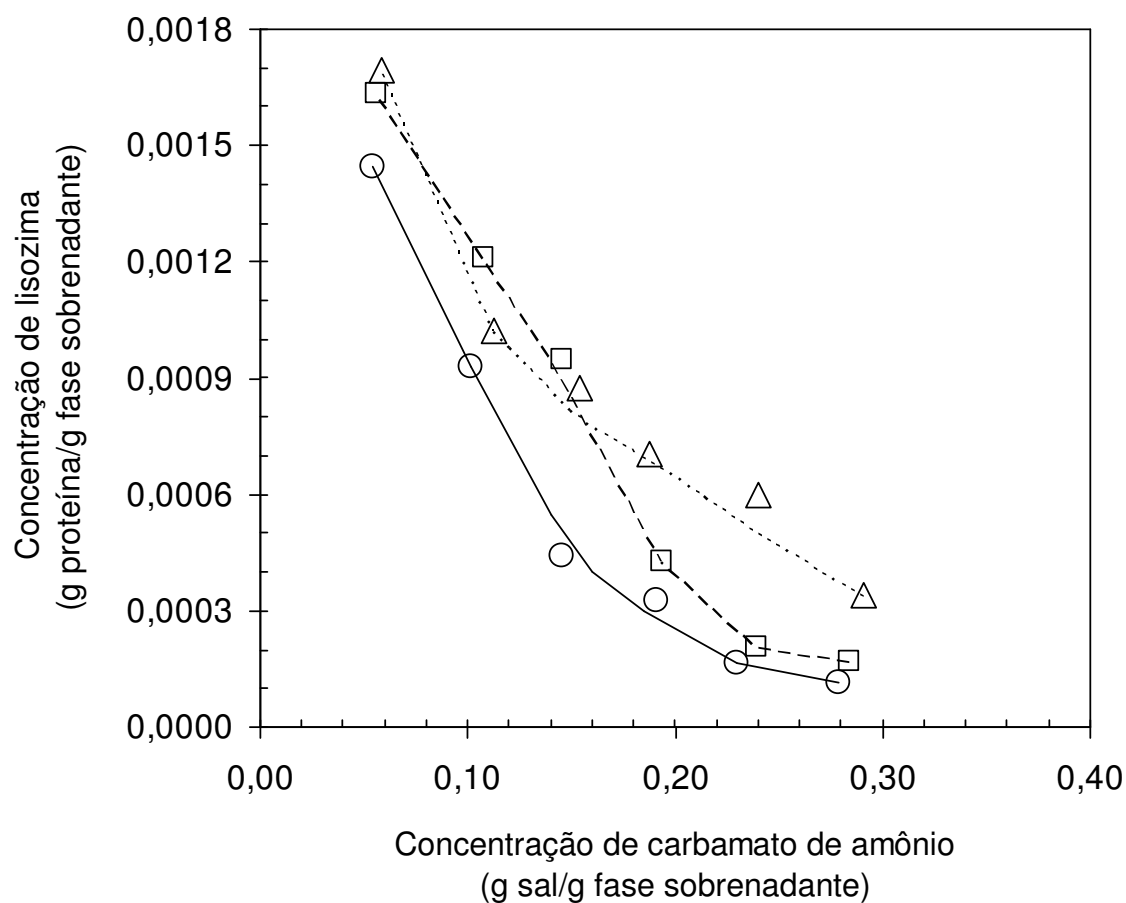


Figura 4.33: Concentrações de equilíbrio de lisozima em carbamato de amônio a pH 7,0 e a diferentes temperaturas: 25,0°C (○), 15,0°C (□), 5,0°C (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de carbamato de amônio: 0,35 g sal/g solução. As linhas são apenas guias: 25,0°C (—○—), 15,0°C (---□---), 5,0°C (···△···).

4.5. BALANÇOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LISOZIMA

Experimentos de precipitação de lisozima com os sais sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio específicos foram realizados para o cálculo dos balanços de atividade e de massa da lisozima (Tabelas 4.5 e 4.6). Através desses balanços, pode-se avaliar mesmo que pontualmente, o efeito da precipitação na atividade da lisozima como medida, mesmo que indireta, da integridade estrutural e funcional da molécula após a precipitação. Para a obtenção da atividade enzimática e concentração mássica da lisozima na fase sobrenadante e no precipitado, escolheu-se apenas um valor de alimentação correspondente a cada precipitado verdadeiro anteriormente determinado para os sistemas lisozima-sal-água a pH igual a 7,0 e temperaturas de 5,0, 15,0 e 25,0°C. Por exemplo, para o sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e temperatura de 25,0°C obtiveram-se dois precipitados verdadeiros, um na região de alta concentração de sal e outro na região de baixa concentração de sal. Desta maneira, dois valores de alimentação, inseridos nessas regiões, foram escolhidos para a determinação dos balanços de atividade e massa de lisozima. Para sistemas em que apenas um precipitado verdadeiro foi obtido, escolheu-se um valor de alimentação em uma região de alta concentração de sal.

Os valores de recuperação de massa da lisozima foram próximos às concentrações mássicas iniciais, indicando a consistência do balanço de massa de proteína. Os balanços de atividade enzimática da lisozima para os sistemas lisozima-sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio-água na região de alta concentração de sal apresentaram uma perda acentuada de atividade de lisozima de 60 a 75%, independente da temperatura utilizada. Porém, na região de baixa concentração de sal para estes sistemas, ocorreu uma redução de cerca de 5 a 15% da atividade enzimática quando comparado aos valores de atividade de proteína alimentada, o que indica que a perda de atividade da lisozima pode estar associada à concentração de sal.

Tabela 4.5: Balanço de massa de lisozima dos sistemas lisozima-sal-água a pH igual a 7,0 e a diferentes valores de temperatura

Sal	T (°C)	Região de concentração de sal	Concentração mássica de proteína (g de proteína/g de fase sobrenadante ou de precipitado)		
			Fase sobrenadante	Precipitado	Recuperação total
Sulfato de amônio	5	Alta	0,00003	0,1264	0,1264
			(0,02%) ²	(88%)	(88%)
		Baixa	0,0243	0,3840	0,4083
			(6,0%)	(95%)	(101%)
	25	Alta	0,00008	0,0884	0,0885
			(0,09%)	(98%)	(98%)
		Baixa	0,0232	0,3340	0,3572
			(6,4%)	(93%)	(99%)
Sulfato de sódio	25	Alta	0,00004	0,1285	0,1285
			(0,03%)	(106%)	(106%)
		Baixa	0,0153	0,2746	0,2899
			(5,2%)	(93%)	(98%)
Carbamato de amônio	5	Alta	0,00065	0,1702	0,1709
			(0,4%)	(102%)	(102%)
		Baixa	0,00275	0,3767	0,3795
			(0,7%)	(98%)	(99%)
	25	Alta	0,00015	0,1690	0,1692
			(0,09%)	(101%)	(101%)
Cloreto de sódio	15	Alta	0,00080	0,1514	0,1522
			(0,6%)	(109%)	(110%)
		Baixa	0,00377	0,3750	0,3788
			(1,0%)	(102%)	(103%)
	25	Alta	0,00027	0,1202	0,1205
			(0,2%)	(88%)	(88%)

² Os valores em porcentagem representam fração em relação à quantidade alimentada.

Tabela 4.6: Balanço de atividade enzimática de lisozima dos sistemas lisozima-sal - água a pH igual a 7,0 e a diferentes valores de temperatura.

Sal	T (°C)	Região de concentração de sal	Atividade enzimática total da lisozima (UA)		
			Fase sobrenadante	Precipitado	Recuperação total
Sulfato de amônio	5	Alta	1,62	699,08	700,70
			(0,06%) ³	(24,87%)	(24,92%)
		Baixa	388,78	6772,47	7161,25
	25	Alta	(4,89%)	(85,21%)	(90,10%)
			1,64	459,42	461,06
		Baixa	(0,06%)	(26,05%)	(26,15%)
Sulfato de sódio	5	Alta	385,16	5585,86	5971,02
			(5,46%)	(79,21%)	(84,68%)
		Baixa	0,70	829,75	830,45
	25	Alta	(0,03%)	(35,03%)	(35,06%)
			235,41	4523,99	4759,40
		Baixa	(4,07%)	(78,13%)	(82,20%)
Carbamato de amônio	5	Alta	13,69	3071,37	3085,06
			(0,38%)	(94,15%)	(94,53%)
		Baixa	49,86	7115,00	7164,86
	25	Alta	(0,60%)	(94,54%)	(95,14%)
			1,96	3288,21	3290,17
		Baixa	(0,06%)	(100,24%)	(100,3%)
Cloreto de sódio	15	Alta	17,04	1190,92	1207,96
			(0,63%)	(43,88%)	(44,51%)
		Baixa	79,88	6542,31	6622,19
	25	Alta	(1,11%)	(91,16%)	(92,27%)
			6,40	1030,43	1036,83
		Baixa	(0,24%)	(38,50%)	(38,74%)

³ Os valores em porcentagem representam fração em relação à quantidade alimentada (19.563,57 UA/mg).

Estudos prévios na literatura, associaram a perda de atividade da lisozima à presença de sal na solução, segundo Chang e Carr (1970) a lisozima é praticamente inativa na ausência de sal e possui atividade máxima a baixas concentrações de sal, a valores de força iônica de cerca de 0,07 mol/L. No entanto, a inibição da proteína ocorre a altas concentrações de sal e essa inibição é acentuada quando associada a valores elevados de pH. De acordo com Davies *et al.* (1969), na degradação das células do substrato pela lisozima, a primeira etapa é a adsorção da molécula de lisozima na superfície da parede celular e essa ligação ocorre através de forças eletrostáticas. Como os grupos ionizáveis da parede celular do substrato *Micrococcus lysodeikticus* são predominantemente carregados por cargas negativas e a lisozima possui carga líquida positiva, quando o pH do meio é inferior ao ponto isoelétrico da proteína, espera-se que as forças eletrostáticas favoreçam a adsorção da lisozima pelas células. Essa interação eletrostática favorável irá diminuir quando a força iônica do meio aumentar, explicando assim por que a elevação da força iônica é inibitória. Além disso, se a molécula da lisozima é modificada quimicamente, de modo que as cargas positivas dos resíduos lisina e arginina são parcial ou completamente encobertas ou removidas, a atividade enzimática é conservada, mas somente a baixas forças iônicas, e a inibição torna-se mais sensível a variações de pH. Isso significa que quanto menos cargas positivas permanecerem na lisozima, maior será o decréscimo na atração entre a proteína e a parede celular do substrato, tornando mais sensível a competição entre os íons da proteína e do sal (Davies e Neuberger, 1969).

Ensaio de atividade de lisozima realizados por Davies *et al.* (1969) mostraram uma perda de atividade da proteína de até 85% em solução de cloreto de sódio de força iônica de 0,16 mol/L. Goteni *et al.* (1974) associou o congelamento da solução de lisozima em cloreto de sódio e a liofilização à perda de atividade da proteína, sendo que esta redução de atividade enzimática pode chegar a 10% dependendo da concentração de sal e do pH da solução protéica.

No entanto, neste trabalho, a fase sobrenadante e o precipitado foram diluídos a concentrações inferiores a 0,05 g de sal/g de fase para evitar a influência do sal na atividade biológica da lisozima (Apêndice 5). De modo que,

não há uma evidência prévia de perda de atividade associada à concentração de sal utilizada na precipitação. Apesar disso, considerando-se os efeitos de desnaturação da proteína no procedimento de precipitação, pode-se considerar que ocorra a adsorção dos ânions dos sais (contra-íons) pela molécula de proteína nos sistemas lisozima-sal-água a alta concentração de sal e supor que esta ligação seja irreversível, levando à desnaturação da lisozima pela presença do sal.

Nos sistemas lisozima-carbamato de amônio-água verificou-se um comportamento distinto daquele verificado com os sistemas lisozima-sais convencionais-água. Os resultados de atividade enzimática da proteína após precipitação com carbamato de amônio mostraram a manutenção da atividade da lisozima, tanto para a região de baixa como de alta concentração de sal e independente da temperatura utilizada. A conservação da atividade da lisozima pode ser devido à ausência do sal após o processo de liofilização, já que o sal volátil pode ser removido da solução de lisozima através de redução da pressão, evitando assim uma possível inibição da atividade protéica pelo sal. A manutenção da atividade protéica é consistente com os resultados obtidos para a tripsina precipitada com o uso do sal volátil, conforme relatado por Watanabe *et al.* (2006).

4.6. COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES SAIS VISANDO A PRECIPITAÇÃO COMO UMA OPERAÇÃO DE SEPARAÇÃO OU CONCENTRAÇÃO

Para a escolha do sistema lisozima-sal-água mais adequado a ser utilizado para a precipitação de lisozima com o uso de sais, a composição do precipitado verdadeiro deve ser analisada considerando-se as condições de pH e temperatura do sistema, assim como a atividade da proteína após o processo de precipitação. Ressalta-se que, como o sistema utilizado neste trabalho contém uma lisozima de elevado nível de pureza (95%), este processo de precipitação poderia ser utilizado ao final da RPB para a concentração do produto e possível cristalização da lisozima.

No caso dos sais convencionais sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio, os sistemas lisozima-sulfato de amônio-água e lisozima-sulfato

de sódio-água a pH igual a 4,0 na região de baixa concentração de sal e a temperatura de 25,0°C seriam os mais adequados a serem aplicados em um processo de precipitação. A escolha deste sistema deve-se aos seguintes fatores: (1) a composição do precipitado verdadeiro lisozima-água, isenta de sal (aproximadamente 0,86 g de proteína/g de fase), encontrada nestes sistemas, favoreceria o processo de purificação da proteína, já que apenas uma etapa de secagem seria necessária para obtenção da lisozima no nível de pureza desejado; (2) a pH igual a 4,0, nenhum ácido ou base foi utilizado para ajuste do pH e, assim, a recuperação do sal da fase sobrenadante pode ser mais facilmente realizada com a ausência dessas substâncias; (3) à temperatura de 25°C, reduz-se o custo do processo, uma vez que é mais onerosa a manutenção de baixas temperaturas; (4) a região de baixa concentração de sal, além de proporcionar um precipitado verdadeiro contendo apenas proteína e água, o balanço de atividade da lisozima nesta região mostrou uma perda de atividade menor quando comparada à região de alta concentração de sal.

Comparando-se os precipitados verdadeiros obtidos da precipitação de lisozima com o uso de sais convencionais e sal volátil, observou-se que o precipitado verdadeiro formado pelo sistema lisozima-sal volátil apresenta algumas vantagens. Isso porque este sistema não requer ajuste de pH ou de temperatura para a obtenção de um precipitado contendo apenas proteína, além de que, com redução da pressão é possível a completa remoção do sal volátil, sem necessidade de tratamento posterior. Apesar do elevado valor de pH do carbamato de amônio (aproximadamente 9,5), que poderia ocasionar a desnaturação da lisozima (cujo pH de máxima atividade é igual a 6,2) verificou-se que o sal volátil não é um agente desnaturante de lisozima. Os balanços de atividade (Tabela 4.6) mostraram que a perda de atividade da lisozima após a precipitação com o uso do carbamato de amônio é praticamente desprezível, quando comparada à perda de atividade da proteína em sais convencionais, que chegou a 75% em alguns casos.

No entanto, para uma resposta conclusiva sobre o sistema (lisozima-sais-água) mais adequado a ser utilizado, um balanço envolvendo a concentração mássica da proteína deve ser considerado, pois baixas concentrações de sal

originaram um precipitado verdadeiro lisozima-água, livre de sal, mas levaram a uma concentração maior de lisozima na fase sobrenadante.

4.7. DIAGRAMAS DE FASE DO SISTEMA ALBUMINA DE SORO BOVINO - SULFATO DE AMÔNIO - ÁGUA

Concentrações mássicas da fase sobrenadante e do precipitado foram determinadas após a precipitação de BSA em sulfato de amônio a 25,0°C e valores de pH de 2,0, 7,0 e 9,0 para a obtenção dos diagramas de fase (Figuras 4.34 - 4.36). Extensões das linhas de amarração que conectam a alimentação e a fase sobrenadante e o precipitado também determinaram a existência de precipitados verdadeiros. Verificou-se que estas extensões das linhas de amarração encontravam-se em um único ponto, diferentemente do que ocorre com o sistema lisozima-sulfato de amônio-água, que possui dois precipitados verdadeiros. A presença de um único precipitado verdadeiro pode ser devida à elevada solubilidade da BSA, o que permitiu sua precipitação apenas em altas concentrações de sal. Análises morfológicas realizadas visualmente por Elisée-Collen e Lencki (1997) apresentadas na Figura 4.37 confirmam que a região em que ocorre a separação de fases da proteína com a adição de sal é de fato bastante estreita (região 3).

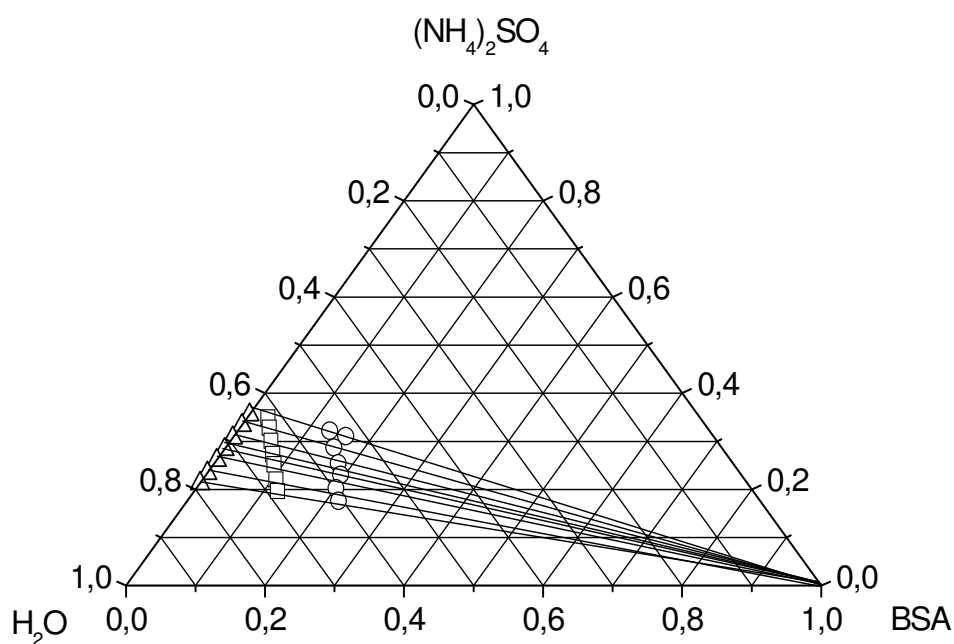


Figura 4.34: Diagrama de fases do sistema BSA-sulfato de amônio-água a 25,0 °C e pH igual a 2,0. Concentração mássica inicial de solução de BSA: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

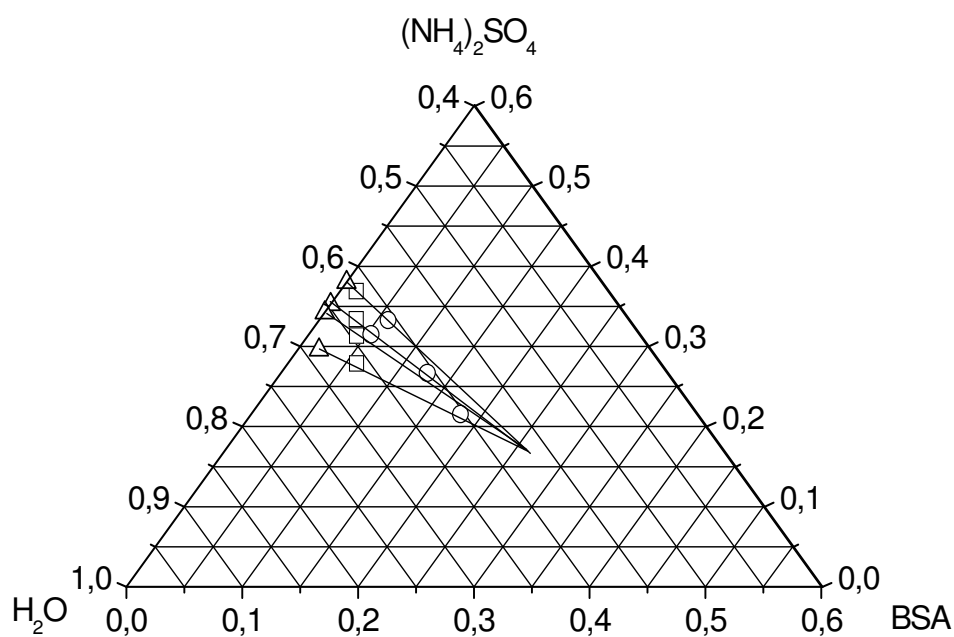


Figura 4.35: Diagrama de fases do sistema BSA-sulfato de amônio-água a 25,0 °C e pH igual a 7,0. Concentração mássica inicial de solução de BSA: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

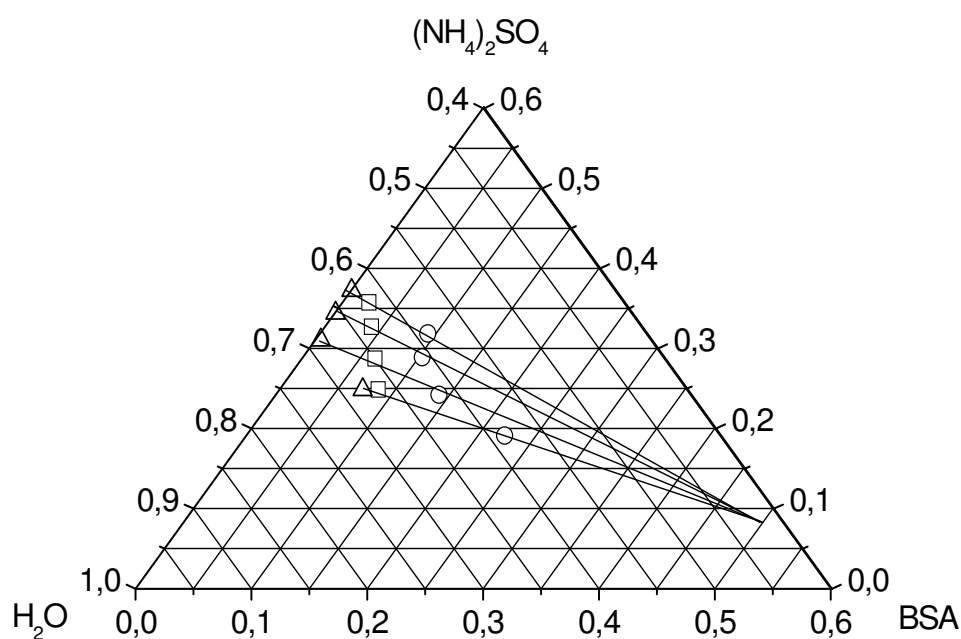


Figura 4.36: Diagrama de fases do sistema BSA-sulfato de amônio-água a 25,0°C e pH igual a 9,0. Concentração mássica inicial de solução de BSA: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica inicial de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução; composição da alimentação ($\square$), composição da fase sobrenadante ($\triangle$), composição do precipitado ($\circ$); linhas de amarração (—).

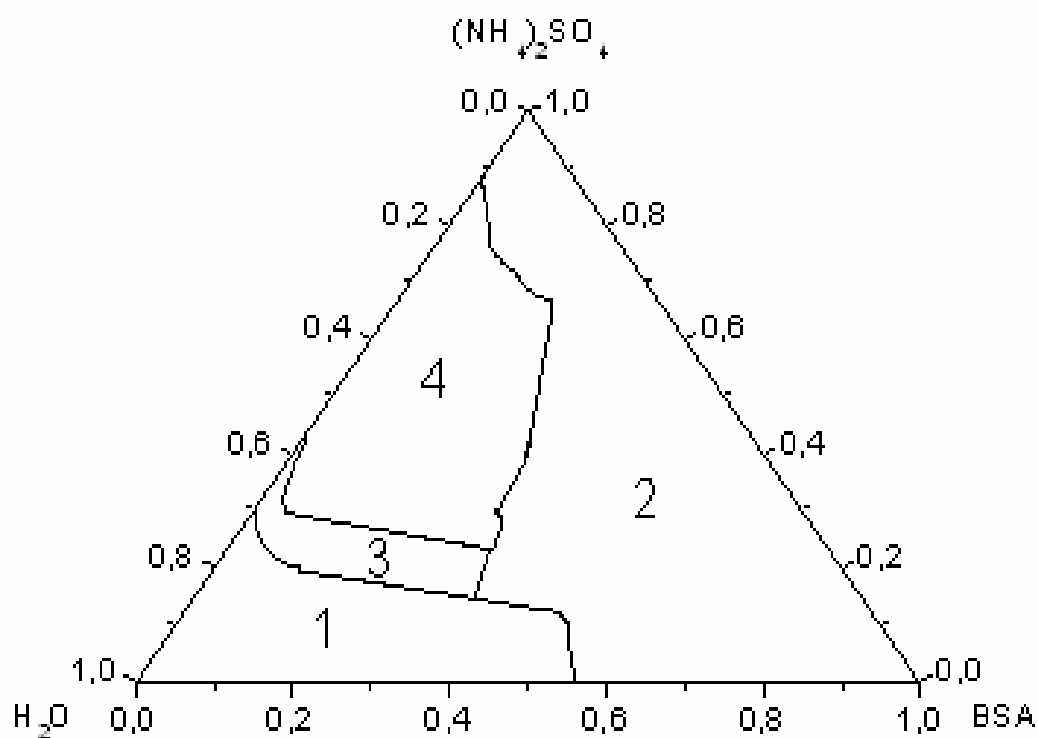


Figura 4.37: Diagrama de fases do sistema BSA-sulfato de amônio-água a 20,0°C. Descrição morfológica observada no precipitado: (1) líquido transparente, límpido para baixas concentrações de BSA e de coloração amarela para concentrações de BSA maiores que 15%; (2) sólido não contendo líquido, com pequena quantidade de cristais de sal; (3) líquido contendo precipitado de proteína BSA; (4) líquido contendo precipitado de proteína e cristais de sal (Elysée-Collen e Lencki, 1997)

Os diagramas de fase indicaram composições diferentes dos precipitados verdadeiros nos valores de pH iguais a 2,0, 7,0 e 10,0. A precipitação de BSA em sulfato de amônio e em pH igual a 2,0 levou à formação de um precipitado verdadeiro composto apenas de proteína, livre de sal e água. Devido à alta solubilidade de BSA a pH iguais a 7,0 e 9,0, poucos dados de precipitação da proteína foram obtidos. As extensões das linhas de amarração indicaram a presença de um precipitado verdadeiro composto de BSA, água e sal de seguinte composição: a pH igual a 7,0, obteve-se aproximadamente 0,27 g BSA/g fase, 0,17 g sal/g fase e 0,56 g água/g fase; a pH igual a 9,0 teve-se as composições mássicas de 0,50 g de BSA/g fase, 0,08 g de sal/ g fase e 0,42 g de água/g fase.

As composições dos precipitados verdadeiros mostraram que o sistema BSA-sulfato de amônio-água a pH igual a 2,0 forneceu um precipitado contendo apenas proteína, o que indicaria este sistema como o melhor para a precipitação de BSA, uma vez que um precipitado verdadeiro composto somente de proteína não exigiria, em princípio, etapas adicionais de purificação. No entanto, a elevada quantidade de ácido fosfórico adicionado à solução protéica para que se alcançasse o valor de pH igual a 2,0, já que a solução-mãe de BSA em água (0,15 g de proteína/g de solução) possui pH aproximadamente igual a 7,0, poderia levar à desnaturação da proteína ou a necessidade de tratamento da solução sobrenadante para recuperação do sal em processos de larga escala. Diante disso, os sistemas BSA-sulfato de amônio-água a pH iguais a 7,0 e 9,0 mostraram-se mais adequados a serem utilizados, uma vez que em pH igual a 7,0 nenhum ácido ou base foram adicionados e a pH igual a 9,0 obteve-se uma alta concentração de proteína (cerca de 50%) no precipitado verdadeiro.

As concentrações mássicas de BSA na fase sobrenadante, mostradas nos diagramas anteriores, são apresentadas na Figura 4.38 em função da concentração mássica do sal, representando as concentrações de equilíbrio da proteína a 25,0°C e a diferentes valores de pH (2,0, 7,0 e 9,0).

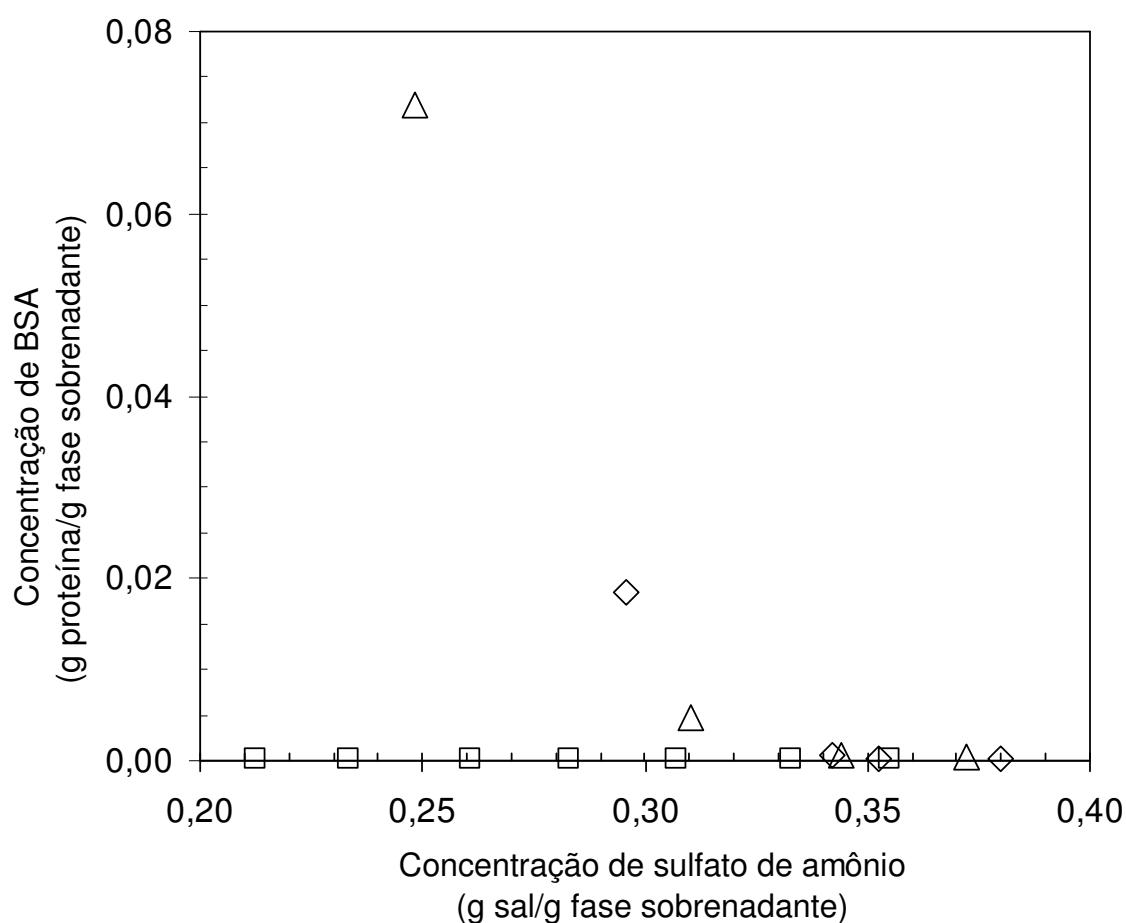


Figura 4.38: Concentrações de equilíbrio de solução de BSA em solução de sulfato de amônio a 25,0°C e diferentes valores de pH: 2,0 (□), 7,0 (◇), 9,0 (△). Concentração mássica inicial de proteína: 0,15 g proteína/g solução; concentração mássica de sulfato de amônio: 0,40 g sal/g solução.

O efeito do pH pode ser observado e verificou-se que a solubilidade da BSA diminuiu com a redução dos valores de pH. Essa redução da solubilidade da BSA pode estar relacionada à conformação da proteína com as mudanças de pH. Uma classificação das formas de BSA dependentes do valor de pH foi relatada na literatura por Carter e Ho (1994): forma N (“normal”) para normal, predominante a pH neutro; B (“basic”) para a forma básica ocorrendo acima de pH 8,0; F (“fast”) para a forma migratória que ocorre abruptamente em valores de pH menores que 4,0; E (“expanded”) para a forma expandida a pH menor que 3,5 e A (“aged”) que ocorre com o tempo para valores de pH maiores que 8,0.

Para o sistema a pH igual a 2,0 baixas concentrações de equilíbrio da BSA em sulfato de amônio foram verificadas, pois segundo Carter e Ho (1994), a pH igual a 2,0 a BSA encontra-se sob a forma “E”, expandida e desnovelada pela dissociação da parte C-terminal da proteína. Essa forma “E” é caracterizada pelo aumento da viscosidade da solução protéica e pela redução da solubilidade e significativa perda do conteúdo helicoidal. De acordo com esses autores, no pH neutro, a proteína apresenta-se sob a sua forma “N” normal e mostra-se altamente solúvel: concentrações maiores que 30% (m/v) podem ser facilmente preparadas, em concordância com os resultados aqui obtidos. Comparando-se as curvas de concentrações de equilíbrio da solução da BSA a pH 7,0 e 9,0, observou-se maior solubilidade da proteína a pH igual a 9,0. Carter e Ho (1994) justificam isso à maior protonação da forma “B” quando comparada à forma “N”, aproximadamente 150 átomos de hidrogênio, anteriormente encobertos ficam expostos à superfície da molécula de proteína (Peters Jr., 1985).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. CONCLUSÕES

A principal conclusão deste trabalho é que a determinação dos diagramas de fase da precipitação das proteínas lisozima e BSA induzidas pela presença de sais possibilita a inferência da composição de precipitados verdadeiros, isto é, da composição da fase sólida formada, por meio da intersecção das extensões das linhas de amarração. O uso extensivo desta técnica na análise de diagramas de fases variando-se pH e temperatura dos sistemas, inédito na literatura, mostra ser uma ferramenta eficiente no estudo do equilíbrio de fases de sistemas contendo sais, proteína e água. Além disso, a determinação dos precipitados verdadeiros pode possibilitar a escolha do sistema mais adequado para a obtenção da fase sólida desejada, uma modelagem termodinâmica mais adequada, uma vez que as concentrações dos componentes de cada fase são conhecidas e a determinação da eficiência da separação sólido-líquido através da composição do sólido formado.

O método de determinação da composição do precipitado verdadeiro pode ser utilizado não apenas para a determinação de precipitados protéicos, mas também para todas as macromoléculas envolvidas em processos de separação de fases. No entanto, para o uso extensivo desta técnica de análise, a validação do método deve ser realizada através de estudos que comprovem que o precipitado obtido, após a separação das fases, constitui uma mistura (fase sobrenadante e precipitado verdadeiro) e não uma única fase em equilíbrio com a fase líquida, como se propõe neste trabalho. Destaca-se ainda que a determinação da

composição do precipitado verdadeiro pelo prolongamento das linhas de amarração deve ter seu uso restrito a sistemas em equilíbrio, com especial cuidado à sua aplicação em sistemas metaestáveis, como o comportamento observado para o sistema lisozima-carbamato de amônio-água a 5,0°C (item 4.4) apresentado anteriormente.

As composições da fase sólida, para os sistemas contendo lisozima, variaram em função do sal utilizado e da temperatura, enquanto que valores diferentes de pH não influenciaram a composição do precipitado verdadeiro encontrado. A precipitação de lisozima com uso de sais sulfato de amônio e sulfato de sódio originou dois precipitados verdadeiros de acordo com a quantidade de sal utilizada. Em regiões de baixa concentração de sal obteve-se um sólido proteína-água livre de sal, enquanto que em regiões de alta concentração de sal tem-se a presença de um complexo formado de lisozima, sal e água (ou um precipitado lisozima-água). Além disso, diagramas de lisozima precipitada com sulfato de amônio a 5,0 e 15,0°C apresentaram uma região de “salting-in” a baixas concentrações de sal. As composições dos precipitados verdadeiros obtidos nestes sistemas foram distintos de acordo com as regiões de “salting-in” e “salting-out”. Os sistemas lisozima-cloreto de sódio-água a 5,0, 15,0 e 25,0°C apresentaram um único precipitado verdadeiro de composição idêntica, independente da temperatura, contendo apenas proteína e água. O uso do sal volátil carbamato de amônio na precipitação de lisozima levou à formação de um precipitado verdadeiro contendo apenas proteína. Destaca-se também que os precipitados verdadeiros contendo lisozima-água, mesmo ausentes de sal, possuem composições diferentes. Por exemplo, o precipitado verdadeiro do sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e a 25,0°C possui composição de 0,86 g de proteína/g de fase, enquanto o precipitado verdadeiro do sistema lisozima-cloreto de sódio-água pH 7,0 e a 25,0°C contém 0,6 g de proteína/g de fase. Isso indica, que mesmo a baixas concentrações, o sal tem influência na interação proteína-proteína, sendo capaz de modificar o equilíbrio sólido-líquido que se estabelece.

Comparando-se os sistemas lisozima-sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio pode-se verificar que considerando

apenas o equilíbrio de fases e a manutenção da atividade, o sal carbamato de amônio é o mais indicado a ser utilizado em processos de separação, uma vez que não requer mudança de temperatura ou pH para a obtenção de um precipitado, que mantém a atividade enzimática da lisozima e é composto apenas de proteína, livre de água e sal.

Os diagramas de fase da precipitação de BSA em sulfato de amônio indicaram a presença de um único precipitado verdadeiro, provavelmente devido à elevada solubilidade da proteína e estreita região do diagrama ternário em que é possível a precipitação da BSA. A composição do precipitado verdadeiro nos sistemas contendo BSA variou de acordo com o pH utilizado.

5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros para complementação do que foi realizado apresenta-se:

- a) Determinação do equilíbrio de fases do sistema lisozima-cloreto de sódio-água a uma temperatura superior a 25,0°C para verificar a formação de um precipitado verdadeiro de composição eventualmente distinta àquela verificada para as temperaturas de 5,0, 15,0 e 25,0°C, que corresponda à presença de cristais ortorrômnicos de lisozima. Como a cristalização de lisozima em cloreto de sódio é um processo bem estabelecido na literatura e a formação de cristais ortorrômnicos de lisozima a temperaturas acima de 25°C é largamente descrita, seria possível através deste ensaio associar o precipitado verdadeiro ao tipo de formação cristalina da lisozima obtida;
- b) Caracterização da estrutura cristalina dos precipitados dos sistemas lisozima-sal-água através de ensaios de difração de raios-X ou ressonância magnética, tanto para determinação da forma cristalina do precipitado, como para comprovação de eventuais diferenças entre cristais tetraédricos e ortorrômnicos (nas regiões de “salting-in” e “salting-out”, respectivamente);

- c) Desenvolvimento de modelagem termodinâmica, considerando-se por exemplo, a partição desigual do sal entre a fase sobrenadante e o precipitado;
- d) Extensão do uso da técnica de determinação do precipitado verdadeiro, através de extrapolações das linhas de amarração, para outras proteínas.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alderton, G., Fevold, H. L., Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme, *Journal of Biological Chemistry*, 164, 1-5, 1946.

Arakawa, T., Timasheff, G. N., Theory of protein solubility, *Methods in Enzymology*, 114, 49-77, 1985.

Asherie, N., Protein crystallization and phase diagrams, *Methods*, 34, 266-272, 2004.

Ataka, M., Asai, M., Systematic studies on the crystallization of lysozyme: determination and use of phase diagrams, *Journal of Crystal Growth*, 90, 86-93, 1988.

Ataka, M., Tanaka, S., The growth of large single crystals of lysozyme, *Biopolymers*, 25, 337-350, 1986.

BASF A. G., Ammonium carbonate – *Technical data sheet*, Ludwigshafen, 1998.

BASF A. G., Ammonium bicarbonate – *Technical data sheet*, Ludwigshafen, 1999.

BASF A. G., Ammonium carbamate – *Technical data sheet*, Ludwigshafen, 2000.

Bell, D. J., Hoare, M., Dunnill, P., The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 26, 1-67, 1983.

Bénas, P., Legrand L., Riès-Kautt, M., Strong and specific effects of cations on lysozyme chloride solubility, *Acta Crystallographica Section D*, 58, 1582-1587, 2002.

Bernard, N., Jolival, C., Schwarztzentruber, J., Protein precipitation by caprylic acid: equilibrium composition data, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 405-411, 1996.

Berthou, J., Jollès, P., A phase transition in a protein crystal: the example of hen lysozyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, 336, 222-227, 1974.

Bigelow, C. C., On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure, *Journal of Theoretical Biology*, 16, 187-211, 1967.

Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, M., Dunnill, P., Protein purification: the right step at the right time, *Biotechnology*, 4, 954-958, 1986.

Boström, M., Tavares, F. W., Finet, S., Skouri-Panet, F., Tardieu, A., Ninham, B. W., Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI, *Biophysical Chemistry*, 117, 217-224, 2005.

Boström, M., Williams, D. R. M., Ninham, B. W., Specific ions effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series, *Biophysical Journal*, 85, 686-694, 2003.

Boychyn, M., Doyle, W., Bulmer, M., More, J., Hoare, M., Laboratory scaledown of protein purification processes involving fractional precipitation and centrifugal recovery, *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 1-10, 2000.

Broide, M. L., Tominc, T. M., Saxowsky, M. D., Using phase transitions to investigate the effect of salts on protein interactions, *Physical Review E*, 53, 6325-6335, 1996.

Butler, A. M., Blatt, H., Southgate, H., The solubility of the plasma proteins. II. Dependence on pH, temperature and lipid content in concentrated solutions of potassium phosphate and application to their separate precipitation, *Journal of Biological Chemistry*, 109, 755-767, 1935.

Cacciopo, E., Pusey, M. L., The solubility of the tetragonal form of hen egg white lysozyme from pH 4.0 to 5.4, *Journal of Crystal Growth*, 114, 286-292, 1991.

- Cacciopo, E., Munson, S., Pusey, M. L., Protein solubilities determined by a rapid technique and modification of that technique to a micro-method, *Journal of Crystal Growth*, 110, 66-71, 1991.
- Carpinetti, M., Piazza, R., Metastability and supersaturation limit for lysozyme crystallization, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6, 1506-1511, 2004.
- Carter, D. C., Ho, J. X., Structure of serum albumin, *Advances in Protein Chemistry*, 45, 153-203, 1994.
- Chang, K. Y., Carr, C. W., Studies on the structure and function of lysozyme – I. The effect of pH and cation concentration on lysozyme activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 229, 496-503, 1971.
- Chanutin, A., Curnish, R. R., The precipitation of plasma proteins by short-chain fatty acids, *Archives of Biochemistry Biophysics*, 89, 218-220, 1960.
- Cheng, Y-C., Lobo, R. F., Sandler, S. I., Lenhoff, A. M., Kinetics and equilibria of lysozyme precipitation and crystallization in concentrated ammonium sulfate solutions, *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 177-188, 2006.
- Chodankar, S., Aswal, V. K., Kohlbrecher, J., Hassan, P. A., Wagh, A. G., Time evaluation of crystallization phase of lysozyme protein in aqueous salt solution as studied by scattering techniques, *Physica B*, 398, 164-171, 2007.
- Christopher, G. K., Philipps, A. G., Gray, R. J., Temperature-dependent solubility of selected proteins, *Journal of Cristal Growth*, 191, 820-826, 1998.
- Clonis, Y. D., Affinity chromatography matures as bioinfomatic and combinatory tools develop, *Journal of Chromatography A*, 1101, 1-24, 2006.
- Cohn, E. J., The Physical Chemistry of the Proteins, *Physiological Review*, 5, 349-428, 1925.
- Coen, C. J., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M., Salting-out of aqueous proteins – phase equilibria and intermolecular potentials, *AIChE Journal*, 41, 996-1004, 1995.
- Crompton, T.R., *Determination of Anions*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1996.
- Curtis, R. A., Lue, L., A molecular approach to bioseparations: protein-protein and protein-salt interactions, *Chemical Engineering Science*, 61, 907-923, 2006.

- Curtis, R. A., Ulrich, J., Montaser, A., Prausnitz, J. M., Blanch, H. W., Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solution, *Biotechnology and Bioengineering*, 79, 367-380, 2002.
- Davies, R. C., Neuberger, A., Wilson, B. M., The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength, *Biochimica et Biophysica Acta*, 178, 294-503, 1969.
- Davies, R. C., Neuberger, A., Modification of lysine and arginine residues of lysozyme and the effect on enzymatic activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 178, 306-317, 1969.
- Demoruelle, K., Guo, B., Kao, S., McDonald, H. M., Nikic, D. B., Holman, S. C., Wilson, W. W., Correlation between the osmotic second virial coefficient and solubility for equine serum albumin and ovalbumin, *Acta Crystallographica Section D*, 58, 1544-1548, 2002.
- Dervichian, D. G., Das Phasengleichgewicht in kolloiden Lösungen, *Kolloid-Zeitschrift*, 115, 76-82, 1949.
- Dervichian, D. G., Mossé, J., Equilibrés de phases dans les systèmes protéine-sel-eau. Conséquences relatives a la solubilité des protéines, *Bulletin de la Societé de Chimie Biologique*, 35, 1287-1308, 1953.
- Deutscher, M. P. (ed.), *Methods in Enzymology volume 182*, San Diego, Academic Press, 285-306, 1990.
- Dixon, M., Webb, E. C., Enzyme fractionation by salting-out: a theoretical note, *Advances in Protein Chemistry*, 16, 197-219, 1961.
- Ducruix, A., Guilloteau, J. P., Riès-Kautt, M., Tardieu, A., Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis, *Journal of Crystal Growth*, 168, 28-39, 1996.
- Edwards, T. J.; Maurer, G.; Newman, J., Prausnitz, J.M., Vapor-Liquid Equilibria in Multicomponent Aqueous Solutions of Volatile Weak Electrolytes, *AIChE Journal*, 24, 966-976, 1978.

Edwards, T. J., Newman, J., Prausnitz, J. M., Thermodynamics of Aqueous Solutions Containing Volatile Weak Electrolytes, *AIChE Journal*, 21, 248-259, 1975.

Elysée-Collen, B., Lencki, R. W., Effect of ethanol, ammonium sulfate, fatty acids, and temperature on the solution behaviour of bovine serum albumin, *Biotechnology Progress*, 13, 849-856, 1997.

Englard, S., Seifter, S., Precipitation techniques, *Methods in Enzymology*, 182, 285-300, 1990.

Ewing, F., Forsythe, E., Pusey, M. L., Orthorhombic lysozyme solubility, *Acta Crystallographica Section D*, 50, 424-428, 1994.

Forsythe, E., Snell, E. H., Malone, C. C., Pusey, M. L., Crystallization of chicken egg white lysozyme from assorted sulfate salts, *Journal of Crystal Growth*, 196, 332-343, 1999.

Forsythe, E., Snell, E. H., Pusey, M. L., Crystallization of chicken egg-lysozyme from ammonium sulfate, *Acta Crystallographica Section D*, 53, 795-797, 1997.

Forsythe, E., Ewing, F., Pusey, M. L., Studies on tetragonal lysozyme crystal growth rates, *Acta Crystallographica Section D*, 50, 614-619, 1994.

Forsythe, E., Pusey, M. L., The effects of temperature and NaCl concentration on tetragonal lysozyme face growth rates, *Journal of Crystal Growth*, 139, 89-94, 1994.

Foster, P. R., Dunnill, P., Lilly, M. D., The kinetics of protein salting-out: precipitation of yeast enzymes by ammonium sulfate, *Biotechnology and Bioengineering*, 18, 545-580, 1976.

Freitas, S. S., Santos, J. A. L., Prazeres, D. M. F., Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA, *Biotechnology Progress*, 22, 1179-1186, 2006.

George, A., Wilson W. W., Predicting protein crystallization from a dilute solution property, *Acta Crystallographica Section D*, 50, 361-365, 1994.

Göppert, U., Maurer, G., Vapor-liquid Equilibria in Aqueous Solution of Ammonia and Carbon Dioxide at Temperatures between 333 and 393 K and Pressures up to 7 MPa, *Fluid Phase Equilibria*, 41, 153-185, 1988.

Goteni, S., Raymond, J., Ducastaing, A., Robin, J.-M., Creac'h, P., Effets de la lyophilisation sur la solubilité et l'activité enzymatique du lysozyme du blanc d'oeuf de Poulet, *Comptes Rendus des Seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 168, 280-285, 1974.

Green, A. A., Studies in the physical chemistry of the proteins: X. The solubility of hemoglobin in solutions of chlorides and sulfates of varying concentration, *Journal of Biological Chemistry*, 95, 47-66, 1932.

Guilloteau, J.-P., Riès-Kautt, M. M., Ducruix, A. F., Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts, *Journal of Cristal Growth*, 223-230, 1992.

Haas, C., Drenth, J., The protein-water phase diagram and the growth of protein crystals from aqueous solution, *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 4226-4232, 1998.

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 Chromatography B*, 743, 357-368, 2000.

Howard, S. B., Twigg, P. J., Baird, J. K., Meehan, E. J., The solubility of hen egg-white lysozyme, *Journal of Cristal Growth*, 90, 94-104, 1988.

Jia, Y., Liu, X.-Y., Prediction of protein crystallization based on interfacial and diffusion kinetics, *Applied Physics Letters*, 87, 1-3, 2005.

Jollès, P., Jollès, J., What's new in lysozyme research?, *Molecular and Celular Biochemistry*, 63, 165-189, 1984.

Jollès, P., Berthou, J., High temperature crystallization of lysozyme: an example of phase transition, *FEBS Letters*, 23, 21-23, 1972.

- Jollès, P., Relationship between chemical structure and biological activity of hen egg-white lysozyme and lysozymes of different species, *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 167, 350-363, 1967.
- Judge, R. A., Johns, M. R., White, E. T., Solubility of ovalbumin in ammonium sulfate solutions, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 41, 422-424, 1996.
- Karam, G. A., Mirzaee, M., Mahmoodi, M., Rasaee, M. J., Pouramir, M., Extraction and purification of anti-proteinase 3 (PR3) antibodies from egg yolk, *Iranian Biomedical Journal*, 9, 41-45, 2005.
- Kurz, F., Rumpf, B., Maurer, G., Vapor-Liquid-Solid Equilibria in the System NH₃-CO₂-H₂O from around 310 to 410K: New Experimental Data and Modeling, *Fluid Phase Equilibria*, 104, 261-275, 1995.
- Ladisch, M. R., *Bioseparations Engineering*, New York, John Wiley & Sons, 116-151, 2001.
- Legrand, L., Riès-Kautt, M., Robert, M. C., Two polymorphs of lysozyme nitrate: temperature dependence of their solubility, *Acta Crystallographica Section D*, 58, 1564-1567, 2002.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., *Princípios da bioquímica*, 2ª ed., São Paulo, Sarvier, 1995.
- Lima, L. H. F., *Precipitação de lisozima e insulinas bovina e suína por "salting-out" com o uso de eletrólitos voláteis*, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado)
- Lu, J., Carpenter, K., Li, R.-J., Wang, X.-J., Ching, C.-B., Cloud point temperature and liquid-liquid phase separation of supersaturated lysozyme solution, *Biophysical Chemistry*, 109, 105-112, 2004.
- Lui, D. Y. M., Litster, J. D., White, E. T., Precipitation of soy proteins: particle formation and protein separation, *AIChE Journal*, 53, 514-522, 2007.
- Manno, M., Xiau, C., Bulone, D., Martorana, V., San Biaggio, P. L., Thermodynamic instability in supersaturated lysozyme solution: effect of salt and role of concentration fluctuations, *Physical Review E*, 68, 1-11, 2003.

- McMillan, W. G., Mayer, J. E., The statistical thermodynamics of multicomponent systems, *Journal of Chemical Physics*, 13, 276, 1945.
- Melander, W. R., Horváth, C., Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183, 200-215, 1977.
- Michnik, A., Michalik, K., Drzazga, Z., Stability of bovine serum albumin at different pH, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 80, 399-406, 2005.
- Miranda, E. A., comunicação pessoal.
- Moreira, L. A., Boström, M., Ninham, B. W., Biscaia, E. C., Tavares, F. W., Hofmeister effects: why protein charge, pH titration and protein precipitation depend on the choice of background salt solution, *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects*, 282-283, 457-463, 2006.
- Moretti J. J., Sandler, S. I., Lenhoff, A. M., Phase equilibria in the lysozyme-ammonium sulfate-water system, *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 498-506, 2000.
- Muschol, M., Rosenberger, F., Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization, *Journal of Chemical Physics*, 107, 1953-1962, 1997.
- Muschol, M., Rosenberger, F., Lack of evidence for prenucleation aggregate formation in lysozyme crystal growth solutions, *Journal of Crystal Growth*, 167, 738-747, 1996.
- Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaee, M. J., Rahbarizadeh, F., Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 19, 229-232, 2005.
- Nelson, C. D., Glatz, C. E., Primary particle formation in protein precipitation, *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 1434-1444, 1985.
- Newcombe, A. R., Cresswell, C., Davies, S., Watson, K., Harris, G., O'Dovan, K., Francis, R., Optimised affinity purification of polyclonal antibodies from hyper

- immunized ovine serum using a synthetic protein A adsorbent, MAbsorbent[®] A2P, *Journal of Chromatography B*, 814, 209-215, 2005.
- Osserman, E. F., Crystallization of human lysozyme, *Science*, 155, 1536-1537, 1967.
- Peckham, G. D., Bugos, R. C., Su, W. W., Purification of GFP fusion proteins from transgenic plant cell cultures, *Protein Expression & Purification*, 49, 183-189, 2006.
- Pellicane, G., Costa, D., Caccamo, C., Cloud and solubility temperatures versus ionic strength in model lysozyme solutions, *Journal of Physics: Condensed Matter*, S3485-S3489, 2003.
- Peters Jr., T., Serum Albumin, *Advances in Protein Chemistry*, 37, 161-245, 1985.
- Petsev, D. N., Wu, X., Galkin, O., Vekilov, P. G., Thermodynamic functions of concentrated protein solutions from phase equilibria, *Journal of Physical Chemistry*, 107, 3921-3926, 2003.
- Pozńanski, J., Wszelaka-Rylik, M., Zielenkiewics, W., HEW lysozyme salting by high-concentration NaCl solutions followed by titration calorimetry, *Biophysical Chemistry*, 113, 137-144, 2005.
- Prausnitz, J. M., Molecular thermodynamics for some applications in biotechnology, *Journal of Chemical Thermodynamics*, 35, 21-39, 2003.
- Prausnitz, J. M., Lichtenthaler, R. N., Azevedo, E. G., *Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria*, 3rd ed., New Jersey, Prentice Hall, 1999.
- Przybycien, T. M., Bailey, J. E., Aggregation kinetics in salt-induced protein precipitation, *AIChE Journal*, 35, 1779-1790, 1989a.
- Przybycien, T. M., Bailey, J. E., Solubility activity relationship in the inorganic salt-induced precipitation of α -chymotrypsin, *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 264-276, 1989b.
- Pusey, M., Gernert, K., A method for rapid liquid-solid phase solubility measurements using the protein lysozyme, *Journal of Crystal Growth*, 88, 419-424, 1988.

Qi, X. M., Yao, S. J., Guan, Y. X., Novel isoelectric precipitation of proteins in a pressurized carbon dioxide-water-ethanol system, *Biotechnology Progress*, 20, 1176-1182, 2004.

Retailleau, P., Ducruix, A., Riès-Kautt, M., Importance of the nature of anions in lysozyme crystallization correlated with protein net charge variation, *Acta Crystallographica Section D*, 58, 1576-1581, 2002.

Retailleau, P., Riès-Kautt, M., Ducruix, A., No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH, *Biophysical Journal*, 73, 2156-2163, 1997.

Riès-Kautt, M., Ducruix, A., Inferences drawn from physicochemical studies of crystallogenesis and precrystalline state, *Methods in Enzymology*, 276, 23-59, 1997.

Riès-Kautt, M., Ducruix, A., van Dorsselaer, A., Crystallization of previously desalted lysozyme in the presence of sulfate ions, *Acta Crystallographica Section D*, 50, 366-369, 1994.

Riès-Kautt, M., Ducruix, A. F., *In crystallization of nucleic acids and proteins*, edited by Ducruix, A., Giegé, R., New York, Oxford University Press, 195-218, 1992.

Riès-Kautt, M., Ducruix, A. F., Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme, *Journal of Biological Chemistry*, 264, 745-748, 1989.

Rosenbaum, D. F., Zukoski, C. F., Protein interactions and crystallization, *Journal of Crystal Growth*, 169, 752-758, 1996.

Rosenberger, F., Howard, S. B., Sowers, J. W., Nyce, T. A., Temperature dependence of protein solubility – determination and application to crystallization in X-ray capillaries, *Journal of Crystal Growth*, 129, 1-12, 1993.

Ross, P. D., Subramanian, S., Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, *Biochemistry*, 20, 3096-3102, 1981.

Rumpf, G., Weyrich, F., Maurer, G., Enthalpy Changes upon Partial Evaporation of Aqueous Solutions Containing Ammonia and Carbon Dioxide, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 37, 2983-2995, 1998.

Scopes, R. K., *Protein purification*, 2^a ed., New York, Springer-Verlag New York Inc., 41-71, 1988.

Shiau, K.-S., Chen, T.-L., Initial protein concentration effects on precipitation by salt, *Biotechnology and Bioengineering*, 53, 202-206, 1997.

Shih, Y. C., Prausnitz, J. M., Blanch, H. W., Some characteristics of protein precipitation by salts, *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1155-1164, 1992.

Shugar, D., The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, 8, 302-309, 1952.

Sigma aldrich, Bovine serum albumin – *Product information sheet*, Saint Louis, Missouri, 2000.

Sigma aldrich, Chicken egg white lysozyme – *Product information sheet*, Saint Louis, Missouri, 1996.

Spector, A. A., Fatty acid binding to plasma albumin, *Journal of Lipid Research*, 16, 165-179, 1975.

Stoscheck, C., Quantitation of proteins, *Methods in Enzymology*, 182, 50-68, 1990.

Su, C.-K., Chiang, B. H., Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system, *Process Biochemistry*, 41, 257-263, 2006.

Tanaka, S., Yamamoto, M., Ito, K., Hayakawa, R., Relation between the phase separation and the crystallization in protein solutions, *Physical Review E*, 56, R67-R69, 1997.

Tashima. A. K., Estudo da precipitação isoelétrica de insulina suína em soluções aquosas com o dióxido de carbono, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Tese (Doutorado).

Tessie, P. M., Vandrey, S. D., Berger, B. W., Pazhianur, R., Sandler, S. I., Lenhoff, A. M., Self-interaction chromatography: a novel screening method for rational protein crystallization, *Acta Crystallographica Section D*, 58, 1531-1535, 2002.

Tomasula, P. M., Craig, J. C., Boswell, R. T., A continuous process for casein production using high-pressure carbon dioxide, *Journal of Food Engineering*, 33, 405-419, 1997.

van Berlo, M., Ottens, M., Luyben, K. C. A. M., van der Wielen, L. A. M., Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems with recyclable volatile salts, *Journal of Chromatography B*, 743, 317-325, 2000.

von Solms, N. S., Anderson, C. O., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M., Molecular thermodynamics for fluid-phase equilibria in aqueous two-protein systems, *AIChE Journal*, 48, 1292-1300, 2002.

Watanabe, E. O., Pessôa Filho, P. A., Miranda, E. A., Mohamed R. S., Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin, *Biochemical Engineering Journal*, 30, 124-126, 2006.

Watanabe, Erika Ohta, *Precipitação de tripsina com uso de sais voláteis*, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Dissertação (Mestrado).

Wszelaka-Rylik, M., Zielenkiewicz, W., Enthalpy changes of salting processes of hen-egg white lysozyme in various electrolyte solutions, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 83, 607-610, 2006.

Yao, S. J., Guan, Y. X., He, W. Z., Qi, X. M., Zhu, Z. Q., Activities of several enzymes in ethanol + water at elevated pressure of carbon dioxide, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 49, 1333-1339, 2004.

Yu, H. L., Xu, J. H., Lu, W. Y., Lin, G. Q., Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of O-glucosides, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 354-361, 2007.

Zhang, H., Yao, H. Y., Chen, F., Wang, X., Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ, *Food Chemistry* 101, 1670-1676, 2007.

APÊNDICE 1

Neste Apêndice 1 apresenta-se o coeficiente virial osmótico, que reflete a interação entre moléculas de soluto, segundo a teoria de McMillan-Mayer (1945). A teoria de McMillan-Mayer formaliza a analogia entre o comportamento de um soluto interagindo em um solvente (por exemplo, uma proteína em solução aquosa) e moléculas em fase gasosa interagindo no vácuo. Como resultado, os modelos de energia livre e descrições de equações de estado do comportamento de fluidos reais podem ser diretamente utilizados para descrever o comportamento de proteínas em solução. O potencial de interação entre proteínas é relacionado ao potencial de força média. Similarmente, as propriedades termodinâmicas dos fluidos podem ser relacionadas às propriedades da solução: por exemplo, a pressão do fluido é relacionada à pressão osmótica.

Para duas moléculas de soluto em um solvente, os potenciais intermoleculares incluem não somente a energia de interação soluto-soluto, mas também as energias de interação soluto-solvente e solvente-solvente e a aproximação das moléculas de soluto. Uma molécula de soluto pode se aproximar de outra molécula de soluto através do deslocamento de moléculas de solvente. Portanto, a uma determinada distância, as moléculas de soluto podem se atrair e também se repelir, caso o trabalho para deslocar as moléculas de solvente exceder o que foi ganho para aproximar as moléculas de soluto. Além disso, moléculas de soluto freqüentemente perturbam a ordenação local das moléculas de solvente. Se a energia associada a esta perturbação depende da distância entre as duas moléculas dissolvidas, tem-se uma força de solvatação entre elas.

A natureza molecular do solvente pode produzir potenciais de força média que são diferentes daqueles correspondentes ao potencial de dois corpos no vácuo. O potencial de força média é uma medida de interação intermolecular de

moléculas de soluto em uma solução líquida. Teorias de solução, como a teoria de McMillan-Mayer (1945), proporcionam uma relação quantitativa entre o potencial de força média e propriedades termodinâmicas macroscópicas (coeficiente virial osmótico). Os coeficientes viriais osmóticos podem ser obtidos através de medidas de pressão osmótica.

Considere o sistema da Figura A1, em que uma membrana semi-permeável separa as fases α e β .

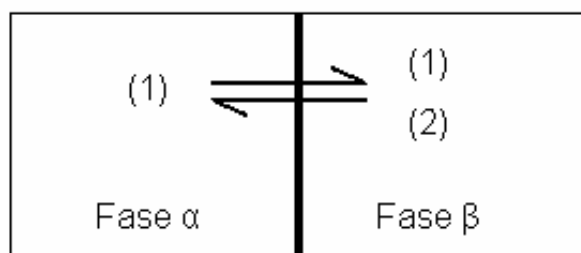


Figura A1.1: Esquema de um aparato para medida de pressão osmótica. A membrana é permeável ao solvente (1), mas não ao soluto (2).

A membrana semi-permeável é permeável ao solvente (1) mas impermeável ao soluto (2). As fases α e β estão a mesma temperatura e a pressão na fase α é representada por P enquanto na fase β é $P + \Pi$.

A equação do equilíbrio químico é dada por:

$$\mu_1^\alpha = \mu_1^\beta \quad (\text{A1.1})$$

em que μ é o potencial químico.

O potencial químico pode ser representado por:

$$\mu_1^\alpha = \mu_{\text{puro1}}^\alpha(T, P) \quad (\text{A1.2})$$

$$\mu_1^\beta = \mu_{\text{puro1}}^\beta(T, P + \Pi) + RT \ln a_1 \quad (\text{A1.3})$$

em que a é a atividade e está relacionada à composição por:

$$a = \gamma_1 \cdot x_1 \quad (\text{A1.4})$$

em que γ é o coeficiente de atividade e x é a fração molar.

Para um fluido puro considera-se que:

$$\left(\frac{\partial \mu}{\partial P} \right)_T = v \quad (\text{A1.5})$$

Assumindo que o volume molar não varia com a pressão (fluido incompressível), tem-se que:

$$\mu_{\text{puro1}}(P + \Pi) = \mu_{\text{puro1}}(P) + \Pi v_{\text{puro1}} \quad (\text{A1.6})$$

A Equação A1.1 pode ser reescrita como:

$$-\ln a_1 = \frac{\Pi v_{\text{puro1}}}{RT} \quad (\text{A1.7})$$

Se a solução na fase β está diluída, o valor de x_1 é próximo da unidade, de modo que o valor de λ_1 também é próximo da unidade e a Equação A1.7 pode ser expressa da seguinte maneira:

$$-\ln x_1 = \frac{\Pi v_{\text{puro1}}}{RT} \quad (\text{A1.8})$$

Como $x_2 \ll 1$, $\ln x_1 = \ln(1 - x_2) \approx -x_2$, a Equação A1.8 torna-se:

$$\Pi \cdot v_{\text{puro1}} = x_2 RT \quad (\text{A1.9})$$

Como $x_2 \ll 1$, $n_2 \ll n_1$ e $x_2 \approx n_2/n_1$, a Equação A1.9 pode ser expressa como:

$$\Pi \cdot V = n_2 RT \quad (\text{A1.10})$$

em que $V = n_1 v_{\text{puro}1}$ é o volume total disponível para n_2 moles de soluto.

A Equação A1.10 é a equação de van't Hoff para a pressão osmótica Π , análoga à equação do gás ideal, considerando-se a solução infinitamente diluída e incompressível.

Para concentrações finitas de soluto, a Equação pode ser expressa como uma expansão em série, em concentração mássica c_2 (g/L):

$$\frac{\Pi}{c_2} = RT \left(\frac{1}{M_2} + B_2 c_2 + B_3 c_2^2 + \dots \right) \quad (\text{A1.11})$$

em que M_2 é a massa molar do soluto; B_2 é o segundo coeficiente virial osmótico e B_3 é o terceiro coeficiente virial osmótico. Os coeficientes viriais refletem a interação entre as moléculas de soluto.

APÊNDICE 2

Neste apêndice 2 têm-se os ensaios preliminares, que consistiram na obtenção de coeficientes de absorção e de condutividade para a determinação das concentrações de proteína e sal das fases em equilíbrio, respectivamente. A seguir, a determinação da influência da concentração de lisozima nas medidas de condutividade dos sais também é apresentada neste apêndice. Finalmente, encontram-se todos os dados experimentais dos ensaios de determinação da concentração de proteína por absorbância e da concentração de sal por condutividade que foram utilizados para a obtenção de gráficos e tabelas apresentados anteriormente.

A2.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NA FASE SOBRENADANTE E NO PRECIPITADO

Para a determinação da concentração de proteína através da medida de absorbância a 205 e 280 nm obteve-se o coeficiente de absorção específica da proteína. Este coeficiente de absorção relaciona a concentração de proteína em solução com a fração de luz incidente que é absorvida pela solução, através da equação abaixo dada pela lei de Lambert-Beer:

$$A = a \times C \times d \quad (A2.1)$$

em que A é a fração de luz absorvida, conhecida como absorbância; C é a concentração de proteína em solução em mg/g; d é a distância que a luz percorre através da solução da amostra, neste caso 1 cm, e a é o coeficiente de absorção específico na faixa linear da curva A *versus* C em unidades de g/mg.cm.

Na precipitação de proteínas por “salting-out”, a fase sobrenadante é a fase rica em sal e pobre em proteína, enquanto que o precipitado é rico em proteína e pobre em sal e por isso, curvas de absorção distintas foram obtidas

para a determinação da proteína na fase sobrenadante e no precipitado. Para a determinação de proteína na fase sobrenadante, a influência dos sais sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio foram consideradas e curvas de absorção de lisozima em solução dos sais a 205 e 280 nm foram obtidas. Os coeficientes de absorção são apresentados na Tabela A2.1 e os fatores de correlação superiores a 0,99 indicam uma boa correlação. A partir dos coeficientes de absorção a 205 e 280 nm e da equação A2.1, pode-se determinar a concentração de lisozima na fase sobrenadante nas faixas de concentração de proteína de 0,001 - 0,1 mg de proteína/g de água e de 0,1 - 1,0 mg de proteína/g de água para os comprimentos de onda de 205 nm e 280 nm, respectivamente. Para os sais cloreto de sódio e carbamato de amônio, as curvas de absorção foram determinadas apenas para o comprimento de onda de 280 nm, devido à elevada influência dos sais nas medidas a 205 nm.

Tabela A2.1: Coeficientes de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio a 205 e 280 nm.

Sal	Comprimento de onda (nm)	Coeficiente de absorção (g/mg.cm)	Fator de correlação
Sulfato de amônio	205 ^a	31,91	0,99
	280	2,43	0,99
Sulfato de sódio	205 ^b	32,80	0,99
	280	2,32	0,99
Cloreto de sódio	280 ^c	2,52	0,99
Carbamato de amônio	280	2,55	0,99

^a Absorbância da solução de sal sulfato de amônio a 205 nm corresponde a um valor de 0,098.

^b Absorbância da solução de sal sulfato de sódio a 205 nm corresponde a um valor de 0,090.

^c Absorbância da solução de sal cloreto de sódio a 280 nm corresponde a um valor de 0,006.

Para a determinação da concentração de lisozima no precipitado, a curva de absorção de solução da proteína em água a 280 nm foi determinada e o coeficiente de absorção de 2,32 g/mg.cm e o fator de correlação de 0,99 foram obtidos. Como a concentração de sal no precipitado foi pequena e diluição elevada do precipitado rico em lisozima foi necessária (de 600 - 2500 vezes), a influência do sal pode ser considerada desprezível e uma curva de proteína em água pode ser utilizada para determinar a concentração da proteína no precipitado.

Os coeficientes de absorção para soluções de BSA em solução de sulfato de amônio a 205 nm e em água a 280 nm para a determinação da concentração de proteína na fase sobrenadante e no precipitado, respectivamente, também foram obtidos (Tabela A2.2).

Tabela A2.2: Coeficientes de absorção de solução de BSA em solução de sulfato de amônio a 205 nm e em água a 280 nm.

Meio	Comprimento de onda (nm)	Coeficiente de absorção (g/mg.cm)	Fator de correlação
Solução de sulfato de amônio	205 ^c	25,43	0,99
Água	280	0,61	0,99

^c Absorbância da solução de sal sulfato de amônio a 205 nm corresponde a um valor de 0,082.

A2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL NA FASE SOBRENADANTE POR CONDUTIVIDADE

Para a determinação da concentração dos sais sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio na fase sobrenadante, curvas de calibração de condutividade em função da concentração de sal foram obtidas e os coeficientes que relacionam a condutividade do sal com sua concentração são

apresentados na Tabela A2.3. A condutividade da água foi medida experimentalmente e o valor obtido foi de 0,0025 mS/cm. A influência da proteína nas medidas de condutividade dos sais foi avaliada e considerada desprezível mesmo a baixas concentrações de sal, como será apresentada a seguir.

Tabela A2.3: Coeficientes de condutividade dos sais sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio.

Sal	Coeficiente de condutividade (mS.cm ² .mg ⁻¹)	Fator de correlação
Sulfato de amônio	1200,22	0,99
Sulfato de sódio	1041,41	0,99
Cloreto de sódio	1384,20	0,99
Carbamato de amônio	1048,94	0,99

A2.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LISOZIMA NAS MEDIDAS DE CONDUTIVIDADE DOS SAIS

A influência da lisozima nas medidas de condutividade dos sais sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio foi avaliada comparando-se as medidas de condutividade das soluções de sal em água com as medidas de condutividade das soluções de sal contendo água e diferentes concentrações de proteína.

Tabela A2.4: Influência de lisozima nas medidas de condutividade do sal sulfato de amônio. As concentrações dos componentes proteína, água e sal são expressas em g componente/g solução.

Lisozima	Sulfato de amônio	Água	Condutividade do sal sulfato de amônio (mS/cm)	Sulfato de amônio experimental
0,00009	0,372	0,628	19,40	0,377
0,00011	0,352	0,648	19,25	0,354
0,00014	0,321	0,679	20,00	0,318
0,00039	0,282	0,717	18,00	0,285
0,00097	0,252	0,747	15,48	0,247
0,00100	0,222	0,777	14,01	0,227
0,00193	0,184	0,814	23,90	0,176
0,00196	0,152	0,846	20,14	0,148
0,00511	0,121	0,874	16,24	0,119
0,05003	0,074	0,876	10,26	0,075
0,10157	0,031	0,868	4,95	0,034
0,09997	0,021	0,879	3,42	0,023

Tabela A2.5: Influência de lisozima nas medidas de condutividade do sal sulfato de sódio. As concentrações dos componentes proteína, água e sal são expressas em g componente/g solução.

Lisozima	Sulfato de sódio	Água	Condutividade do sal sulfato de sódio (mS/cm)	Sulfato de sódio experimental
0,0002	0,202	0,798	5,62	0,208
0,0004	0,179	0,820	4,94	0,182
0,0005	0,163	0,836	4,70	0,170
0,0006	0,143	0,856	4,06	0,152
0,0024	0,121	0,877	3,58	0,131
0,004	0,097	0,899	5,72	0,094
0,010	0,080	0,911	4,91	0,082
0,019	0,061	0,921	3,97	0,063
0,019	0,050	0,931	3,17	0,053
0,028	0,038	0,934	2,73	0,043
0,029	0,032	0,940	3,51	0,032
0,029	0,022	0,949	2,38	0,023
0,030	0,015	0,955	1,79	0,016
0,030	0,011	0,959	1,14	0,011

Tabela A2.6: Influência de lisozima nas medidas de condutividade do sal carbamato de amônio. As concentrações dos componentes proteína, água e sal são expressas em g componente/g solução.

Lisozima	Carbamato de amônio	Água	Condutividade do sal carbamato de amônio (mS/cm)	Carbamato de amônio experimental
0,0009	0,320	0,679	8,95	0,332
0,0010	0,302	0,697	8,46	0,303
0,0017	0,279	0,719	8,17	0,270
0,0015	0,252	0,747	8,92	0,252
0,0025	0,200	0,797	8,23	0,198
0,0029	0,151	0,846	7,60	0,145
0,0041	0,099	0,897	8,42	0,095
0,0033	0,072	0,924	7,95	0,071
0,0045	0,051	0,944	7,62	0,051
0,0099	0,029	0,961	4,18	0,028

Tabela A2.7: Influência de lisozima nas medidas de condutividade do sal cloreto de sódio. As concentrações dos componentes proteína, água e sal são expressas em g componente/g solução.

Lisozima	Cloreto de sódio	Água	Condutividade do sal carbamato de amônio (mS/cm)	Carbamato de amônio experimental
0,0002	0,251	0,749	8,26	0,261
0,0004	0,225	0,774	6,48	0,242
0,0007	0,202	0,797	6,24	0,210
0,0008	0,177	0,822	5,73	0,189
0,0024	0,156	0,841	5,62	0,165
0,0041	0,124	0,872	6,62	0,125
0,0082	0,100	0,892	5,39	0,104
0,0219	0,081	0,897	7,47	0,078
0,0250	0,064	0,911	4,17	0,057
0,0289	0,052	0,919	5,46	0,051
0,0299	0,039	0,931	5,00	0,035
0,0305	0,026	0,944	4,19	0,030

A2.4. DADOS EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE ABSORÇÃO DE LISOZIMA E BSA

Tabela A2.8: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de amônio a 205 nm.

Concentração de lisozima (mg proteína/g solução)	Concentração de sal (g de sal/g de solução)	Absorbância média ⁴ a 205 nm
0,0546	0,1942	1,7779
0,0443	0,1931	1,6140
0,0326	0,1924	1,1135
0,0218	0,1910	0,7790
0,0109	0,1902	0,4473
0,0076	0,1933	0,3262
0,0055	0,1921	0,2605
0,0023	0,1931	0,1827
0,0018	0,1924	0,1540
0,0011	0,1928	0,1438
0,0000	0,1939	0,0979

Tabela A2.9: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de amônio a 280 nm.

Concentração de lisozima (mg proteína/g solução)	Concentração de sal (g de sal/g de solução)	Absorbância média ⁵ a 280 nm
0,8185	0,0000	1,9748

⁴ Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.

⁵ Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.

0,6135	0,0490	1,4987
0,5105	0,0729	1,2459
0,4099	0,0951	0,9998
0,3064	0,1163	0,7566
0,2585	0,1263	0,6288
0,2042	0,1382	0,4979
0,1525	0,1474	0,3688
0,1035	0,1574	0,2461
0,0521	0,1669	0,1163
0,0259	0,1716	0,0509
0,0156	0,1731	0,0275
0,0108	0,1744	0,0167
0,0057	0,1747	0,0103
0,0000	0,1758	0,0000

Tabela A2.10: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de sódio a 205 nm.

Concentração de lisozima (mg proteína/g solução)	Concentração de sal (g de sal/g de solução)	Absorbância média ⁶ a 205 nm
0,0571	0,1174	1,9292
0,0460	0,1175	1,6126
0,0353	0,1172	1,2788

⁶ Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.

0,0246	0,1184	0,9099
0,0115	0,1178	0,4659
0,0085	0,1176	0,3599
0,0059	0,1173	0,2667
0,0027	0,1176	0,1678
0,0018	0,1175	0,1420
0,0012	0,1172	0,1431
0,0000	0,1173	0,0869

Tabela A2.11: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de sulfato de sódio a 280 nm.

Concentração de lisozima (mg proteína/g solução)	Concentração de sal (g de sal/g de solução)	Absorbância média ⁷ a 280 nm
0,8667	0,0250	2,0030
0,6458	0,0252	1,4955
0,5385	0,0248	1,2526
0,4340	0,0254	1,0112
0,3289	0,0253	0,7619
0,2721	0,0251	0,6334
0,2195	0,0250	0,5087
0,1679	0,0253	0,3887
0,1082	0,0253	0,2466

⁷ Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.

0,0563	0,0246	0,1300
0,0272	0,0253	0,0670
0,0161	0,0250	0,0372
0,0113	0,0251	0,0248
0,0062	0,0253	0,0120
0,0000	0,0245	0,0000

Tabela A2.12: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de cloreto de sódio a 280 nm.

Concentração de lisozima (mg proteína/g solução)	Concentração de sal (g de sal/g de solução)	Absorbância média ⁸ a 280 nm
0,8295	0,0252	2,0805
0,6211	0,0251	1,5735
0,5151	0,0257	1,3182
0,4172	0,0255	1,0678
0,3120	0,0253	0,7991
0,2619	0,0253	0,6682
0,2082	0,0258	0,5353
0,1582	0,0269	0,4076
0,1056	0,0253	0,2729
0,0576	0,0253	0,1484
0,0262	0,0252	0,0681

⁸ Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.

0,0157	0,0263	0,0389
0,0104	0,0252	0,0272
0,0056	0,0251	0,0155
0,0000	0,0252	0,0062

Tabela A2.13: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em solução de carbamato de amônio a 280 nm.

Concentração de lisozima (mg proteína/g solução)	Concentração de sal (g de sal/g de solução)	Absorbância média ⁹ a 280 nm
0,9009	0,1378	2,2784
0,6767	0,1361	1,7201
0,5635	0,1378	1,4439
0,4520	0,1337	1,1477
0,3388	0,1364	0,8717
0,2706	0,1363	0,6931
0,2268	0,1378	0,5780
0,1821	0,1374	0,4638
0,1131	0,1353	0,2907
0,0597	0,1372	0,1526
0,0279	0,1369	0,0732
0,0170	0,1365	0,0449
0,0122	0,1368	0,0307

⁹ Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.

0,0058	0,1367	0,0127
0,0000	0,1378	0,0000

Tabela A2.14: Determinação da curva de absorção de solução de lisozima em água a 280 nm.

Concentração de lisozima (mg proteína/g água)	Absorbância média ¹⁰ a 280 nm
1,01	2,3070
0,81	1,8795
0,60	1,4206
0,40	0,9535
0,30	0,7166
0,26	0,6045
0,20	0,4687
0,15	0,3467
0,10	0,2264
0,051	0,1092
0,026	0,0491
0,016	0,0237
0,011	0,0122
0,005	0,0065
0,000	0,0000

¹⁰ Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.

Tabela A2.15: Determinação da curva de absorção de solução de BSA em solução de sulfato de amônio a 205 nm.

Concentração de BSA (mg proteína/g solução)	Concentração de sal (g de sal/g de solução)	Absorbância média ¹¹ a 205 nm
0	0,5264	0,082
0,0104	0,5264	0,3477
0,0277	0,5264	0,7871
0,0539	0,5273	1,4555
0,0799	0,5303	2,1146
0,1069	0,5264	2,2103

Tabela A2.16: Determinação da curva de absorção de solução de BSA em água a 280 nm.

Concentração de BSA (mg proteína/g água)	Absorbância média ¹² a 280 nm
1,056	0,6384
0,950	0,5759
0,845	0,5139
0,738	0,4486
0,636	0,3872
0,528	0,3197
0,424	0,2566
0,318	0,1935

¹¹ Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.¹² Os valores de absorbância referem-se à média das triplicatas realizadas.

0,209	0,1263
0,110	0,0661
0,058	0,0321
0,021	0,0156
0,000	0,0000

A2.5. DADOS EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE CONDUTIVIDADE DOS SAIS

Tabela A2.17: Determinação do coeficiente de condutividade do sal sulfato de amônio.

Concentração de sulfato de amônio (g sal/g água)	Condutividade média ¹³ (mS/cm)
0,021	24,40
0,016	19,84
0,010	12,77
0,008	10,62
0,006	8,17
0,005	7,21
0,004	5,51
0,002	3,07
0,001	1,77
0,000	0,0025

¹³ Os valores de absorvância referem-se à média das triplicatas realizadas.

Tabela A2.18: Determinação do coeficiente de condutividade do sal sulfato de sódio.

Concentração de sulfato de sódio (g sal/g água)	Condutividade média ¹⁴ (mS/cm)
0,010	10,30
0,009	8,81
0,005	5,68
0,004	4,48
0,003	3,45
0,002	2,45
0,002	2,10
0,001	1,53
0,000	0,0027

Tabela A2.19: Determinação do coeficiente de condutividade do sal carbamato de amônio.

Concentração de carbamato de amônio (g sal/g água)	Condutividade média ¹⁵ (mS/cm)
0,0128	12,98
0,0106	11,08
0,0084	8,74
0,0063	6,89
0,0055	6,12

¹⁴ Os valores de absorvância referem-se à média das triplicatas realizadas.¹⁵ Os valores de absorvância referem-se à média das triplicatas realizadas.

0,0042	4,79
0,0031	3,46
0,0021	2,55
0,0012	1,52
0,0006	0,68
0,0000	0,0025

Tabela A2.20: Determinação do coeficiente de condutividade do sal cloreto de sódio.

Concentração de cloreto de sódio (g sal/g água)	Condutividade média ¹⁶ (mS/cm)
0,0086	11,78
0,0052	7,39
0,0035	5,31
0,0012	1,90
0,0009	1,38
0,0006	0,93
0,0004	0,57
0,0001	0,23
0,0000	0,0025

¹⁶ Os valores de absorvância referem-se à média das triplicatas realizadas.

APÊNDICE 3

Neste apêndice 3 demonstra-se como as composições dos componentes proteína, sal e água podem ser determinadas através dos diagramas ternários.

A3.1. DIAGRAMAS DE FASE DA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS EM SAL

Diagramas ternários da precipitação de proteínas por “salting-out” representam as composições das fases coexistentes em equilíbrio. Nos itens 4.1-4.7, dados experimentais de equilíbrio de fases da precipitação das proteínas lisozima e albumina de soro bovino precipitadas com o uso de sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio são apresentados na forma de diagramas ternários. A leitura das composições de determinada fase pode ser realizada conforme indicada pela Figura A3.1, em que se têm as seguintes concentrações mássicas dos componentes proteína, sal e água: 0,3 g proteína/g solução; 0,4 g de sal/ g de solução e 0,3 g de água/ g de solução.

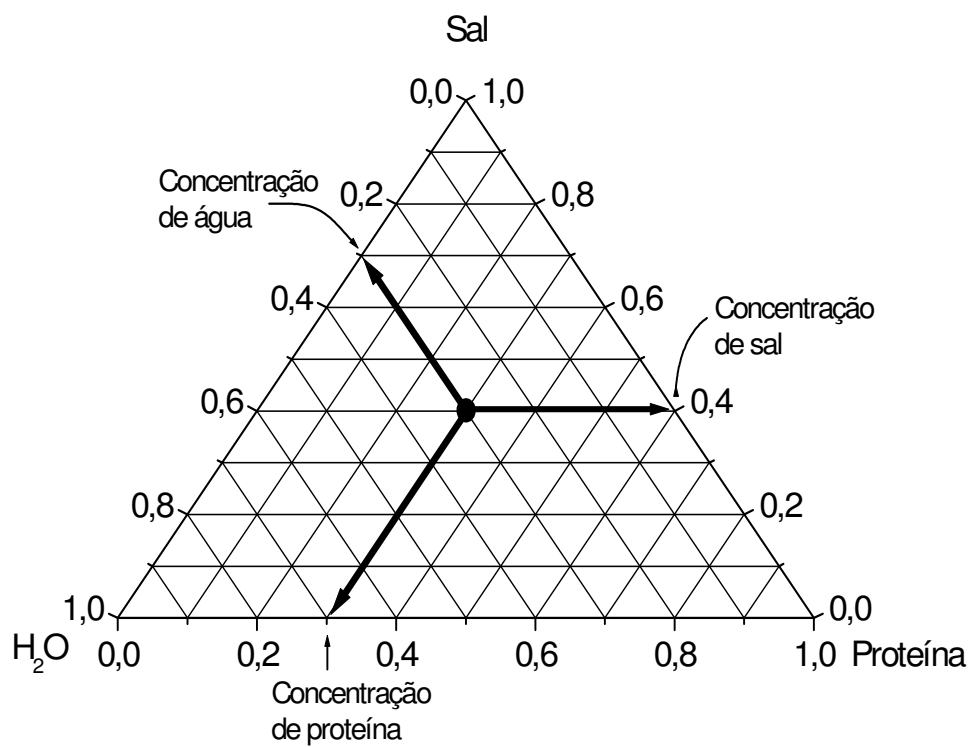


Figura A3.1: Ilustração de leitura dos componentes proteína, sal e água representados no diagrama ternário.

APÊNDICE 4

Neste apêndice 4 têm-se as composições de proteína, sal e água na alimentação, na fase sobrenadante e no precipitado determinadas experimentalmente para a obtenção dos diagramas de fases apresentados neste trabalho. Os resultados da influência do tempo e velocidade de centrifugação, e da vazão de alimentação do sal na separação de fases do sistema lisozima - sulfato de amônio - água também são apresentados neste apêndice.

A4.1. SISTEMA LISOZIMA-SULFATO DE AMÔNIO-ÁGUA

Tabela A4.1: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) na alimentação		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,0118	0,3616	0,6251
	0,0281	0,3132	0,6552
	0,0627	0,2105	0,7190
	0,0464	0,2648	0,6842
	0,0802	0,1634	0,7476
	0,0993	0,1152	0,7757
	0,1123	0,0671	0,8079
	0,1260	0,0272	0,8325
4,0	0,0130	0,3623	0,6246
	0,0309	0,3152	0,6538

	0,0493	0,2665	0,6841
	0,0697	0,2128	0,7175
	0,0875	0,1643	0,7482
	0,1057	0,1159	0,7783
	0,1236	0,0684	0,8079
	0,1388	0,028	0,8331
7,0	0,0136	0,3647	0,6216
	0,0328	0,3164	0,6506
	0,0519	0,2681	0,6795
	0,0739	0,2126	0,7128
	0,0927	0,165	0,7416
	0,1118	0,1167	0,7706
	0,1315	0,0693	0,7983
	0,1477	0,0285	0,8228
10,0	0,0135	0,3682	0,6181
	0,0323	0,3197	0,6476
	0,0509	0,2716	0,6768
	0,0728	0,2148	0,7114
	0,0938	0,1665	0,7390
	0,1128	0,1188	0,7676
	0,1323	0,0699	0,7969
	0,1488	0,0285	0,8217

Tabela A4.2: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) na fase sobrenadante		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,00007	0,3706	0,6294
	0,00180	0,3280	0,6718
	0,00008	0,2823	0,7176
	0,0036	0,2216	0,7780
	0,0014	0,1786	0,8200
	0,0053	0,1265	0,8682
	0,0197	0,0686	0,9117
	0,0430	0,0226	0,9344
4,0	0,00015	0,3881	0,6118
	0,00009	0,3296	0,6703
	0,00038	0,2738	0,7259
	0,00068	0,2248	0,7745
	0,0054	0,1783	0,8163
	0,0077	0,1230	0,8694
	0,0246	0,0711	0,9043
	0,0464	0,0289	0,9248
7,0	0,00007	0,3684	0,6315
	0,00012	0,3235	0,6764
	0,00036	0,2818	0,7178

10,0	0,0034	0,2233	0,7733
	0,0015	0,1801	0,8184
	0,0055	0,1288	0,8656
	0,0991	0,0720	0,8289
	0,1117	0,0293	0,859
	0,00001	0,3725	0,6275
	0,00003	0,3249	0,6751
	0,00021	0,2743	0,7255
	0,00124	0,2377	0,7611
	0,0022	0,1814	0,8163
	0,0065	0,1457	0,8477
	0,0126	0,0814	0,906
	0,0191	0,0382	0,9427

Tabela A4.3: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) no precipitado		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,0696	0,3175	0,6129
	0,0795	0,2920	0,6285
	0,1512	0,2063	0,6425
	0,1315	0,2370	0,6316

	0,1892	0,1477	0,6631
	0,2971	0,0762	0,6268
	0,3023	0,0636	0,6341
	0,3134	0,0355	0,651
	0,0776	0,3233	0,5992
	0,0955	0,2876	0,6169
	0,1311	0,2377	0,6312
4,0	0,2482	0,1648	0,5870
	0,2053	0,1311	0,6636
	0,3446	0,0962	0,5592
	0,3572	0,0511	0,5918
	0,3995	0,0279	0,5726
	0,0712	0,3250	0,6038
	0,0953	0,2772	0,6276
	0,1247	0,2442	0,6311
7,0	0,1764	0,1881	0,6355
	0,2261	0,1401	0,6338
	0,2642	0,0844	0,6515
	0,1919	0,0628	0,7453
	0,1675	0,0322	0,8003
10,0	0,0669	0,3285	0,6046
	0,0812	0,2913	0,6275
	0,1092	0,2539	0,6369
	0,1436	0,1796	0,6768

	0,1611	0,1526	0,6863
	0,2340	0,0812	0,6848
	0,2897	0,0626	0,6477
	0,2762	0,0213	0,7025

Tabela A4.4: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a pH igual a 4,0 e 8,0 e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante (Moretti *et al.*, 2000) expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) na fase sobrenadante		
	(1)	(2)	(3)
4,0	0,0979	0,0102	0,8918
	0,0974	0,0117	0,9049
	0,0635	0,0429	0,9083
	0,0516	0,0441	0,9125
	0,0377	0,0734	0,9072
	0,0352	0,0744	0,8939
	0,0285	0,0815	0,8899
	0,0242	0,1016	0,8836
	0,0207	0,1074	0,8970
	0,0145	0,1308	0,8556
	0,0079	0,1784	0,8195
	0,00803	0,1787	0,8155

	0,00852	0,1784	0,8130
	0,00297	0,2075	0,8089
	0,00291	0,2079	0,7981
	0,00104	0,2362	0,7818
	0,00104	0,2363	0,7809
	0,00043	0,2589	0,7486
	0,00043	0,2592	0,7444
	0,00036	0,2599	0,7464
	0,00036	0,2600	0,7459
	0,00015	0,2845	0,7262
	0,00015	0,2844	0,7173
	0,00004	0,3060	0,6977
	0,00004	0,3078	0,6900
8,0	0,0569	0,0299	0,9323
	0,0591	0,0316	0,9263
	0,0400	0,0632	0,9111
	0,0361	0,0705	0,9112
	0,0192	0,0905	0,9119
	0,0198	0,0943	0,8994
	0,0151	0,0963	0,9048
	0,0146	0,0984	0,9011
	0,0155	0,0994	0,8978
	0,0108	0,1049	0,8967
	0,00080	0,1272	0,8892

	0,0132	0,1872	0,8297
	0,00793	0,1959	0,8127
	0,00761	0,2061	0,7893
	0,00766	0,2057	0,7791
	0,00226	0,2357	0,7650
	0,00226	0,2355	0,7596
	0,00067	0,2600	0,7350
	0,00025	0,2799	0,7111
	0,00007	0,3033	0,6846
	0,00002	0,3216	0,6488

Tabela A4.5: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a pH igual a 4,0 e 8,0 e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes no precipitado (Moretti *et al.*, 2000) expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) no precipitado		
	(1)	(2)	(3)
4,0	0,8501	0,0000	0,1511
	0,0634	0,1679	0,7929
	0,0675	0,1676	0,7828
	0,0695	0,1679	0,7801
	0,0720	0,1674	0,7747
	0,1036	0,1860	0,7181
	0,0999	0,1871	0,7146

	0,1078	0,2080	0,7206
	0,1049	0,2090	0,7124
	0,1013	0,2306	0,7036
	0,1052	0,2286	0,6950
	0,0936	0,2335	0,6955
	0,091	0,2342	0,6939
	0,0919	0,2557	0,6566
	0,1051	0,2716	0,6250
	0,0973	0,2935	0,6092
	0,0956	0,2945	0,6027
	0,839	0,0000	0,1753
	0,8503	0,0000	0,1461
	0,8460	0,0000	0,1737
	0,8257	0,0000	0,1734
	0,1518	0,1493	0,7063
	0,1558	0,1470	0,6949
	0,1093	0,1824	0,7124
	0,1109	0,1831	0,7048
	0,0985	0,2098	0,7030
	0,0962	0,2112	0,7012
	0,0952	0,2326	0,6763
	0,0912	0,2530	0,6696
	0,0937	0,2711	0,6439
	0,0954	0,2876	0,6260

Tabela A4.6: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) na alimentação		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,0134	0,3648	0,6217
	0,0311	0,3178	0,6511
	0,0490	0,2699	0,6810
	0,0702	0,2136	0,7162
	0,0882	0,1657	0,7461
	0,1063	0,1174	0,7762
	0,1234	0,0703	0,8060
	0,1315	0,0490	0,8194
	0,1389	0,0289	0,8320
	0,1443	0,0145	0,8411
15,0	0,0132	0,3665	0,6202
	0,0303	0,3190	0,6504
	0,0477	0,2710	0,6809
	0,0679	0,2149	0,7166
	0,0853	0,1667	0,7472
	0,1025	0,1192	0,7775
	0,1201	0,0700	0,8088
	0,1278	0,0486	0,8225
	0,1349	0,0290	0,8349

	0,1401	0,0144	0,8442
	0,0136	0,3647	0,6216
	0,0328	0,3164	0,6506
	0,0519	0,2681	0,6795
	0,0739	0,2126	0,7128
25,0	0,0927	0,1650	0,7416
	0,1118	0,1167	0,7706
	0,1315	0,0693	0,7983
	0,1469	0,0280	0,8239

Tabela A4.7: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) na fase sobrenadante		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,000021	0,3778	0,6222
	0,000025	0,3436	0,6563
	0,0002	0,2825	0,7173
	0,0009	0,2477	0,7514
	0,0101	0,1716	0,8183
	0,0566	0,1131	0,8302
	0,0849	0,0737	0,8414
	0,0672	0,0528	0,8800

	0,0442	0,0344	0,9213
	0,0386	0,0182	0,9432
	0,000019	0,3730	0,6270
	0,000023	0,3478	0,6522
	0,000018	0,3025	0,6974
	0,00225	0,2349	0,7629
	0,00955	0,1707	0,8197
15,0	0,0315	0,1288	0,8397
	0,0742	0,0792	0,8465
	0,0699	0,0585	0,8715
	0,0600	0,0403	0,8997
	0,0306	0,0247	0,9446
	0,00007	0,3684	0,6315
	0,00012	0,3235	0,6764
	0,00036	0,2818	0,7178
	0,0034	0,2233	0,7733
25,0	0,0015	0,1801	0,8184
	0,0055	0,1288	0,8656
	0,0991	0,0720	0,8289
	0,1147	0,0284	0,8569

Tabela A4.8: Sistema lisozima (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) no precipitado		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,0674	0,3339	0,5987
	0,0771	0,3012	0,6217
	0,1117	0,2373	0,651
	0,1466	0,1804	0,6729
	0,2028	0,1371	0,6600
	0,2700	0,0821	0,6479
	0,3318	0,0347	0,6335
	0,4083	0,0208	0,5709
	0,4179	0,0000	0,5965
	0,3982	0,0000	0,6196
15,0	0,0882	0,3189	0,5929
	0,0869	0,2932	0,6199
	0,1082	0,2427	0,6492
	0,1618	0,1703	0,6596
	0,1128	0,1567	0,7304
	0,1595	0,1084	0,7321
	0,2264	0,0535	0,7201
	0,1814	0,0342	0,7843
	0,2858	0,0070	0,7072

	0,3925	0,0000	0,6170
	0,0712	0,3250	0,6038
	0,0953	0,2772	0,6276
	0,1247	0,2442	0,6311
	0,1764	0,1881	0,6355
25,0	0,2261	0,1401	0,6338
	0,2642	0,0844	0,6515
	0,1919	0,0628	0,7453
	0,1809	0,0225	0,7966

A4.2. SISTEMA LISOZIMA-SULFATO DE SÓDIO-ÁGUA

Tabela A4.9: Sistema lisoizima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) na alimentação		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,0507	0,2529	0,6905
	0,0546	0,1966	0,7425
	0,0567	0,1657	0,7710
	0,0394	0,1502	0,8068
	0,0732	0,1098	0,8105
	0,0541	0,2265	0,7120
	0,1093	0,0631	0,8161

	0,1420	0,0229	0,8201
	0,0482	0,254	0,6978
	0,0499	0,2279	0,7222
	0,0518	0,1980	0,7501
4,0	0,0539	0,1666	0,7795
	0,0466	0,1518	0,8016
	0,1740	0,0236	0,8024
	0,0873	0,1111	0,8016
	0,1327	0,0655	0,8018
	0,0329	0,1521	0,8147
	0,0640	0,1107	0,8248
	0,0956	0,0638	0,8397
7,0	0,1244	0,0233	0,8512
	0,0498	0,2280	0,7217
	0,0518	0,1983	0,7495
	0,0538	0,1663	0,7794
	0,0477	0,2552	0,6967
	0,0492	0,2312	0,7191
	0,0508	0,2061	0,7427
10,0	0,0524	0,1811	0,7660
	0,0467	0,1515	0,8014
	0,0866	0,1095	0,8031
	0,1267	0,0673	0,8049
	0,1617	0,0305	0,8064

Tabela A4.10: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) na fase sobrenadante		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,00011	0,2818	0,7181
	0,00022	0,2429	0,7569
	0,00019	0,2006	0,7992
	0,00027	0,1701	0,8297
	0,00060	0,1485	0,8509
	0,00260	0,1109	0,8864
	0,0081	0,0611	0,9308
	0,0305	0,0172	0,9523
4,0	0,00026	0,2824	0,7173
	0,00007	0,2593	0,7407
	0,00017	0,2114	0,7884
	0,00024	0,1862	0,8136
	0,0006	0,1677	0,8317
	0,1182	0,0308	0,8510
	0,0017	0,1199	0,8784
	0,0468	0,0723	0,8809
7,0	0,00010	0,2633	0,7366
	0,00011	0,2200	0,7798
	0,00039	0,1862	0,8135

10,0	0,0004	0,1444	0,8552
	0,0039	0,1076	0,8885
	0,0106	0,0647	0,9247
	0,0786	0,0304	0,8910
	0,000061	0,2918	0,7081
	0,00001	0,2734	0,7266
	0,00002	0,2249	0,7751
	0,00009	0,1960	0,8040
	0,00008	0,1649	0,8350
	0,00096	0,1284	0,8707
	0,00521	0,0803	0,9145
	0,01327	0,0419	0,9448

Tabela A4.11: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) no precipitado		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,1015	0,2273	0,6785
	0,1104	0,1847	0,6916
	0,1230	0,1577	0,7054
	0,0995	0,1387	0,7533
	0,1341	0,1041	0,7634

	0,1366	0,2156	0,6618
	0,1771	0,0594	0,7636
	0,3451	0,0303	0,6246
	0,0834	0,2429	0,6869
	0,2046	0,1853	0,6188
	0,2135	0,1592	0,6384
	0,2474	0,1252	0,6400
4,0	0,2347	0,0812	0,6950
	0,2912	0,0114	0,6724
	0,2802	0,0761	0,6586
	0,2352	0,0524	0,7261
	0,1260	0,2063	0,6810
	0,1611	0,1721	0,6834
	0,2027	0,1493	0,6697
7,0	0,2539	0,1099	0,6636
	0,2380	0,0827	0,7155
	0,2857	0,0460	0,6995
	0,1753	0,0088	0,8385
10,0	0,0576	0,2454	0,6969
	0,0719	0,2174	0,7107
	0,0876	0,2040	0,7083
	0,0949	0,1794	0,7256
	0,1243	0,1363	0,7393
	0,1877	0,0989	0,7133

	0,2034	0,0722	0,7244
	0,3376	0,0165	0,6459

Tabela A4.12: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) na alimentação		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,0515	0,2088	0,7396
	0,0534	0,1793	0,7672
	0,0484	0,1521	0,7994
	0,0897	0,1100	0,8001
	0,1320	0,0669	0,8007
	0,1677	0,0307	0,8012
15,0	0,04749	0,2564	0,6955
	0,04898	0,2330	0,7175
	0,05060	0,2076	0,7412
	0,05229	0,1813	0,7659
	0,0469	0,1521	0,8005
	0,0872	0,1099	0,8021
	0,1277	0,0676	0,8037
	0,1633	0,0303	0,8051
25,0	0,0498	0,2280	0,7217

	0,0518	0,1983	0,7495
	0,0538	0,1663	0,7794
	0,0329	0,1521	0,8147
	0,064	0,1107	0,8248
	0,0956	0,0638	0,8397
	0,1244	0,0233	0,8512

Tabela A4.13: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) na fase sobrenadante		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,000020	0,2371	0,7629
	0,000311	0,2074	0,7923
	0,000230	0,1686	0,8312
	0,00064	0,1149	0,8844
	0,00403	0,0755	0,9205
	0,00888	0,0394	0,9517
15,0	0,00002	0,2603	0,7396
	0,000017	0,2660	0,7340
	0,000019	0,2375	0,7625
	0,000021	0,1953	0,8047
	0,0086	0,1579	0,8335

25,0	0,0113	0,1173	0,8714
	0,0369	0,0687	0,8944
	0,0454	0,0353	0,9193
	0,00010	0,2633	0,7366
	0,00011	0,2200	0,7798
	0,00039	0,1862	0,8135
	0,0004	0,1444	0,8552
	0,0039	0,1076	0,8885
	0,0106	0,0647	0,9247
	0,0786	0,0304	0,8910

Tabela A4.14: Sistema lisozima (1) – sulfato de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) no precipitado		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,1057	0,1918	0,7025
	0,1241	0,1561	0,7198
	0,0797	0,1496	0,7707
	0,1395	0,1002	0,7603
	0,1757	0,0584	0,7659
	0,3039	0,0352	0,6610
15,0	0,0906	0,2238	0,6856
	0,0971	0,2059	0,6970

	0,1073	0,1803	0,7124
	0,0941	0,1780	0,7279
	0,1233	0,1329	0,7438
	0,1314	0,1039	0,7647
	0,1712	0,0674	0,7614
	0,2761	0,0164	0,7075
	0,1260	0,2063	0,6810
	0,1611	0,1721	0,6834
	0,2027	0,1493	0,6697
25,0	0,2539	0,1099	0,6636
	0,2380	0,0827	0,7155
	0,2857	0,0460	0,6995
	0,1753	0,0088	0,8385

A4.3. SISTEMA LISOZIMA-CLORETO DE SÓDIO-ÁGUA

Tabela A4.15: Sistema lisozima (1) – cloreto de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) na alimentação		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,0250	0,2082	0,7666
	0,0457	0,1725	0,7814
	0,0708	0,1295	0,7991

	0,0956	0,0866	0,8173
	0,108	0,0650	0,8261
	0,1207	0,0432	0,8351
	0,132	0,0237	0,8432
15,0	0,0128	0,2298	0,7574
	0,0250	0,2082	0,7666
	0,0460	0,1702	0,7834
	0,0713	0,1275	0,8007
	0,0950	0,0863	0,8177
	0,1079	0,0644	0,8274
	0,1218	0,0419	0,8353
	0,1325	0,0224	0,8441
25,0	0,0130	0,2295	0,7574
	0,0251	0,2108	0,7640
	0,0464	0,1742	0,7791
	0,0719	0,1303	0,7974
	0,0959	0,0868	0,8165
	0,1077	0,0654	0,8259
	0,1211	0,0434	0,8346
	0,1326	0,0222	0,8440

Tabela A4.16: Sistema lisozima (1) – cloreto de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) na fase sobrenadante		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,00019	0,2123	0,7875
	0,00051	0,1920	0,8075
	0,00057	0,1505	0,8489
	0,00072	0,1055	0,8938
	0,00134	0,0803	0,9184
	0,00171	0,0476	0,9507
	0,00217	0,0295	0,9683
15,0	0,00001	0,2407	0,7592
	0,00019	0,2123	0,7875
	0,00034	0,1836	0,8161
	0,00088	0,1454	0,8537
	0,00141	0,1001	0,8985
	0,00172	0,0738	0,9244
	0,00503	0,0466	0,9483
25,0	0,00512	0,0280	0,9669
	0,00004	0,2424	0,7576
	0,00019	0,2134	0,7864
	0,00027	0,1933	0,8064
	0,00055	0,1486	0,8508

	0,00141	0,0956	0,9029
	0,00202	0,0798	0,9181
	0,00594	0,0481	0,9460
	0,00662	0,0282	0,9652

Tabela A4.17: Sistema lisozima (1) – cloreto de sódio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) no precipitado		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,0801	0,1951	0,7248
	0,1152	0,1539	0,7309
	0,1556	0,1031	0,7413
	0,1991	0,0657	0,7352
	0,2947	0,0284	0,6769
	0,2775	0,0414	0,681
	0,3112	0,0000	0,6984
15,0	0,0411	0,2229	0,7360
	0,0801	0,1951	0,7248
	0,1111	0,1664	0,7225
	0,2012	0,1160	0,6828
	0,2122	0,0785	0,7093
	0,2894	0,0290	0,6815

25,0	0,2640	0,0223	0,7137
	0,3078	0,0000	0,6934
	0,0623	0,2172	0,7205
	0,0833	0,1955	0,7212
	0,1253	0,1532	0,7214
	0,1844	0,0985	0,7171
	0,3402	0,0389	0,6209
	0,2466	0,0591	0,6943
	0,2819	0,0250	0,6931
	0,3763	0,0000	0,6343

A4.4. SISTEMA LISOZIMA-CARBAMATO DE AMÔNIO-ÁGUA

Tabela A4.18: Sistema lisozima (1) – carbamato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) na alimentação		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,0354	0,2649	0,6995
	0,0556	0,2165	0,7275
	0,0731	0,1759	0,7504
	0,0905	0,1343	0,7746
	0,1064	0,0942	0,7983
	0,1291	0,0421	0,8279

15,0	0,0354	0,2649	0,6995
	0,0554	0,2175	0,7267
	0,0727	0,1757	0,7510
	0,0910	0,1330	0,7753
	0,1076	0,0917	0,7999
	0,1281	0,0423	0,8286
25,0	0,0353	0,2657	0,6987
	0,0560	0,2163	0,7273
	0,0731	0,1747	0,7517
	0,0907	0,1333	0,7753
	0,1085	0,0908	0,7998
	0,1287	0,0425	0,8278

Tabela A4.19: Sistema lisozima (1) – carbamato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) na fase sobrenadante		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,00034	0,2910	0,7086
	0,00060	0,2401	0,7593
	0,00070	0,1874	0,8119
	0,00087	0,1542	0,8450
	0,00102	0,1125	0,8865
	0,00169	0,0583	0,9400

15,0	0,00017	0,2842	0,7156
	0,00021	0,2390	0,7608
	0,00043	0,1940	0,8056
	0,00095	0,1456	0,8534
	0,00121	0,1074	0,8914
	0,00164	0,0561	0,9423
25,0	0,00012	0,2784	0,7215
	0,00017	0,2293	0,7705
	0,00033	0,1905	0,8091
	0,00044	0,1452	0,8544
	0,00093	0,1012	0,8979
	0,00144	0,0542	0,9444

Tabela A4.20: Sistema lisozima (1) – carbamato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de temperatura e pH igual a 7,0: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução.

T (°C)	Concentração mássica dos componentes (i) no precipitado		
	(1)	(2)	(3)
5,0	0,1446	0,1957	0,6753
	0,1238	0,1866	0,6810
	0,0810	0,1746	0,7436
	0,1449	0,1206	0,7262
	0,2029	0,0781	0,7210
	0,2222	0,0293	0,7391

15,0	0,0624	0,2452	0,6830
	0,1053	0,1969	0,6940
	0,0988	0,1593	0,7016
	0,1748	0,1208	0,6992
	0,1630	0,0775	0,7167
	0,2558	0,0282	0,7128
25,0	0,0739	0,2549	0,6791
	0,1213	0,2036	0,6853
	0,1510	0,1585	0,6935
	0,1816	0,1222	0,7016
	0,1756	0,0851	0,7467
	0,2103	0,0348	0,7509

A4.5. SISTEMA BSA-SULFATO DE AMÔNIO-ÁGUA

Tabela A4.21: Sistema BSA (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na alimentação expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) na alimentação		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,0292	0,3477	0,618
	0,0417	0,3258	0,6254
	0,0575	0,2979	0,6347
	0,0734	0,2699	0,6441

	0,0856	0,2484	0,6513
	0,1038	0,2164	0,6621
	0,1173	0,1925	0,6701
	0,0142	0,3687	0,6171
7,0	0,0317	0,3339	0,6343
	0,0422	0,3132	0,6446
	0,0595	0,2787	0,6617
	0,0229	0,3571	0,6196
9,0	0,0403	0,3267	0,6324
	0,0630	0,2870	0,6491
	0,0850	0,2485	0,6652

Tabela A4.22: Sistema BSA (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes na fase sobrenadante expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) na fase sobrenadante		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,00010	0,3548	0,6451
	0,00014	0,3329	0,6670
	0,00011	0,3070	0,6929
	0,00013	0,2831	0,7168
	0,00012	0,2606	0,7393
	0,00017	0,2335	0,7663
	0,00018	0,2124	0,7874

7,0	0,00013	0,3799	0,62
	0,00018	0,3524	0,6474
	0,00053	0,342	0,6575
	0,01846	0,2956	0,6859
9,0	0,00036	0,3724	0,6272
	0,00065	0,3441	0,6552
	0,00471	0,3104	0,6849
	0,07189	0,2483	0,6798

Tabela A4.23: Sistema BSA (1) – sulfato de amônio (2) – água (3) a diferentes valores de pH e temperatura igual a 25°C: concentrações mássicas dos componentes no precipitado expressas em g componente/g solução.

pH	Concentração mássica dos componentes (i) no precipitado		
	(1)	(2)	(3)
2,0	0,1322	0,3217	0,5462
	0,1607	0,3108	0,5285
	0,1556	0,2870	0,5575
	0,1782	0,2541	0,5677
	0,1936	0,2305	0,5759
	0,2010	0,2022	0,5968
	0,2176	0,1761	0,6063
	0,2176	0,1761	0,6063
7,0	0,0597	0,3326	0,6076
	0,0539	0,3148	0,6313

	0,1264	0,2669	0,6067
	0,1807	0,2157	0,6037
	0,0929	0,3187	0,5884
9,0	0,1031	0,2888	0,6081
	0,1409	0,2421	0,617
	0,2233	0,1910	0,5857

A4.6. INFLUÊNCIA DO TEMPO E VELOCIDADE DE CENTRIFUGAÇÃO NA SEPARAÇÃO DE FASES DO SISTEMA LISOZIMA-SULFATO DE AMÔNIO-ÁGUA

Tabela A4.24: Variação do tempo de centrifugação para o sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e 25,0°C a uma velocidade de centrifugação de 2000 g para separação da fase sobrenadante e do precipitado.

Região de concentração de sal	Tempo de centrifugação (min)	Massa de precipitado (g)	Concentração mássica dos componentes do precipitado (g componente/g de precipitado)		
			Lisozima	Sulfato de amônio	Água
Alta	15	0,51	0,09	0,27	0,64
	30	0,51	0,09	0,28	0,63
	60	0,50	0,09	0,27	0,63
	180	0,50	0,09	0,27	0,63
Baixa	15	0,57	0,29	0,04	0,67
	30	0,56	0,30	0,04	0,66

	60	0,57	0,30	0,04	0,66
	180	0,56	0,29	0,04	0,67

Tabela A4.25: Variação da velocidade de centrifugação para o sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e 25,0°C para o tempo de centrifugação de 15 min para separação da fase sobrenadante e do precipitado.

Região de concentração de sal	Velocidade de centrifugação (g)	Massa de precipitado (g)	Concentração mássica dos componentes do precipitado (g componente/g de precipitado)		
			Lisozima	Sulfato de amônio	Água
Alta	1000	0,51	0,09	0,27	0,64
	1500	0,50	0,10	0,26	0,64
	2000	0,51	0,09	0,27	0,64
Baixa	1000	0,57	0,29	0,03	0,67
	1500	0,58	0,30	0,04	0,66
	2000	0,57	0,29	0,04	0,67

Tabela A4.26: Variação da taxa de adição do sal, para o sistema lisozima-sulfato de amônio-água a pH 7,0 e 25,0 °C.

Região de concentração de sal	Taxa de adição do sal (mL/h)	Massa de precipitado (g)	Concentração mássica dos componentes da fase sobrenadante (g componente/g de fase)			Concentração mássica dos componentes do precipitado (g componente/g de precipitado)		
			Lisozima	Sulfato de amônio	Água	Lisozima	Sulfato de amônio	Água
Alta	0,22	1,10	0,00002	0,29	0,71	0,11	0,33	0,56
	2,20	1,11	0,00002	0,29	0,71	0,10	0,33	0,57
	22,0	1,01	0,00002	0,30	0,70	0,13	0,32	0,56
Baixa	0,22	1,03	0,015	0,09	0,90	0,31	0,04	0,64
	2,20	1,06	0,014	0,08	0,90	0,31	0,04	0,65
	22,0	1,03	0,014	0,08	0,90	0,32	0,03	0,65

APÊNDICE 5

Neste apêndice 5 têm-se os ensaios preliminares de atividade enzimática de lisozima, que consistiram na determinação da faixa operacional da taxa de reação do substrato *Micrococcus lysodeikticus* pela proteína e a verificação da influência dos sais, utilizados na precipitação de lisozima, na reação de degradação do substrato pela lisozima.

A5.1. DETERMINAÇÃO DA FAIXA OPERACIONAL DA TAXA DE REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO *Micrococcus lysodeikticus* PELA LISOZIMA

Para a obtenção da faixa operacional da taxa de reação de degradação do substrato *Micrococcus lysodeikticus* pela lisozima determinou-se a atividade enzimática para diferentes valores de concentração de proteína e procedeu-se o cálculo da atividade específica da proteína segundo a Equação 3.1. A Figura A5.1 apresenta os valores de atividade específica da lisozima em função da taxa de “lise” do substrato. Como a atividade específica da proteína deve possuir um valor único, independente da concentração de lisozima utilizada, verificou-se que a faixa da taxa de reação de $-0,055$ a $-0,136 \text{ min}^{-1}$ (correspondente à concentração de lisozima de $0,025$ a $0,06 \text{ mg/mL}$) fornece um valor constante de aproximadamente $20.000,00 \text{ UA/mg}$. Desta maneira, a concentração de lisozima escolhida a ser utilizada nos ensaios de atividade, deste trabalho, foi de $0,05 \text{ mg/mL}$.

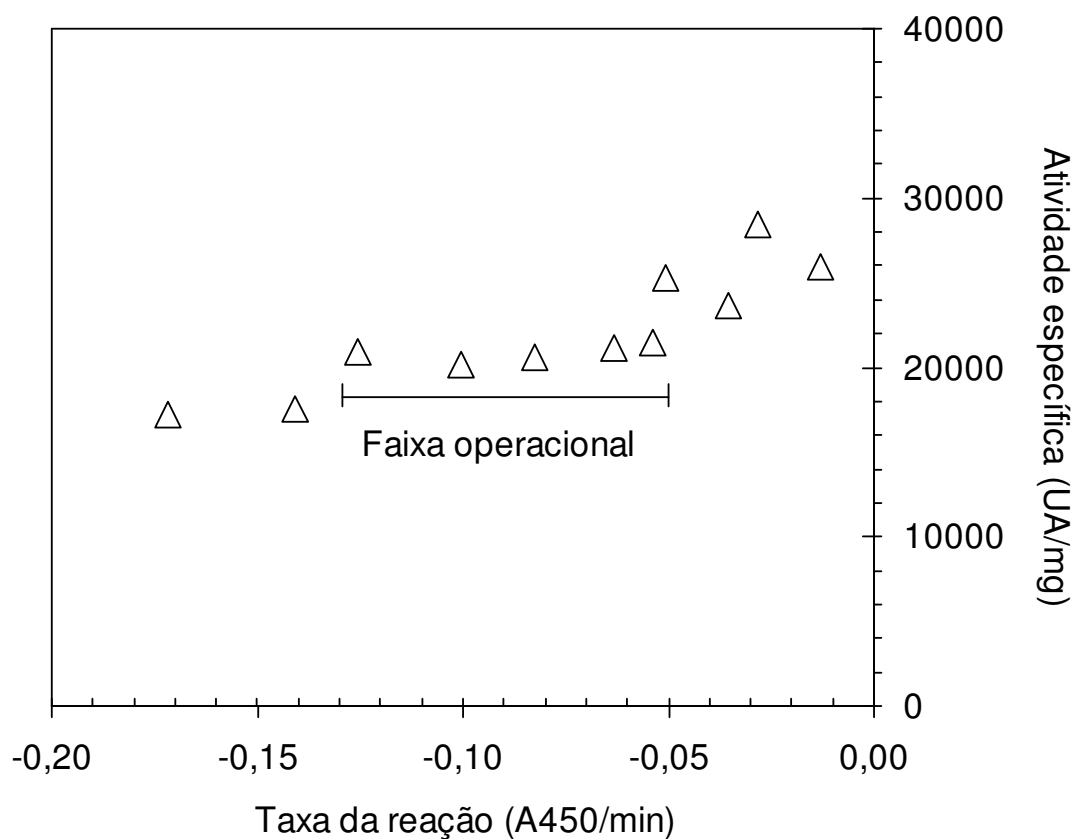


Figura A5.1: Determinação da atividade específica da lisozima em tampão de fosfato de potássio 0,066 mol/L pH 6,24 em função da taxa de reação de degradação do substrato *Micrococcus lysodeikticus* a 25,0°C para diversas concentrações de lisozima.

A5.2. INFLUÊNCIA DO SAL NA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DO SUBSTRATO *Micrococcus lysodeikticus* PELA LISOZIMA

A influência dos sais sulfato de amônio, sulfato de sódio, carbamato de amônio e cloreto de sódio na atividade enzimática da lisozima foi verificada através da adição do sal diretamente na solução do substrato *Micrococcus lysodeikticus*. A Figura A5.2 contém os valores de atividade específica da lisozima em função das concentrações dos sais adicionados à reação.

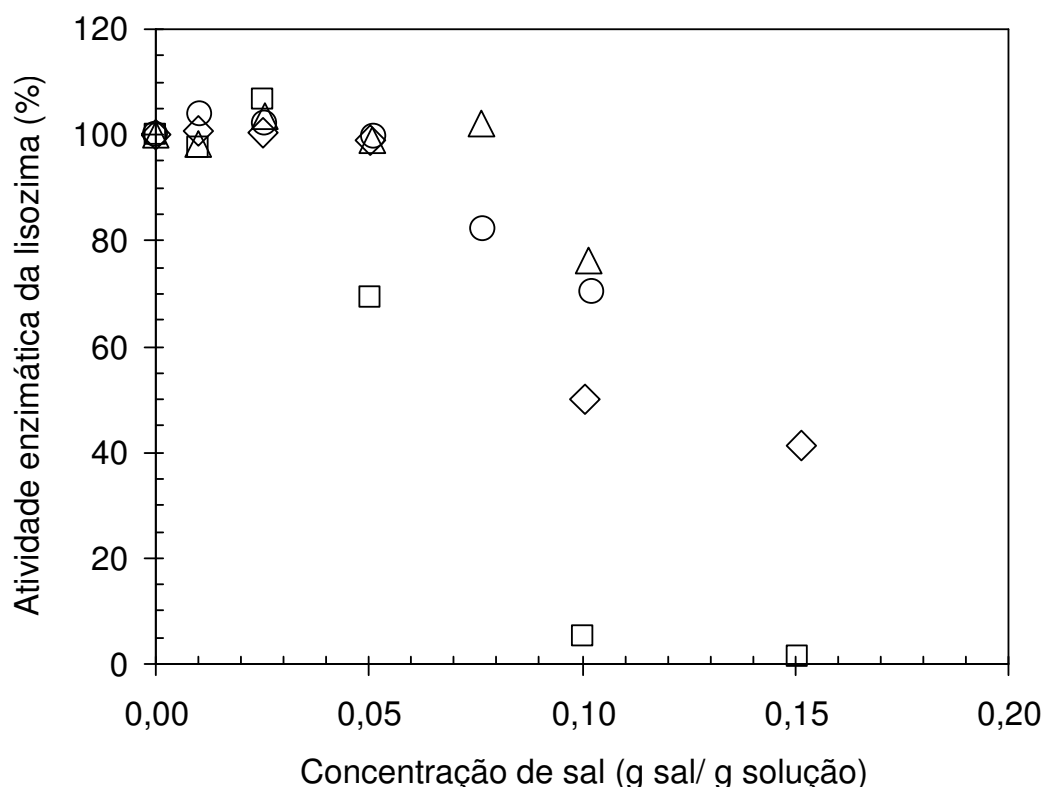


Figura A5.2: Influência dos sais sulfato de amônio (◇), sulfato de sódio (△), cloreto de sódio (○) e carbamato de amônio (□) na atividade da lisozima utilizando o substrato *Micrococcus lysodeikticus* como substrato a 25,0°C. Concentração de lisozima: 0,10 mg/mL em tampão fosfato de potássio 0,066 mol/L pH 6,24.

Observou-se que com o aumento da concentração de sal, ocorre uma redução da atividade específica da lisozima. Para concentrações de sal iguais e acima de 0,10 g de sal/g de solução, a perda de atividade da proteína é acentuada: no caso do sal volátil carbamato de amônio, a lisozima apresenta uma atividade específica de aproximadamente 1,5% quando comparada à atividade da solução de lisozima sem a presença do sal. Desta maneira, para evitar a influência dos sais nos ensaios de atividade da lisozima na fase sobrenadante e no precipitado, diluições foram feitas para se alcançar uma concentração de sal inferior a 0,05 g de sal/g de solução.