



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

JULIANO SABEDOTTI DE BIAGGI

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SEMEADURA NA PRECIPITAÇÃO DE
PROTEÍNAS EM SISTEMAS COMPLEXOS

SEEDING IN BULK PROTEIN PRECIPITATION

CAMPINAS

2018

JULIANO SABEDOTTI DE BIAGGI

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SEMEADURA NA PRECIPITAÇÃO DE
PROTEÍNAS EM SISTEMAS COMPLEXOS

SEEDING IN BULK PROTEIN PRECIPITATION

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Coorientador: Prof. Dr. André Bernardo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
JULIANO SABEDOTTI DE BIAGGI, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. EVERSON ALVES MIRANDA

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 134828/2016-0; FAPESP, 2016/21417-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

D35a	De Biaggi, Juliano Sabedotti, 1991- Aplicação da técnica de semeadura na precipitação de proteínas em sistemas complexos / Juliano Sabedotti De Biaggi. – Campinas, SP : [s.n.], 2018. Orientador: Everson Alves Miranda. Coorientador: André Bernardo. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. 1. Precipitação. 2. Lisozima. 3. Etanol. 4. Semeadura. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Bernardo, André. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.
------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Seeding in bulk protein precipitation **Palavras-chave em inglês:**

Precipitation

Lysozyme

Ethanol

Seeding

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Everson Alves Miranda [Orientador]

Marcelo Martins Seckler

Luis Fernando Mercier Franco

Data de defesa: 31-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por **Juliano Sabedotti De Biaggi**, aprovada em 31 de julho de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores

Prof. Dr. Everson Alves Miranda – FEQ/UNICAMP

Presidente da Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luís Fernando Mercier Franco – FEQ/UNICAMP

Membro Titular

Prof. Dr. Marcelo Martins Seckler – USP

Membro Titular

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do discente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado tantas pessoas especiais no meu caminho desde o dia que pus meus pés em Campinas.

Ao professor Everson, por ter me recebido de braços abertos no meu retorno ao mestrado e por ter sido um orientador exemplar durante toda a sua duração.

Ao professor André, pela coorientação deste trabalho, estando sempre disponível para contribuir com seu conhecimento da área.

Aos professores Gisele Atsuko, Luis Fernando Franco e Marcelo Seckler pelas sugestões de aprimoramento deste trabalho dadas nas suas participações no meu exame de qualificação e/ou na minha defesa de mestrado, e aos professores Roniérík Vieira, Mariana Conceição e Érika Watanabe por aceitarem ser os membros suplentes das minhas bancas.

Às professoras Sônia Bueno e Ângela Moraes por sempre disponibilizarem a infraestrutura de seus laboratórios para a realização de meus experimentos.

Aos meus colegas de laboratório Cristiane, Helberth, Luísa, Marina, Moysés, Rafael e Rodrigo, pelo ótimo ambiente de trabalho do LEBp e pelas conversas científicas informais, sempre muito enriquecedoras.

A todo(a)s o(a)s funcionário(a)s da FEQ-Unicamp, pelo serviço que prestam, em especial à Val, pelo zelo que tem pelo Bloco C, e à Maria Teresa, por toda a ajuda que me deu com as burocracias da vida de pós-graduando.

A todos o(a)s amigo(a)s que fiz em Campinas, em especial ao Antônio Gasperini, que, mesmo sem saber, me abriu os olhos para a beleza da carreira de pesquisador.

À minha namorada e melhor amiga Bia, por todo o amor e carinho e pelo companheirismo nos momentos bons e ruins.

Aos meus pais, Maria Lúcia e Eduardo, por toda a dedicação que deram a mim não só ao longo do mestrado, mas de toda a minha vida.

À Fapesp e ao CNPq, pelo suporte financeiro ao trabalho.

RESUMO

Precipitação de proteínas é uma operação dirigida pela supersaturação, resultando na agregação e sedimentação de proteínas em solução, comum nas etapas iniciais do trem de recuperação e purificação de proteínas. A cristalização, também presente em biosseparações, é regida pelo mesmo princípio, porém é projetada para acontecer a supersaturações menores. A transição entre a etapa de nucleação e de crescimento de cristais é um processo difícil de ser atingido de maneira satisfatória. A adição de cristais previamente formados (sementes) à cristalização é uma prática comum que procura evitar a fase de nucleação e o melhor controle da morfologia e distribuição de tamanho dos novos cristais. No entanto, o uso de sementes na precipitação de proteínas é pouco estudado. Um estudo recente mostrou que esta técnica pode ser utilizada para aumentar a recuperação de enzimas em processos de precipitação. O objetivo deste trabalho foi utilizar sementes na precipitação de proteínas em um sistema composto por insulina, lisozima, albumina de soro bovino e tampão, visando estudar o efeito que a semeadura teria na recuperação de atividade enzimática e no hábito cristalino do precipitado. Estudos da solubilidade da insulina mostraram que a proteína apresenta um mínimo de solubilidade em sistema tampão-etanol, possível consequência de a mesma formar diferentes especiações de acordo com o meio em que se encontra. A solubilidade da lisozima e da albumina de soro bovino na sua mistura com tampão decresceu em relação a soluções binárias, tanto aquosas quanto alcoólicas. Este efeito foi possivelmente causado pela interação entre as proteínas em solução, provável consequência da diferença entre as cargas líquidas assumidas para cada proteína no pH selecionado. Os sólidos formados na precipitação das proteínas do sistema complexo com a adição etanol assumiram aspecto de líquido denso em microscopia, indicativo de que o mecanismo de nucleação ocorre em duas etapas. A adição de sementes de lisozima na precipitação com etanol do sistema com 13 mg/mL de proteína, ou diluído 74,6 vezes e dopado com lisozima, não teve efeito na recuperação de atividade enzimática. Foram levantadas três variáveis que podem influenciar a eficácia da semeadura na precipitação de proteínas: diferença entre a estabilidade termodinâmica do precipitado e da semente, concentração inicial de proteínas do sistema complexo e cinética de precipitação.

Palavras-chave: Precipitação; proteínas; etanol; semeadura

ABSTRACT

Protein precipitation relies on a supersaturation driving force, which promotes protein aggregation and sedimentation. It is a unit operation often used at the beginning of protein recovery and purification processes. Crystallization (formation of a solid phase with a well-defined tridimensional shape) also used on bioproduct downstream processing, relies on the same principle, but it is designed to work on a different region of a proteins phase diagram where supersaturation is lower. The transition between crystal formation (nucleation) and crystal growth steps is not easily achieved. A common practice in crystallization is to add previously formed crystals to it to avoid the nucleation phase, and better control crystal shape and size distribution. However, studies of the use of seeds in protein precipitation are scarce. A recent study found that it can increase enzyme recovery in protein precipitation. This project intends to analyze the effect of seeding on yield, purity and precipitate morphology when applied to bulk protein precipitation in a system composed by lysozyme, insulin, bovine serum albumin, phosphate buffer and ethanol. Solubility studies showed that insulin has a solubility minimum in a buffer-ethanol mixture, possibly due to the multiple associated states it can form in solution. Also, the solubility of each selected protein, in the absence or presence of ethanol, was deeply reduced upon their mixing, possibly caused by them interacting with each other, which may be caused by them having opposed charges in the chosen pH. Ethanol bulk protein precipitation yielded solids that turned into a dense liquid phase when analyzed under the microscope, which indicates that precipitates were formed by two-step nucleation mechanism. The addition of lysozyme seeds to the ethanol precipitation of either a 13 mg/mL protein solution or the same solution diluted 74,6 times doped with lysozyme showed no increase in enzyme activity's recovery yield. Three variables may explain how seeding impacts protein precipitation: discrepancies between precipitate and seed thermodynamic stability, too high initial protein concentration or precipitation kinetics.

Keywords: Precipitation; proteins; ethanol; seeding

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Atividade termodinâmica
a^*	Atividade termodinâmica na saturação
A	Fator pré-exponencial
A_s	Área superficial
c	Concentração do soluto em solução
c_i	Concentração do soluto na interface na interface
c^*	Concentração molar do soluto em solução na saturação
D	Difusividade mássica
C_s	Razão de semeadura
C_1	Concentração do soluto na fase densa
f_D	Fator de diluição
G	Energia de Gibbs
G_c	Energia de Gibbs crítica
$G_{c,hetero}$	Energia de Gibbs crítica da nucleação heterogênea
$G_{c,homo}$	Energia de Gibbs crítica da nucleação homogênea
$G_{c,2}$	Energia de Gibbs crítica na fase densa
J	Taxa de formação de um novo núcleo
k	Constante de Boltzmann
k_d	Constante de difusão
k_i	Constante de integração
k_2	Constante de taxa
K_G	Coeficiente geral de crescimento

L_{prod}	Dimensão característica final do cristal
L_{seed}	Dimensão característica inicial da semente
m	Massa de sólidos
m_c	Massa do cristal ou precipitado
m_{seed}	Massa das sementes
r	Raio do aglomerado
r_c	Raio crítico
R	Constante dos gases ideais
S	Razão de supersaturação
t	Tempo
T	Temperatura
V_m	Volume molecular do soluto
γ	Coeficiente de atividade
γ_s	Tensão superficial
γ^*	Coeficiente de atividade na saturação
δ	Espessura da camada limite
ε_2	Fração volumétrica da fase densa
η	Viscosidade da fase densa
θ	Ângulo de contato
μ	Potencial químico
σ	Supersaturação relativa
φ	Molhabilidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Aspectos gerais na precipitação de proteínas	12
1.2. Semeadura na cristalização e precipitação de proteínas	15
1.3. Colocação do problema	17
1.4. Objetivo	18
1.5. Estratégia	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Proteínas	21
2.1.2. Fatores que afetam a solubilidade de proteínas	22
2.1.2.1.1. Efeito de antissolventes na solubilidade de proteínas	23
2.1.2.1.2. Determinação da solubilidade de proteínas	24
2.1.3. Propriedade das proteínas estudadas	25
2.2. Teoria geral de precipitação e cristalização	27
2.2.1. Supersaturação	27
2.2.2. Nucleação	28
2.2.2.1. Nucleação primária	28
2.2.2.2. Nucleação em duas etapas	31
2.2.2.3. Nucleação secundária	32
2.2.3. Crescimento	32
2.2.4. Semeadura	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. Seleção de proteínas para composição do mix proteico	36
3.2. Cinética da precipitação da lisozima com etanol	37
3.3. Curva de solubilidade de cada proteína em solução tampão-etanol	38
3.4. Precipitação de solução de lisozima de alta pureza com semeadura	39
3.5. Preparo e caracterização do mix proteico	40
3.6. Precipitação da lisozima em mix proteico em volume constante	41
3.7. Determinação do ponto de turvação visual	42
3.8. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza	42
3.9. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza em diferentes concentrações de etanol	43
3.10. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente na forma de precipitado	44

3.11.	Determinação dos limites de turvação e de saturação do mix diluído e dopado com lisozima	44
3.12.	Precipitação de mix proteico diluído dopado com lisozima e semente de lisozima precipitada	45
3.13.	Métodos analíticos	46
3.13.1.	Análise de precipitados por microscopia ótica	46
3.13.2.	Análise de atividade de lisozima	47
3.13.3.	Análise de concentração de proteínas por A_{280}	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1.	Seleção de proteínas para composição do mix proteico	49
4.2.	Cinética da precipitação da lisozima	50
4.3.	Curvas de solubilidade das proteínas	52
4.4.	Precipitação de solução de lisozima de alta pureza com semeadura	56
4.5.	Caracterização do mix protéico por SDS-PAGE	58
4.6.	Precipitação da lisozima em mix proteico em volume constante.....	59
4.7.	Determinação do ponto de turvação visual	63
4.8.	Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza.....	64
4.9.	Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza em diferentes concentrações de etanol	68
4.10.	Precipitação da lisozima de mix proteico com semente na forma de precipitado	73
4.11.	Determinação dos limites de turvação e de saturação do mix diluído e dopado com lisozima	76
4.12.	Precipitação de mix proteico diluído dopado com lisozima e semente de lisozima precipitada	77
5.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
5.1.	Conclusões.....	81
5.2.	Sugestões para trabalhos futuros	82
6.	REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais na precipitação de proteínas

Das macromoléculas produzidas por processos biotecnológicos, o grupo das proteínas destaca-se pela sua ampla gama de aplicações – desde enzimas presentes em produtos de limpeza aos peptídeos terapêuticos usados no tratamento de doenças raras – e pelo mercado bilionário que movimenta (HARRISON et al., 2015). Segundo MarketsAndMarkets (2014), este mercado pode atingir cerca de U\$ 1,4 bilhão em 2018. Para cada aplicação existem requisitos a serem obedecidos no que tange à quantidade de proteína a ser utilizada (miligramas ou quilogramas), sua concentração, sua atividade biológica e sua pureza (BURGESS; DEUTSCHER, 2009). Como exemplo, estudos sobre estrutura de proteínas demandam pequenas quantidade de cristais de alta pureza (CHAYEN; SARIDAKIS, 2008), enquanto proteínas extraídas do soro do leite bovino usadas na suplementação alimentar podem apresentar purezas de 35-85% do total de sólidos (DE WIT, 1990).

Proteínas produzidas por cultivo de microrganismos ou por extração de fontes naturais (e.g., tecidos animais ou de plantas) estarão inicialmente em meios com uma série de impurezas e deverão passar por etapas de recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) para atingir as condições ideais para seu uso. Existem diversas operações unitárias aplicáveis em RPB (BURGESS; DEUTSCHER, 2009; SCOPES, 2007), porém não se costuma obter frações proteicas de alta pureza utilizando-se estas operações isoladamente (LOUREIRO, 1991).

A precipitação é uma operação unitária bem conhecida e amplamente utilizada na recuperação (conjunto de operações que objetiva preparar uma fração contendo o bioproduto alvo para as etapas de separação que elevarão significativamente sua pureza) de proteínas de caldos de cultivo e extratos celulares (DORAN, 2013). Ela tem como objetivo principal de reduzir o volume a ser processado nas etapas subsequentes, mas também é capaz de atingir algum grau de purificação do produto de interesse (HARRISON et al., 2015). O princípio da precipitação de proteínas consiste em reduzir a solubilidade da biomolécula de interesse através de

alterações nas propriedades do solvente (composição, pH, força iônica ou temperatura) no qual ela se encontra até que a mesma atinja um nível de supersaturação que provoque a formação espontânea de aglomerados proteicos passíveis de serem separados do meio em que estão presentes por centrifugação a forças g (aceleração relativa à gravidade na superfície da Terra) relativamente baixas (SCOPES, 2013) ou filtração.

Outra operação unitária utilizada na recuperação de proteínas é a cristalização. Tal como na precipitação, na cristalização também ocorre a formação de partículas sólidas a partir de uma solução supersaturada, porém o produto da cristalização possui dimensões bem definidas, geralmente é de maior tamanho e possui alta pureza (DORAN, 2013; SCOPES, 2007). Esta diferença ocorre, pois na cristalização a supersaturação do meio é controlada e mantida em níveis mais baixos comparados aos da precipitação, o que reduz a taxa de nucleação, favorecendo assim o crescimento dos cristais formados (HARRISON et al., 2015). A formação de novos cristais ocorre na chamada zona lábil do diagrama de fases da proteína, enquanto seu crescimento ocorre tanto na zona lábil quanto na chamada zona metaestável (Figura 1).

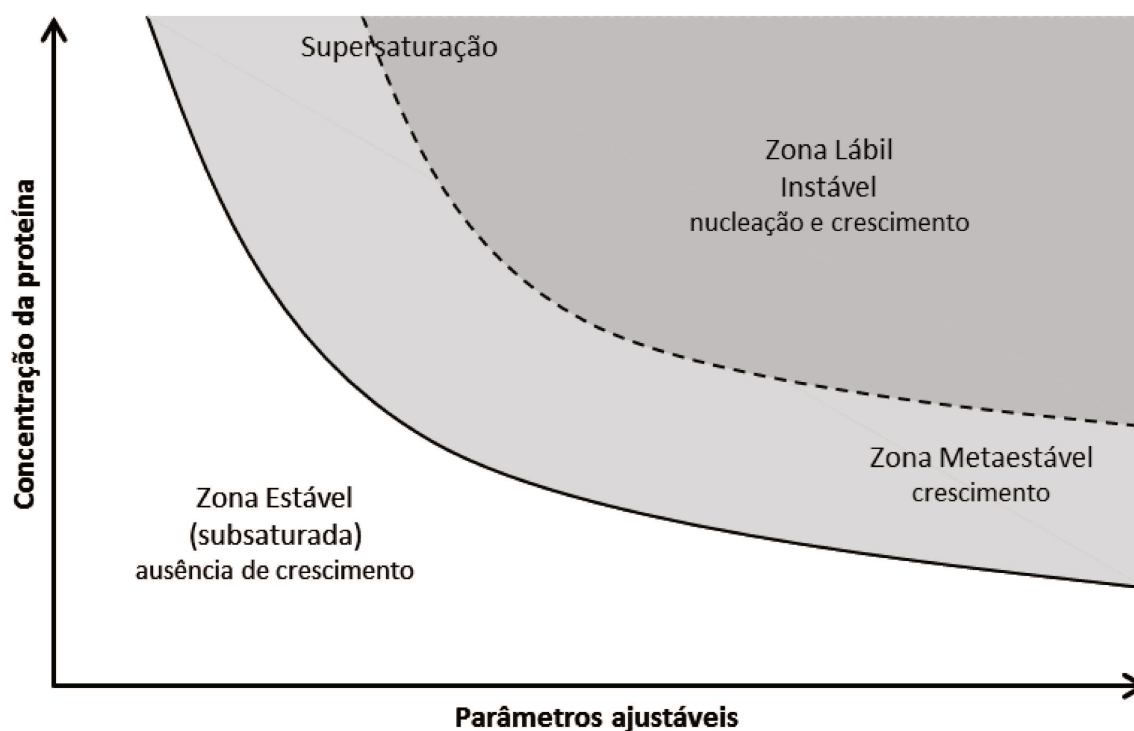


Figura 1 - Diagrama de fases genérico de proteína. Adaptado de MYERSON (2002).

Nos processos de cristalização em batelada, a solução com o produto tem sua solubilidade reduzida até atingir a zona lábil, na qual ocorrerá a formação de novos cristais (nucleação primária). Conforme os novos cristais vão crescendo, a concentração do produto na solução diminui até ela retornar para a zona metaestável do diagrama de fases, na qual os cristais formados continuarão a crescer, podendo haver formação de novos núcleos provenientes de cristais maiores (nucleação secundária). Uma vez atingida esta região do diagrama de fases, a supersaturação pode ser controlada até que os cristais atinjam tamanho desejado, desde que não haja nucleação secundária.

O foco da maioria dos trabalhos publicados sobre cristalização de proteínas está na produção de cristais de alta qualidade para estudos de cristalografia e, recentemente, com alguns poucos casos bem sucedidos da aplicação da técnica de cristalização preparativa voltada para produção industrial (HEKMAT, 2015; RUSSEL; WANG; RATHORE, 2007), partindo de soluções proteicas de alta pureza. Ainda partindo de soluções de alta pureza, também se encontram múltiplos estudos de diversos aspectos do fenômeno de cristalização em si, usando muito comumente proteínas modelo como a lisozima. Há trabalhos que estudam a influência de impurezas na cristalização (LORBER et al., 1993), cinéticas de nucleação, crescimento de cristais e de equilíbrio (LIU; WANG; CHING, 2010; TALEB et al., 2001), interações proteína-proteína (BONNETE; FINET; TARDIEU, 1999; LIU; WANG; CHING, 2010) entre outros.

Também existem casos em que esta operação unitária é utilizada na purificação de enzimas presentes em sistemas complexos (não binários). Como exemplo, cristais de ovalbumina com pureza superior a 99% foram obtidos a partir de uma solução da proteína contaminada com lisozima e conalbumina, sem que houvesse alteração na taxa de crescimento dos cristais comparado à cristalização com ovalbumina de alta pureza (JUDGE; JOHNS; WHITE, 1995). Outro grupo de pesquisa estudou a influência de impurezas (ovalbumina, conalbumina e avidina) na cristalização de lisozima. A presença de impurezas não alterou a solubilidade da lisozima nem a pureza dos cristais gerados, no entanto, a ovalbumina cessou o crescimento dos cristais de lisozima (JUDGE; FORSYTHE; PUSEY, 1998). Jacobsen, Garside e Hoare (1998) observaram a dependência exponencial das taxas de nucleação e crescimento de cristais em relação ao grau de supersaturação (potências

de 11 e de 6, respectivamente) na cristalização da enzima lipase presente em caldo fermentado clarificado. Outro exemplo de purificação de enzimas em sistemas complexos: ao submeter 408 frações proteicas do proteoma de *Escherichia coli*, com purezas variando de 5 a 95%, a uma triagem de condições de cristalização de alto processamento, pesquisadores foram capazes de obter cristais de 295 delas (TOTIR et al., 2012). Já foram também obtidos cristais de sete proteínas diferentes provenientes de extratos de bastonetes (células responsáveis pela detecção da luz na retina dos olhos de vertebrados) bovinos, através do uso de diversos agentes precipitantes, tais como sulfato de amônio e polietileno glicol (BAKER et al., 2015).

1.2. Semeadura na cristalização e precipitação de proteínas

Na cristalização, o crescimento ordenado de cristais ocorre em condições de supersaturação desfavoráveis para o surgimento de novos cristais por mecanismo de nucleação primária (BERGFORS, 2003). Neste tipo de operação, o controle da supersaturação e da nucleação durante seus estágios iniciais e o estabelecimento de condições ideais para que o produto atinja uma distribuição de tamanho desejada são desafios a serem superados (MYERSON, 2002). Essas dificuldades podem ser superadas através da adição de cristais já formados – chamados de sementes – na zona metaestável, na qual ocorrerá o crescimento destes cristais (MYERSON, 2002) sem a necessidade de o sistema passar pela etapa de nucleação. Este procedimento é conhecido como semeadura.

Dentre as múltiplas técnicas para realização de semeadura listadas por Bergfors (2003) está a utilização dos cristais gerados em uma primeira batelada de cristalização como sementes na batelada de cristalização seguinte e assim por diante (os cristais da batelada “n” sendo utilizados como sementes na batelada “n+1”) até que cristais de melhor qualidade sejam obtidos. Tal técnica é conhecida como semeadura em série. Como exemplo da eficiência desta técnica, Thaller et al. (1985) obtiveram um aumento de três ordens de magnitude no tamanho de cristais de InGP sintase após 10 rodadas de semeadura. Vale também citar, a título de exemplo, que após duas rodadas de semeadura Rouvinen et al. (1990) reduziram o tempo de cristalização da enzima celobiohidrolase 2 de um mês para uma semana, obtendo cristais de até 2 mm de comprimento.

A técnica de sementeira também é utilizada para cristalizar proteínas em sistemas complexos. Carbone *et al.*, (2005) observaram que a velocidade de crescimento mássico de cristais de ovalbumina é diretamente proporcional à massa de sementes utilizada. Também existem relatos do uso de sementeira na cristalização de subtilisina presente em caldo fermentado (BECKER; LAWLIS, 1990). Neste trabalho, o fermentado de *Bacillus subtilis* teve suas células removidas e foi submetido a uma ultrafiltração para que a enzima ficasse em uma concentração de pelo menos 40 g/L. A cristalização deu-se pela adição de NaCl como agente indutor. A adição de sementes reduziu o tempo médio da operação de 48 para 18 h, além de ter aumentado o rendimento: a adição de 1% (v/v) de sementes em uma solução com 69 g/L da enzima com 400 mmol/L de NaCl aumentou a recuperação de atividade enzimática de 41% para 78% (BECKER; LAWLIS, 1990).

O uso de sementeira para melhoria no desempenho de precipitações também acontece, uma vez que este processo é favorecido pela mesma força motriz (supersaturação). Há trabalhos sobre o uso de sementes na precipitação dos minerais jarosita (DUTRIZAC, 1996, 1999; LI; YANG; CHEN, 2016), hidroxiapatita (MORENO et al., 1977) e estruvita (DURRANT et al., 1999). Neles a sementeira foi utilizada para viabilizar a precipitação e/ou aumentar sua velocidade; em alguns deles também foram observados maiores rendimentos. A sementeira também é utilizada na precipitação de compostos presentes em efluentes industriais (CHEN et al., 2009; FENG; ALDRICH; TAN, 2000; MBAMBA et al., 2015).

No campo de moléculas orgânicas, Koyama et al. (2016) estudaram os efeitos da presença de sementes na precipitação de fármacos compostos por bases fracas (dipiridamol, pioglitazona, topiroxostat, cloropromazina, cinarizina e cetoconazol) em condições que simulam o ambiente intestinal. Tais drogas são mais solúveis no ambiente estomacal (ácido) e quando passam para um pH alcalino, como o do intestino, tendem a precipitar. Ao estudar essa transição, os pesquisadores observaram que a adição de sementes na condição de pH alcalino resultou, na maioria dos casos, em um decréscimo na concentração máxima atingida pelo fármaco na fase líquida ao longo do tempo. Os autores também observaram que a concentração de equilíbrio da maioria das drogas no ambiente intestinal simulado foi atingida mais rapidamente na presença de sementes.

Em trabalho realizado recentemente no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp – FEQ) da Unicamp, Costa (2016) utilizou a técnica de semeadura (isoladamente e em série) na precipitação etanólica de xilanases de caldos de cultivo de *Aspergillus niger* (a concentração inicial de proteínas no caldo era de 0,11 mg/mL), trabalho até então sem paralelos na literatura. O autor realizou duas bateladas de precipitação com semeadura, sendo que na segunda foi utilizada uma semente proveniente da primeira batelada. Os desempenhos dessas precipitações em diversas concentrações de etanol, fazendo uso de 1,5% e 3% de sementes (porcentagem relativa às massas de proteínas presente na solução a ser precipitada), foram comparados com o processo de precipitação padrão sem a técnica de semeadura. Testes comparando o desempenho da adição de sementes em concentrações de etanol pouco acima e pouco abaixo do ponto de turvação causado pela adição do agente precipitante também foram realizados. Tanto nas precipitações com 1,5% de sementes quanto nas com 3%, houve aumento na recuperação de atividade xilanásica ao utilizar concentrações de etanol acima de 70% em comparação com o processo controle, com melhorias que chegaram a 21% (na condição em que 1,5% de sementes foram adicionadas abaixo do ponto de turvação e a concentração de etanol foi elevada até 85%), sem contudo apresentar um aumento na recuperação de proteínas, o que implica que o precipitado obtido pelo autor nessas condições apresentou maior atividade específica, portanto, maior pureza. Os resultados de recuperação de atividade enzimática foram ligeiramente melhores quando a semente foi adicionada abaixo do ponto de turvação. A atividade xilanásica específica do precipitado gerado na segunda batelada de precipitação foi 73,5% maior do que a semente utilizada (proveniente da primeira batelada de precipitações), o que indica que o uso da técnica de semeadura em série para precipitação de proteínas de fermentados pode gerar sólidos de maior pureza a cada etapa.

1.3. Colocação do problema

Embora haja estudos sobre uso de sementes tanto em precipitação (de compostos não proteicos) quanto em cristalização que mostrem que semeadura possa ser utilizada com sucesso (CARBONE; JUDGE; ETZEL, 2005; COSTA, 2016; RUSSEL; WANG; RATHORE, 2007), a carência de informações sobre o assunto na

sua aplicação para recuperação de proteínas ainda é muito grande, sobretudo em sistemas em que elas estão acompanhadas de impurezas (sistemas complexos), que é o caso mais comum em operações industriais. Pouco se sabe sobre as melhorias no rendimento (em termos de recuperação de atividade enzimática) e pureza (maior atividade específica) que a sementeira na precipitação de proteínas pode trazer e quais são as condições para que essas elas aconteçam. Tampouco se conhecem características do precipitado proteico formado a partir da aplicação dessa técnica, tal como seu hábito cristalino.

1.4. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi utilizar sementes na precipitação de proteínas em um sistema proteico complexo artificial (modelo), visando estudar o efeito que a sementeira teria na pureza (atividade específica), na recuperação de atividade enzimática e no hábito cristalino do precipitado. Assim, este estudo visou contribuir com informações úteis para a avaliação da eficácia dessa técnica para que ela possa ser utilizada de maneira racional na recuperação e purificação de proteínas.

1.5. Estratégia

O fluxograma com a interligação entre os experimentos realizados está ilustrado na Figura 2.

O primeiro passo foi definir quais seriam as proteínas constituintes do sistema complexo modelo a ser estudado (I), aqui chamado de mix proteico. Foram selecionadas proteínas que, em gel de eletroforese SDS-PAGE, apresentassem alta pureza, fossem de massa moleculares diferentes entre si e inferiores a 100 kDa (limite superior do marcador de baixa massa molecular utilizado na eletroforese) e fossem acessíveis (em estoque no LEBp ou para compra a custos viáveis). As proteínas que atenderam a esses critérios foram a insulina suína, a albumina de soro bovino (BSA) e a lisozima de clara de ovo. A última foi selecionada como proteína alvo dos estudos de precipitação por ser uma proteína amplamente estudada e por apresentar atividade enzimática passível de ser medida. O etanol foi escolhido como agente precipitante por dispensar o uso de diálise para sua remoção do precipitado, caso o mesmo fosse

utilizado na técnica de sementeira em série. Tal etapa seria necessária caso se optasse pela precipitação saís, por exemplo.

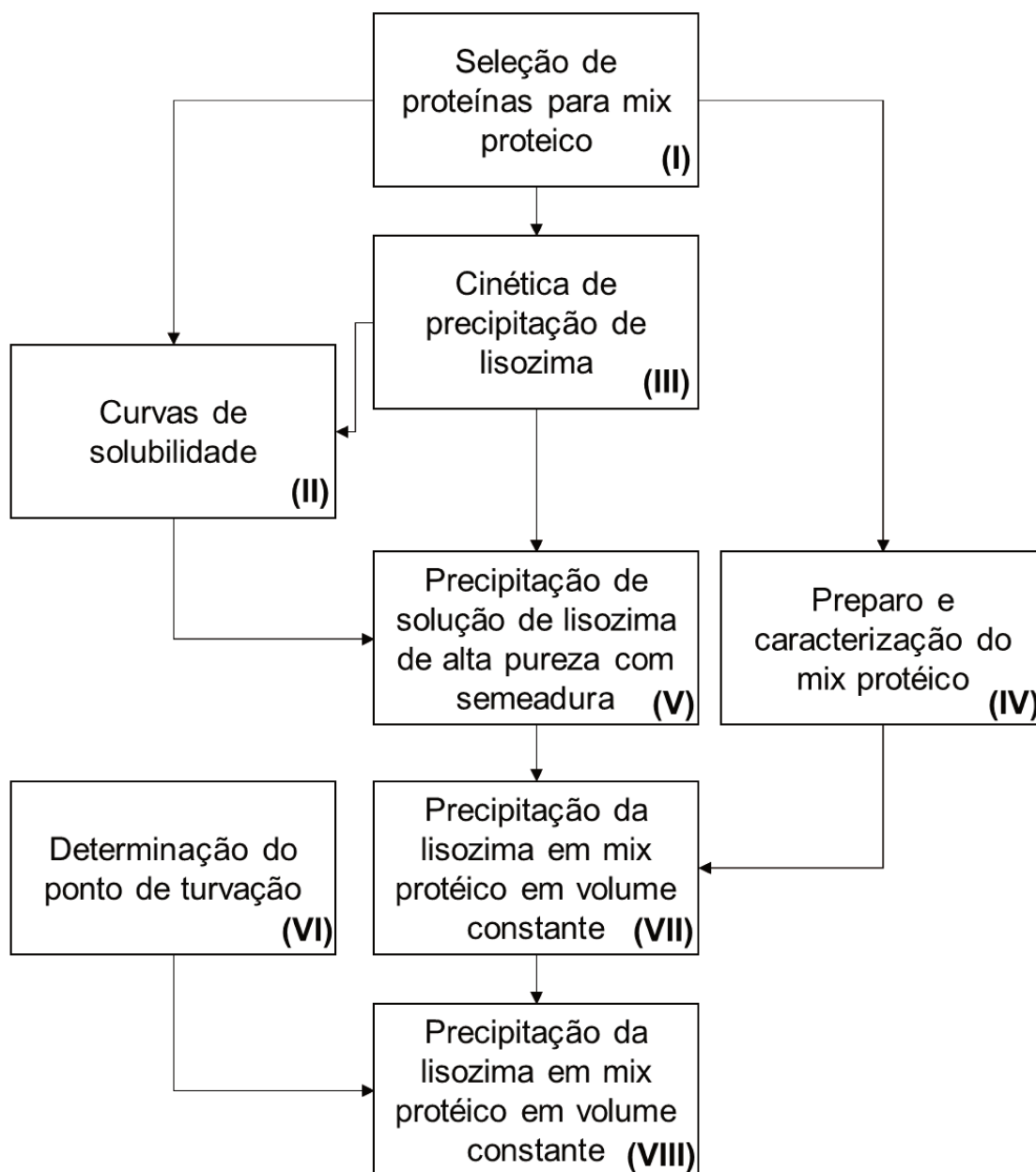


Figura 2 – Fluxograma dos experimentos realizados

O próximo passo foi estudar a cinética de precipitação etanólica da lisozima isoladamente, para determinar a duração dos ensaios de precipitação posteriores (III). A curva de solubilidade de cada proteína em diferentes concentrações de etanol foi determinada (II) para melhor compreensão do comportamento de cada uma no sistema. Um último teste de precipitação de uma solução de lisozima isolada com

semeadura (V) foi feito como piloto para os ensaios de precipitação do mix proteico utilizando a mesma técnica.

As primeiras precipitações do mix tiveram o objetivo de avaliar o comportamento de suas proteínas em diferentes concentrações de etanol e determinar o seu ponto de turvação (VII). Por fim, a influência da adição de uma semente de alta pureza na precipitação da lisozima do mix a diferentes diluições e a diferentes concentrações de etanol (VIII) foi avaliada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteínas

O nome proteína costuma ser dado para polipeptídios com massa molecular superior a 10.000 Da (NELSON; COX, 2009), pois massas moleculares superiores a essa já assumem estrutura tridimensional definida, valor que pode atingir a casa de milhões. A sequência de resíduos de aminoácidos de uma proteína corresponde à sua estrutura primária. A estrutura secundária consiste de conformações estáveis formadas por interações não covalentes entre os resíduos de uma mesma proteína. A estrutura terciária trata de todos os aspectos tridimensionais assumidos no enovelamento da proteína. Proteínas que possuem mais de uma unidade polipeptídica também possuem uma estrutura quaternária. Além da estrutura, outra característica que permite distinguir proteínas é o seu ponto isoelétrico (pI), que é o pH característico de cada proteína na qual sua carga líquida é igual a zero.

2.1.1. Enzimas e atividade enzimática

Algumas proteínas possuem atividade catalítica e são conhecidas como enzimas. Por possuírem tal propriedade, as enzimas podem ser quantificadas através da medição de seu efeito catalítico, ou seja, o aumento na taxa de conversão do substrato em produto (NELSON; COX, 2009). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida, por convenção internacional, como a quantidade de enzima capaz de catalisar a conversão de substrato em produto a uma taxa de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (NC-IUB, 1978). Como reações enzimáticas costumam acontecer em meio aquoso, é comum expressar a atividade por unidade de volume (U/mL). A atividade demonstrada em 1 mg de proteína, ou atividade específica (U/mg), é uma grandeza muito utilizada como medida de pureza.

2.1.2. Fatores que afetam a solubilidade de proteínas

A solubilidade de proteínas é uma função complexa de parâmetros ambientais (pH, temperatura, natureza dos sais e/ou solventes orgânicos presentes e sua concentração) e da própria natureza física e química da proteína (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985). Em solução aquosa, proteínas em seu estado nativo assumem uma conformação que visa minimizar o contato de seus resíduos de aminoácido hidrofóbicos com as moléculas de água, de maneira que sua superfície fica preferencialmente coberta por resíduos polares e carregados (HARRISON et al., 2015). As moléculas de água se associam a esses resíduos polares, ao mesmo tempo que participam da imobilização dos grupamentos apolares que estiverem expostos na superfície da proteína, formando uma camada de hidratação capaz de manter as moléculas distantes umas das outras, promovendo a solubilização proteica (HARRISON et al., 2015).

Considerando a possível variação de pH do meio, a proteína costuma apresentar seu mínimo de solubilidade em água no seu pI, uma vez que, neste ponto, as forças de repulsão eletrostática são minimizadas, o que permite que duas moléculas de proteína se aproximem e se atraiam por interações hidrofóbicas ou forças de van der Waals. A influência do pH na solubilidade vai se tornando menos significativa conforme ele vai se afastando do pI (MYERSON, 2002). A adição de eletrólitos em baixas concentrações pode aumentar a solubilidade de proteínas através de interações eletrostáticas não específicas (TANFORD, 1961), dependentes somente da força iônica do meio, fenômeno conhecido como *salting-in*. Com o aumento da concentração de eletrólitos, seus íons tendem a reduzir a água de solvatação disponível na proteína, o que acaba expondo seus sítios hidrofóbicos para interações proteína-proteína (SCOPES, 2007), reduzindo sua solubilidade, fenômeno conhecido como *salting-out*.

Polímeros sintéticos solúveis, como o polietileno glicol (PEG) também podem reduzir a solubilidade de proteínas. O mecanismo mais aceito para este fenômeno é a exclusão estérica, na qual o polímero desloca fisicamente as moléculas de solvente que estão em contato com a superfície da proteína (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985). Um aumento na temperatura do sistema pode aumentar, diminuir, ou não ter efeito sobre a solubilidade de proteínas (CHRISTOPHER; PHIPPS; GRAY, 1998; MYERSON, 2002).

Shih (1992), embasado por pesquisas anteriores (HARDY, 1905; MELLANBY, 1905) e no seu trabalho em precipitação com sais, postulou que a solubilidade de algumas proteínas na presença de seu sólido depende de sua concentração inicial no sistema. Resultados análogos foram obtidos na precipitação de lisozima com etanol (PINHEIRO et al., 2016). O mecanismo pelo qual este fenômeno acontece ainda não é bem compreendido. Shiau (1997) propõe que, devido à taxa de crescimento dos núcleos ser maior do que a de surgimento de novos núcleos (NELSON; GLATZ, 1985), concentrações iniciais maiores irão formar sólidos maiores e em menor número, os quais terão uma área superficial relativa menor para deposição de moléculas de proteína, de maneira que a solubilidade cresça com o aumento da concentração inicial. Já Pinheiro (2016) atribui o aumento da solubilidade proporcional à concentração inicial devido à formação de um sólido de menor cristalinidade (ou de maior amorfia).

2.1.2.1.1. Efeito de antissolventes na solubilidade de proteínas

A adição de solventes orgânicos hidrossolúveis, ou antissolventes, por exemplo etanol e acetona, em soluções aquosas de proteínas resulta em múltiplos efeitos que, combinados, levam à redução da solubilidade de muitas destas macromoléculas. Estes solventes levam à redução da constante dielétrica da fase líquida, o que diminui sua capacidade de isolar cargas elétricas, aumentando a força de interação entre grupamentos polares das proteínas, o que causa sua agregação e, consequentemente, a redução de sua solubilidade (DORAN, 2013). Todavia, a redução da constante dielétrica possui um impacto pequeno na redução da solubilidade de proteínas na presença de solventes orgânicos, principalmente nas baixas temperaturas comumente utilizadas na precipitação de proteínas (OSS, 1989).

Solventes orgânicos também competem pela água de hidratação das proteínas, assim como fazem os eletrólitos (MYERSON, 2002), promovendo uma aproximação destas moléculas proteicas, que então podem se aglomerar pela ação das forças de van de Waals (HARRISON et al., 2015). No trabalho de van Oss (1989) este processo é considerado como majoritário na redução da solubilidade de proteínas.

Moléculas de solvente podem também penetrar a estrutura da proteína e competir pelas interações hidrofóbicas em seu interior, podendo desestabilizar sua

estrutura a ponto de levar à perda de sua funcionalidade, fenômeno conhecido como desnaturação proteica. Uma maneira prática de evitar a desnaturação por solventes orgânicos é manter a temperatura do sistema abaixo de 10°C, pois a baixas temperatura as proteínas possuem baixa flexibilidade conformacional, de maneira que a penetração de moléculas em seu interior se torna improvável (SCOPES, 2007).

Liu e colaboradores (2004) observaram que a adição de etanol a uma solução de lisozima até a concentração de 20% (v/v) e temperatura de 25°C resulta em um aumento das forças repulsivas entre as moléculas da enzima, possuindo, portanto, um efeito estabilizador a baixas concentrações do solvente. Este efeito se dá pela interação do etanol com os sítios hidrofóbicos na superfície da proteína, criando uma barreira física que dificulta que estes sítios interajam entre si (LIU et al., 2004). Através da análise de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS-s), Kundu e colaboradores (2017) observaram que, em concentrações de etanol de até 25%, as moléculas de BSA interagem entre si por uma combinação de repulsões de médio alcance e atrações fracas de longo alcance.

2.1.2.1.2. Determinação da solubilidade de proteínas

São dois os principais métodos para determinação da solubilidade de proteínas. O primeiro consiste em suspender sólidos, mais comumente cristais, de proteína em solução sob agitação contínua ou em leito fixo (CACIOPPO; MUNSON; LEE PUSEY, 1991), monitorando sua dissolução até que a concentração de proteínas na fase líquida na presença do seu sólido assuma um valor constante ao longo do tempo (se for atingido um estado de equilíbrio). O tempo para que este método atinja o equilíbrio varia tipicamente entre dois dias e uma semana (ASHERIE, 2004).

O outro método consiste em supersaturar uma solução de proteínas até que se formem os primeiros cristais, a partir de quando a concentração de proteínas na fase líquida na presença do seu sólido passa a ser monitorada por análises de teor de proteínas mais convencionais, como a proposta por Bradford (1976) ou por espalhamento de luz em tubos capilares (ROSENBERGER et al., 1993) até que seu valor se torne constante ao longo do tempo. O tempo de equilíbrio pode variar de poucos dias a até poucas semanas, segundo estudo redigido no LEBp-FEQ (dados não publicados). A incorporação de impurezas ou de moléculas de proteína imprópriamente orientadas à matriz do cristal pode estagnar o seu crescimento,

evitando que o equilíbrio verdadeiro seja atingido (ASHERIE, 2004). Para este caso, a agitação da solução pode causar a exposição de faces limpas dos cristais, permitindo que o crescimento continue e a verdadeira solubilidade seja atingida.

A solubilidade de proteínas também pode ser determinada por interferometria de feixe duplo (SAZAKI et al., 1996) ou ainda em filtro rotativo (HAIRE; BLOW, 2001), métodos que podem se basear tanto na solubilização quanto na precipitação de soluções proteicas, porém essas técnicas não serão discutidas no presente trabalho, pois as mesmas não foram utilizadas.

2.1.3. Propriedade das proteínas estudadas

A insulina é uma proteína globular constituída por duas cadeias polipeptídicas, tradicionalmente chamadas de cadeias A e B, unidas por três pontes dissulfeto (SLUZKY; LANGER, 1992). É um hormônio que participa da regulação do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. A massa molecular da insulina suína (utilizada neste trabalho) é de 5778 Da. Seu ponto isoelétrico é 5,3 (CONWAY-JACOBS; LEWIN, 1971).

A insulina é solúvel, na ausência de íons Zn^{2+} , em pH inferior a 4 e superior a 7 e, devido ao seu alto conteúdo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, em misturas homogêneas de água e solventes orgânicos, e.g., etanol a 50-70% (v/v) (BRANGE, 1987). Em pH neutro, a solubilidade da insulina dependerá da concentração de íons bivalentes e de sua origem (SCHLICHTKRULL, 1958). A insulina em solução coexiste na forma de monômeros, dímeros, tetrâmeros e hexâmeros, cujas proporções dependem da sua concentração, do pH da solução, da presença de íons divalentes, da concentração de sais e de solventes orgânicos (BRANGE, 1987). A Figura 3 resume quais especiações são encontradas em quais condições.

A lisozima de ovo de galinha é uma proteína que contém 129 resíduos de aminoácidos ordenados em cadeia única, interligados por quatro pontes dissulfeto (JOLLÈS, 1969). Sua função biológica é hidrolisar peptidoglicanos encontrados na parede celular de bactérias. Baseado na sequência de aminoácidos obtida por Canfield (1963), a massa molecular calculada da lisozima é de 14307 Da; já seu ponto isoelétrico é 11,35 (WETTER; DEUTSCH, 1951). O pH ótimo de catálise da lisozima é 6,2 (DAVIES; NEUBERGER; WILSON, 1969) e serve como referência para a

determinação de sua atividade enzimática. Por definição, uma unidade de atividade de lisozima produz uma alteração na absorbância de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* como substrato a 450 nm (caminho ótico de 1 cm) igual a 0,001/min a pH 6,24 e temperatura de 25 °C, em um volume de 2,6 mL (SIGMA-ALDRICH INC., 2008).

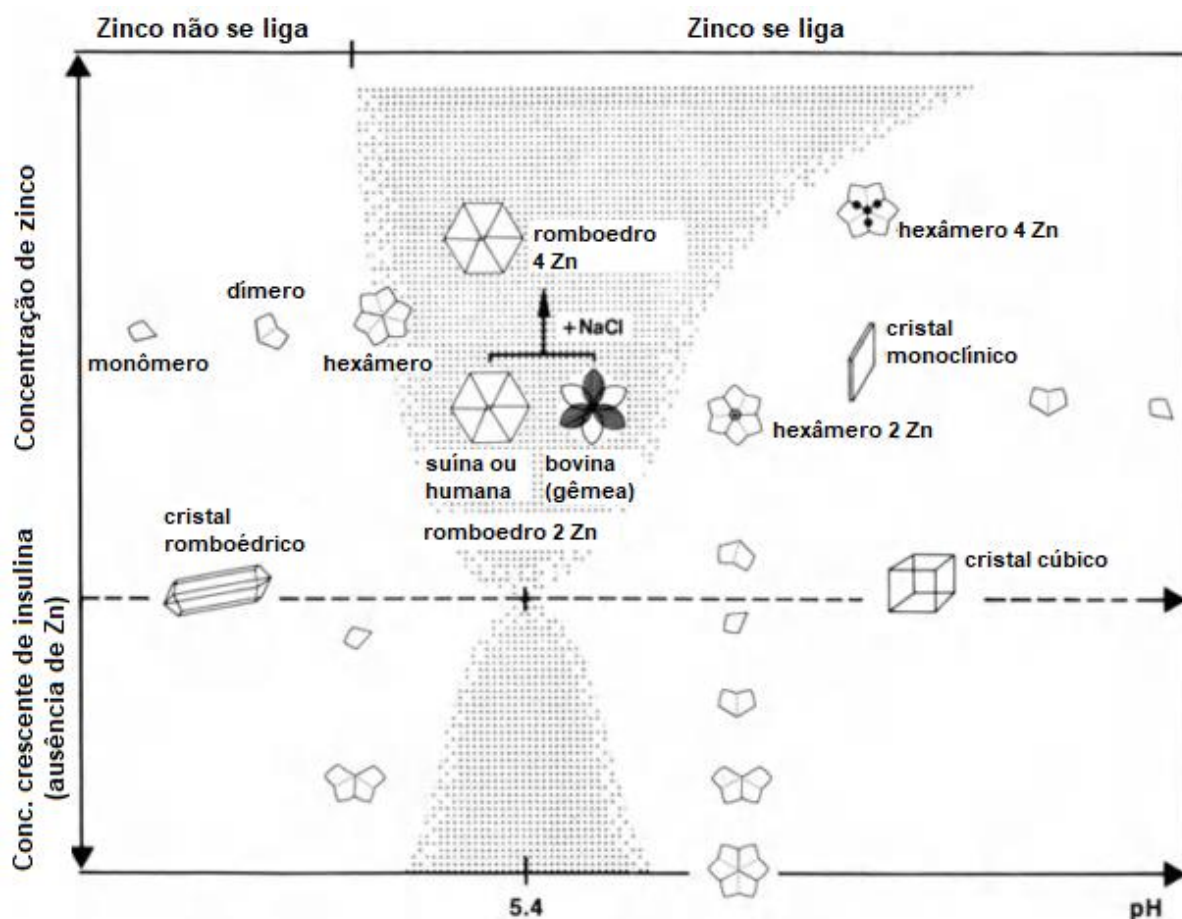


Figura 3 - Diagrama do comportamento de agregação e cristalização da insulina (adaptado de BRANGE, 1987). A área sombreada corresponde à zona de precipitação.

A albumina de soro bovino (BSA) é uma proteína de cadeia única contendo 583 resíduos de aminoácidos (massa molecular de 66430 Da), interligados por 17 pontes dissulfeto e um grupo sulfidril (HIRAYAMA et al., 1990; PUTNAM, 1984). Sua função principal é a regulação da pressão osmótica coloidal do plasma sanguíneo (SCOTT; MERCER, 1997). Seu *pI* é 4,9 (RADOLA, 1973). Devido à sua natureza ácida, é capaz de se ligar à água, íons cálcio, sódio e potássio e ácidos graxos, e

possui fendas hidrofóbicas que permite sua ligação com lipídeos (SIGMA-ALDRICH INC., 2000).

Sendo uma albumina, a BSA é altamente solúvel em água e só é precipitada com altas concentrações de sais neutros ou etanol (COHN et al., 1946; SIGMA-ALDRICH INC., 2000).

2.2. Teoria geral de precipitação e cristalização

2.2.1. Supersaturação

Uma solução é dita supersaturada quando a concentração do soluto excede sua solubilidade a uma dada temperatura. É a principal força motriz dos fenômenos de precipitação e cristalização (MYERSON, 2002) e pode ser expressa termodinamicamente através da diferença de potencial químico ($\Delta\mu$), como ilustrado na equação 2.1:

$$\frac{\Delta\mu}{RT} = \ln\left(\frac{a}{a^*}\right) = \ln\left(\frac{\gamma c}{\gamma^* c^*}\right) \quad (2.1)$$

em que c é a concentração molar do soluto em solução, a é sua atividade, γ é seu coeficiente de atividade, R é a constante dos gases, T é a temperatura e o asterisco (*) representa estas grandezas na saturação. Em sistemas em que a supersaturação não está longe do equilíbrio ($\gamma/\gamma^* \approx 1$), tais como sistemas diluídos, a equação 2.1 pode ser reescrita como:

$$\frac{\Delta\mu}{RT} = \ln(S) \quad (2.2)$$

$$S = \frac{c}{c^*} \quad (2.3)$$

em que S é a razão de supersaturação. Outra maneira comum de expressar a supersaturação é através da supersaturação relativa (σ), vide equação 2.4.

$$\sigma = \frac{c - c^*}{c^*} \quad (2.4)$$

A supersaturação é a condição básica para que dois fenômenos fundamentais da precipitação e cristalização ocorram: a nucleação e o crescimento de partículas.

2.2.2. Nucleação

2.2.2.1. Nucleação primária

A nucleação marca o início de uma cristalização ou precipitação e envolve o nascimento de um novo cristal. Quando ela ocorre na ausência de cristais ou outras superfícies (paredes do recipiente, impelidores, etc), a mesma é chamada de nucleação primária (MYERSON, 2002). Neste caso, a formação de núcleos pode ocorrer espontaneamente, fenômeno conhecido como nucleação homogênea, algo virtualmente impossível de acontecer, pois requer soluções perfeitamente límpidas, mas é a base para a teoria clássica da nucleação.

Em soluções supersaturadas, embora a concentração média permaneça constante, flutuações locais na concentração darão origem a numerosos aglomerados de moléculas ou unidades de crescimento (pré-núcleos), os quais poderão se desfazer ou continuar crescendo caso atinjam um tamanho crítico (LEWIS et al., 2015) formando os chamados núcleos. A energia de Gibbs de um núcleo pode ser representada como sendo composta por dois termos: cada molécula nele adicionada reduzirá sua energia em $\Delta\mu$ ao mesmo tempo que a aumento da superfície do aglomerado levará a um acréscimo na sua energia livre. Considerando os núcleos como esferas, sua energia livre de formação será:

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3V_m}\Delta\mu + 4\pi r^2\gamma_s \quad (2.5)$$

onde r é o raio do aglomerado, V_m é o volume molecular do soluto e γ_s é a tensão superficial. Quando o aglomerado atinge um tamanho crítico, a energia livre de Gibbs apresenta um ponto máximo (Figura 4), a partir do qual o núcleo crescerá espontaneamente (LEWIS et al., 2015). Aglomerados menores que o tamanho crítico tenderão a se desfazer.

O raio crítico (r_c) pode ser encontrado pela minimização da energia livre (Eq. 2.5) com respeito ao raio:

$$\frac{d(\Delta G)}{dr} = -\frac{4\pi r_c^2}{V_m}\Delta\mu + 8\pi r_c\gamma_s = 0 \quad (2.6)$$

ou

$$r_c = \frac{2\gamma_s V_m}{\Delta\mu} \quad (2.7)$$

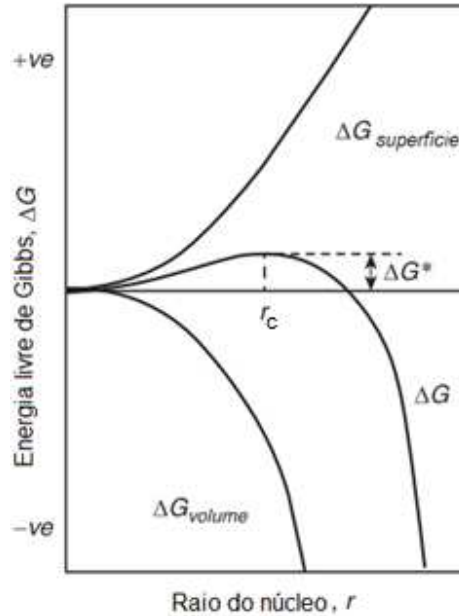


Figura 4 - Energia de Gibbs em função do raio do núcleo (adaptada de MYERSON, 2002)

Substituindo a equação 2.7 na equação 2.5, podemos calcular a energia de Gibbs crítica (ΔG_c):

$$\Delta G_c = \frac{16\pi\gamma_s^3 V_m^2}{3\Delta\mu^2} \quad (2.8)$$

Substituindo a equação 2.2 na equação 2.8, substituindo a constante dos gases ideais pela constante de Boltzmann (k), por estarmos tratando de uma molécula e não um mol:

$$\Delta G_c = \frac{16\pi\gamma_s^3 V_m^2}{3(kT \ln S)^2} \quad (2.9)$$

A teoria clássica da nucleação assume que os núcleos se formam por um mecanismo aditivo, cuja taxa de formação (J) é dada por uma expressão de Arrhenius (MYERSON, 2002):

$$J = AS \exp\left(-\frac{\Delta G_c}{kT}\right) \quad (2.10a)$$

$$J = AS \exp\left(-\frac{16\pi\gamma_s^3 V_m^2}{3k^3 T^3 (\ln S)^2}\right) \quad (2.10b)$$

em que A é um fator pré-exponencial, com valor teórico de 10^{30} núcleos/(cm³·s). Flutuações na razão de supersaturação possuem baixa influência em AS comparado

ao fator exponencial, de maneira que, no primeiro, o valor de S costuma ser considerado igual a 1 (LEWIS et al., 2015). Analisando as equações 2.9 e 2.10b, pode-se ver a dependência da energia e da taxa de formação dos núcleos da supersaturação e da tensão superficial, variáveis afetadas pela quantidade de proteínas presente no meio.

Soluções não ideais possuem impurezas, as quais podem facilitar a ocorrência de nucleação. A formação de núcleos induzida por partículas alienígenas inertes é dita nucleação primária heterogênea (LEWIS et al., 2015) e ocorre na maioria das situações práticas de cristalização. Neste caso, os núcleos crescem sobre a superfície da impureza, e a energia livre para a formação de um núcleo estável (Eq. 2.11) é reduzida de acordo com a molhabilidade (φ) entre a substância nucleada e a impureza, variável dependente do ângulo de contato (θ) entre as mesmas:

$$\Delta G_{c,hetero} = \varphi \Delta G_{c,homo} \quad (2.11)$$

$$\varphi = \frac{1}{4} (2 + \cos \theta)(1 - \cos \theta)^2 \quad (2.12)$$

Uma vez que φ é menor que a unidade a redução na barreira de nucleação implica que, em baixas supersaturações, a taxa de nucleação heterogênea será maior que a homogênea, mesmo A_{hetero} sendo teoricamente bem menor (10^{19} núcleos/(cm³.s)) que A (LEWIS et al., 2015). Já em altas supersaturações, o fator pré-exponencial passa a ter maior peso no cálculo de J e a taxa de nucleação homogênea pode ser maior que a heterogênea, como pode ser visto na Figura 5.

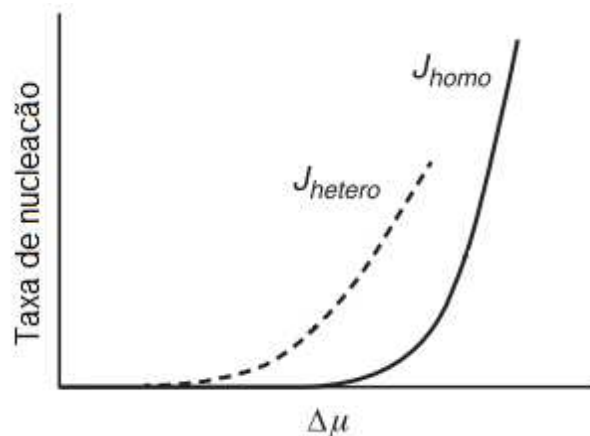


Figura 5 - Taxa de nucleação em função da supersaturação ($\Delta\mu$). Adaptada de LEWIS et al. (2015)

2.2.2.2. Nucleação em duas etapas

Na cristalização de proteínas, como a lisozima, pode ser observada a formação de uma segunda fase líquida e densa, dentro da qual ocorre a nucleação (MUSCHOL; ROSENBERGER, 1997; PETSEV et al., 2003). Este mecanismo apresenta taxas de nucleação com ponto de máximo dependente da temperatura e cuja magnitude é 10 ordens de grandeza menor que o previsto pela teoria clássica (VEKILOV, 2010). Para explicar tais discrepâncias, pesquisadores propuseram um modelo que separa a nucleação em duas etapas no qual, primeiramente, seria formada uma fase líquida metaestável através de flutuações na densidade, seguida da formação dos núcleos no interior ou na superfície das gotas do líquido denso (VEKILOV, 2004, 2010).

Na teoria da nucleação em duas etapas, a segunda etapa é considerada como limitante para determinação da taxa de formação de novos núcleos (VEKILOV, 2010). Sua equação é análoga à equação 2.10:

$$J = \frac{\varepsilon_2 k_2 T}{\eta} C_1 \exp\left(\frac{-\Delta G_{c,2}}{kT}\right) \quad (2.13)$$

em que ε_2 é a fração volumétrica da fase densa, k_2 é uma constante de taxa, T é a temperatura, C_1 é a concentração do soluto na fase densa, $\eta(C_1, T)$ é a viscosidade da fase densa e $\Delta G_{c,2}$ é a barreira de nucleação na fase densa. Devido aos baixos valores da fração volumétrica e altas viscosidades da fase densa, as taxas de nucleação previstas por esta teoria costumam ser até nove ordens de grandeza menores dos que os previstos pela teoria clássica (LEWIS et al., 2015).

A taxa de nucleação aumenta com o decréscimo da temperatura, consequência do aumento da supersaturação (exceto nos casos de solubilidade retrógrada). Com esse aumento, o número de moléculas necessário para a formação de um núcleo estável diminui até atingir o valor de 1, a partir de onde a barreira para nucleação desaparece, ou seja, o sistema entra na fase de decomposição espinodal (limite entre metaestabilidade e instabilidade de uma fase em relação a uma nova fase), e a formação de uma nova fase é limitada apenas pela cinética de crescimento dos aglomerados (VEKILOV, 2010). Na temperatura em que se atinge a curva espinodal a taxa de nucleação atinge seu valor máximo. Abaixo desta temperatura, o

volume das gotas de fase densa diminui, aumentando a concentração do soluto em seu interior, o que leva a um aumento de sua viscosidade, de maneira que J passa a diminuir com a redução da temperatura (LEWIS et al., 2015).

2.2.2.3. Nucleação secundária

Novos cristais podem ser gerados a partir de outros cristais já presentes em solução, fenômeno conhecido como nucleação secundária. Este fenômeno acontece por diversos mecanismos, entre eles, através de partículas que se soltam de cristais secos adicionados ao meio, colisões de cristais entre si ou com partes do reator (impelidor, paredes, chicanas, etc.) ou ainda por cisalhamento. A nucleação secundária possui pouca influência na formação de precipitados, em que a nucleação primária é mais importante (LEWIS et al., 2015; MYERSON, 2002), portanto não será discutida minuciosamente neste documento.

2.2.3. Crescimento

O crescimento de cristais ou precipitado refere-se à deposição de moléculas do soluto na superfície do sólido gerado. Em cristalização, é comum avaliar a taxa de crescimento linear de alguma das dimensões de um cristal. Entretanto, como os sólidos gerados na precipitação são amorfos, essa parte da teoria não será pormenorizada.

Logo após a formação do núcleo, o crescimento de partículas do precipitado é limitado pela difusão de moléculas do soluto pela camada limite de concentração e pela sua espessura, até que este atinja um tamanho de partícula que pode variar tipicamente de 0,1 a 10 μm (HARRISON et al., 2015; MYERSON, 2002). Segundo esse modelo, o ganho de massa do precipitado pode ser relacionado à taxa de difusão pela camada limite segundo a expressão:

$$\frac{dm_c}{dt} = k_d A_s (c - c_i) \quad (2.14a)$$

e

$$k_d = \frac{D}{\delta} \quad (2.14b)$$

em que A_s é a área superficial do sólido, c e c_i são, respectivamente, as concentrações no seio da solução e na interface sólido-líquido, D é a difusividade mássica e δ é a espessura da camada limite. Outro parâmetro a ser considerado é a taxa de integração do soluto à superfície do cristal (dm_c/dt), dado pela relação:

$$\frac{dm_c}{dt} = k_i A_s (c_i - c^*)^i \quad (2.15)$$

em que k_i é a constante de integração, sendo i um valor igual ou entre 1 e 2. A concentração do soluto na interface é uma variável difícil de ser obtida, mas pode ser eliminada do equacionamento através da combinação das equações 2.14 e 2.15. Para i igual a 1:

$$\frac{dm_c}{dt} = K_G A_s (c - c^*) \quad (2.16)$$

em que

$$\frac{1}{K_G} = \frac{1}{k_d} + \frac{1}{k_i} \quad (2.17)$$

sendo K_G o coeficiente geral de crescimento. Quando i é igual a 2, a equação resultante é uma expressão difícil de ser trabalhada, mas que pode ser aproximada pela seguinte relação:

$$\frac{dm_c}{dt} = K_G A_s (c - c^*)^g \quad (2.18)$$

em que g é geralmente um valor igual ou entre 1 e 2. As constantes aqui apresentadas são comumente obtidas empiricamente e as equações 2.16 e 2.18 são comumente utilizadas na indústria (MYERSON, 2002). O valor de K_G dependerá da temperatura, condições de agitação, propriedades físicas do fluido e da presença de impurezas no sistema (DORAN, 2013). Além disso, podemos ressaltar que a taxa de crescimento por transferência de massa, assim como a nucleação, também depende da supersaturação do sistema.

Ao atingirem tamanho superiores a 1 μm , partículas também podem passar a crescer através de processos de agregação e aglomeração, fenômenos que são governados pelo movimento turbulento do fluido no qual elas se encontram (HARRISON et al., 2015). Além das forças induzidas pela turbulência, forças entre

partículas, tais como a de van der Waals, também participam desses eventos (LEWIS et al., 2015).

2.2.4. Semeadura

Como mencionado no tópico 1.2, semeadura trata-se da adição de pequenos cristais à cristalização no momento em que o meio se encontra na zona metaestável do diagrama de fases. Além de permitir contornar a etapa de nucleação, outras vantagens do uso de semeadura são a obtenção de cristais com menos impurezas e a possibilidade de se controlar sua distribuição de tamanho e morfologia, no caso de substâncias que produzem cristais polimórficos (MYERSON, 2002). Para que o processo de semeadura seja adequado é preciso considerar a quantidade e o tamanho das partículas da semente, o momento em que ela é adicionada e a maneira como elas são produzidas (LEWIS et al., 2015).

A razão de semeadura (C_S) é um parâmetro utilizado para estimar a massa de cristais necessária para formar cristais que atinjam um tamanho L_{prod} , que dependerá do tamanho inicial das sementes L_{seed} . C_S é definida pela equação:

$$C_S = \frac{m_{seed}}{\Delta m} \quad (2.19)$$

em que é m_{seed} a massa da semente e Δm é a massa de sólidos que se deseja obter. Na prática, valores de C_S pequenos demais resultam em uma área superficial de sementes reduzida, o que requer supersaturações elevadas para que as mesmas possam crescer, aumentando o risco de haver nucleações indesejadas (LEWIS et al., 2015). Da mesma maneira, valor de C_S grandes demais também são indesejados pois ocuparão muito espaço no interior do reator de cristalização (LEWIS et al., 2015). Também é preciso ter cuidado com a concentração do meio no momento da adição das sementes. Se adicionadas quando o meio ainda não estiver supersaturado, elas dissolver-se-ão. Se estiver supersaturado demais, pode ocorrer nucleação primária, fazendo com que a semente perca a sua função. Ainda assim, existem casos nos quais cristais são introduzidos em um meio contendo precipitado e ainda assim crescem por maturação de Ostwald (BERGFORS, 2003). Neste fenômeno cristais menores se desfazem para que suas moléculas sejam incorporadas à superfície de

cristais maiores, pois a razão volume/superfície dos últimos propicia um estado de menor energia (MYERSON, 2002).

As sementes utilizadas não precisam ser necessariamente cristalinas. Estruturas proteicas alternativas, como precipitados amorfos, também podem ser utilizados como sementes (BERGFORS, 2003). Isso permite que se obtenham cristais de proteínas que ainda não foram cristalizadas com sucesso sem semeadura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção de proteínas para composição do mix proteico

A seleção das proteínas para composição do sistema complexo modelo (mix proteico) visava compor uma solução com proteínas com massas moleculares distintas, sendo que uma delas teria que ser uma enzima passível de ter sua atividade aferida, a lisozima. Dessa maneira poder-se-ia avaliar a distribuição dessas proteínas nas fases líquida e sólida de uma precipitação de maneira qualitativa, por eletroforese SDS-PAGE, e quantitativa, por análise de atividade enzimática de lisozima.

Foi preparado 1 mL de solução de cada proteína em microtubos de centrífuga de 1,5 mL, cada qual diluída no tampão apropriado. Após a dissolução, os tubos foram centrifugados a 12745 *g*, 25°C por 10 min em centrífuga modelo 5804 R (Eppendorf, Alemanha), para remoção de sólidos não dissolvidos. Depois disso, de acordo com sua concentração inicial teórica (massa total de proteínas utilizada no preparo de cada solução dividida pelo volume final, sem descontar a fração de sólidos não solubilizados), cada solução foi diluída no seu próprio tampão até concentrações próximas à recomendada para detecção por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) com coloração de nitrato de prata segundo Morrissey (1981), que é de 0,1 mg/mL. Após serem diluídas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel com 15% de acrilamida, a 150 V, com equipamento Mini Protean III (Bio Rad, EUA). A Tabela 1 lista as proteínas que foram submetidas a este experimento, suas massas moleculares, seus fabricantes, os tampões utilizados para dissolução, suas concentrações iniciais teóricas e as diluições realizadas para a SDS-PAGE.

Tabela 1 – Proteínas submetidas à seleção para composição do mix.

Proteína	Massa molecular (Da)	Fabricante	Solvente	Concentração teórica (mg/mL)	Diluição para eletroforese
Glucagon	3482	Biobrás	Ácido acético 1%	1,0	1x
Insulina suína	5778	Biobrás	HCl 1 mmol/L pH 3,0	2,0	10x
Lisozima de ovo de galinha	14307	Sigma	Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5	2,0	4x
Tripsina suína	24000	Biobrás	HCl 1 mmol/L pH 3,0	1,0	10x
Quimiotripsina bovina	25000	Biobrás	HCl 1 mmol/L pH 3,0	1,0	10x
Pepsina	34620	Sigma	Água*	1,0	2x
α -amilase	64000	Sigma	Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5	2,0	4x
BSA	66430	Sigma	Água ultrapura	10	100x

*Água purificada em equipamento Milli-Q (Millipore, EUA) com filtro Millipack 40 de poro 0,22 μ m (Millipore, EUA)

3.2. Cinética da precipitação da lisozima com etanol

Em um béquer de vidro de 100 mL foram adicionados 1,125 g de lisozima de clara de ovo e 75 mL de tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2. A mistura foi homogeneizada em agitador magnético à temperatura ambiente até a completa dissolução da enzima, concentração final de 15 mg/mL. Esta solução foi então distribuída em alíquotas de 3,0 mL em tubos de centrífuga de 15 mL.

A cada tubo de centrífuga foram adicionados 3,0 mL de etanol anidro (99,5%), resfriado a -7°C em banho de gelo e etanol. O etanol foi adicionado a uma taxa de 500 μ L a cada 30 s. Feito isso, os tubos foram homogeneizados por inversão e incubados em banho termostatzado TE-2000 (Tecnal, Brasil) a $4,0^\circ\text{C}$ por 1 h, 8 h, 24 h, 72 h e 168 h, em triplicata. Decorrido o tempo de precipitação, os tubos foram centrifugados a 9000 g a 4°C por 30 min. Depois disso, os sobrenadantes foram separados e os precipitados foram ressuspensos em 2 mL de tampão 66 mmol/mL pH 6,2 por inversão até sua completa dissolução.

Então, todas as frações da precipitação e a solução estoque inicial tiveram suas concentrações de proteína determinadas por absorvância em 280 nm (A_{280}) em espectrofotômetro modelo DU 650 (Beckman, EUA).

3.3. Curva de solubilidade de cada proteína em solução tampão-etanol

Para a determinação da curva de solubilidade da insulina, da lisozima e da BSA em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2 a diferentes concentrações de etanol, foi preparada uma solução estoque de cada proteína através da dissolução do seu sólido no volume desejado de tampão fosfato em béquer de vidro sob agitação magnética. A lisozima foi preparada nas concentrações de 33,3 e 100 mg/mL em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2. A BSA foi preparada na concentração de 10 mg/mL e a insulina na concentração de 3 mg/mL (sólidos em excesso), ambas em tampão KH_2PO_4 165 mmol/L pH 6,2. A solução de insulina foi preparada a 4°C em béquer encamisado ligado a um banho termostatizado e, depois de ser homogeneizada por 1 h, foi centrifugada a 9000 *g* a 4°C por 30 min, para separação dos sólidos não solubilizados, os quais foram descartados. As soluções de lisozima e BSA não foram centrifugadas por não terem sido preparadas com sólidos em excesso.

Feito isso, as soluções foram distribuídas em microtubos de centrífuga de 1,5 mL em alíquotas de 300 μL para a solução de lisozima e 400 μL para as soluções de insulina e BSA. Aos tubos com lisozima, foram adicionados também 100 μL de tampão KH_2PO_4 462 mmol/L pH 6,2. Por fim, foram adicionados a cada microtubo volumes de água e etanol anidro previamente refrigerado em freezer (-20°C) de maneira a atingir a proporção desejada do agente precipitante (Tabela 2) e volume final de 1,0 mL. Dessa maneira, as concentrações de cada proteína no início da precipitação foram de 10 e 33,3 mg/mL para a lisozima, 4 mg/mL para a BSA e 1,2 mg/mL (teórico) para a insulina e a concentração de tampão fosfato foi de 66 mmol/L.

Depois da adição de etanol, os microtubos foram homogeneizados por inversão e incubados a 4°C em banho termostatizado por 3 h, tempo determinado no experimento 3.2 como suficiente para estabilização da concentração de proteínas na fase líquida. Decorrido este tempo, os microtubos foram centrifugados a 9000 *g* a 4°C por 30 min. Ao fim da centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a análises de concentração de proteínas, A_{280} (ver item 6.10.3) para lisozima e BSA e microensaio de Bradford (1976) para a insulina, e eletroforese (somente a insulina). Os sobrenadantes da precipitação da solução de lisozima com concentração inicial de 33,3 mg/mL também foram submetidos à análise de atividade da enzima. Já os precipitados, caso houvesse, foram analisados por microscopia ótica. Cada condição das precipitações da insulina e da lisozima a 33 mg/mL foi realizada em triplicata.

Tabela 2 – Concentrações de etanol utilizadas para curva de solubilidade da insulina, lisozima e BSA.

Proporção de etanol (% v/v)	Insulina	Lisozima (10 mg/mL)	Lisozima (33,3 mg/mL)	BSA (4,0 mg/mL)
0% (controle)	x	x	x	x
5,0	x	x		x
10,0	x	x	x	x
15,0	x	x		x
20,0	x	x	x	x
25,0	x	x		x
27,5		x		
30,0	x	x	x	x
32,5		x		
35,0	x	x		x
37,5		x		
40,0	x	x	x	x
42,5		x		
45,0	x	x		x
50,0	x	x	x	x
60,0		x		

3.4. Precipitação de solução de lisozima de alta pureza com semeadura

Em um béquer encamisado de 40 mL mantido a 4,0°C por um banho termostatzado, foram adicionados, sob agitação magnética, 10 mL de solução de lisozima de concentração 18 mg/mL preparada em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2, 1,0 mL de tampão KH_2PO_4 660 mmol/L pH 6,2, 5,5 mL de água e 3,5 mL de etanol anidro, este adicionado com auxílio de uma bomba dosadora Dosimat 665 (Metrohm, Alemanha) a uma vazão de 2,0 mL/min. Ao sair da bomba, o etanol passava por um sistema de resfriamento que consistia em uma serpentina de cobre alocada no interior de uma caixa de isopor, coberta por sal e gelo. Assim, as concentrações de lisozima, tampão e etanol ficaram em, respectivamente, 9 mg/mL, 66 mmol/L e 17,5% (v/v) e o volume ao final desta etapa foi de 20 mL.

O sistema foi mantido nessas condições por 1 h. Decorrido este tempo, foram adicionados diretamente ao meio 5,4 mg de liofilizado de lisozima (L6876 Sigma, EUA), correspondente a 3% do total de proteínas no sistema, com auxílio de

uma ponteira para pipetador de 5 mL com a ponta cortada, além de 5,4 mL de etanol anidro, mesma vazão e resfriamento da adição anterior, de maneira que a concentração final de etanol ficou em 35% (v/v) e o volume em 25,4 mL. Após a adição do agente precipitante, o sistema foi mantido sob temperatura (4°C) e agitação magnética constante por 3 h. Depois disso, o conteúdo do misturador foi dividido igualmente em tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugado a 9000 *g* a 4°C por 30 min. O mesmo procedimento foi realizado sem a adição da semente, como condição controle. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram submetidos à análise de concentração de proteínas por A_{280} e os precipitados foram observados em microscópio ótico. Os sólidos de lisozima utilizados como semente também foram analisados por microscopia ótica.

3.5. Preparo e caracterização do mix proteico

Para o preparo do mix proteico, primeiramente eram pesadas em balança analítica as massas de insulina, lisozima e BSA necessárias para, no volume desejado, atingir as concentrações teóricas de 3,0 mg/mL para a primeira e 10 mg/mL para as duas últimas. As massas de proteína eram então alocadas em um recipiente único de tamanho adequado e a elas o volume de tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2 em quantidade necessária para atingir a concentração teórica desejada. O sistema então era mantido sob agitação constante a temperatura ambiente até que fosse observada a suspensão total dos sólidos. Feito isso, o sistema era resfriado até a temperatura de 4,0°C, assim permanecendo por 1 h. Decorrido esse tempo, o conteúdo do recipiente era dividido em tubos de centrífuga de tamanho adequado e centrifugados a 9000 *g* a 4°C por 30 min. O mix (fase líquida) era então armazenado em geladeira até o seu uso e as proteínas não solubilizadas eram descartadas.

Foram utilizados diferentes equipamentos para o preparo do mix de acordo com o volume desejado. Um deles consistia em um vaso cilíndrico de vidro com fundo plano encamisado de 100 mL, o qual possuía tampa com orifício para acoplamento de um agitador mecânico Q-251D (IKA Labortechnik, Alemanha) com impelidor de duas pás inclinadas a 45° distante a 5 mm do fundo do reator. Para controle da temperatura do reator, o mesmo era acoplado a um banho termostatizado TE-2000. Outra opção era a utilização do sistema de cristalização Crystal Eyes (HEL, Reino Unido), composto por tanques de vidro cilíndricos de 20, 100 ou 300 mL, todos com

tampa com orifícios para a passagem impelidor magnético tipo âncora com 15 mm de diâmetro, sensor de turbidez e sensor de temperatura tipo Pt-100, os quais se comunicam com o programa de controle WinTOUCH (HEL, Reino Unido), retratado na Figura 6. O controle da temperatura interna do reator se dá através da comunicação do Pt-100 com o WinTOUCH e um banho termostatzado F25-HE (Julabo, Alemanha) conectado à uma camisa de troca térmica externa com adaptadores capazes de acomodar os três tamanhos de reator.

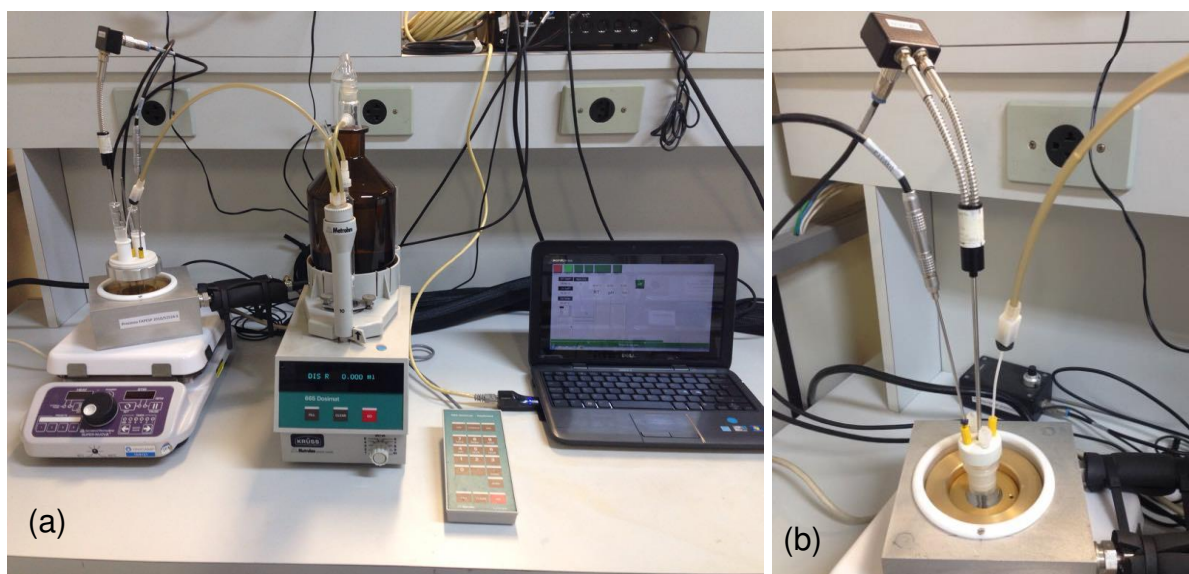


Figura 6 – Sistema de precipitação utilizando o reator Crystal Eyes. (a): frasco de 100 mL (esquerda) conectado à bomba dosadora de etanol (centro) e ao computador com o software WinTOUCH (direita). (b): frasco de 20 mL, destacando o sensor de temperatura (esquerda), de turbidez (centro) e a linha de adição de etanol (esquerda) ligados à tampa do frasco.

3.6. Precipitação da lisozima em mix proteico em volume constante

Em tubos de centrífuga de 1,5 mL foram distribuídos 400 μ L de mix proteico com 25 mg/mL de lisozima e BSA e 3 mg/mL de insulina (concentrações teóricas) preparado em tampão KH_2PO_4 165 mmol/L pH 6,2. A cada um desses tubos foram adicionados volumes de água e etanol anidro previamente refrigerado em freezer (-20°C) com auxílio de uma micropipeta de maneira a atingir as concentrações de 0% (controle), 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% e 50% (v/v) do agente precipitante. Após a adição do etanol, os tubos foram mantidos a $4,0^\circ\text{C}$ em banho

termostatizado TE-2000 por 3 h. Decorrido este tempo, os tubos foram centrifugados a 9000 *g* a 4°C por 30 min. Terminada a etapa de centrifugação, foram separados os sobrenadantes dos precipitados. Os primeiros foram submetidos à análise de concentração de proteínas por A_{280} , atividade de lisozima e SDS-PAGE (gel com 15% de acrilamida corrido com 150V). Os últimos foram analisados por microscopia ótica.

3.7. Determinação do ponto de turvação visual

Para a determinação do ponto de turvação visual - concentração de etanol (v/v) necessária para causar a nucleação primária da solução em questão - foram dispostos 4 mL da solução da proteína desejada ou mix em um reator encamisado ligado à um banho termostatizado TE-2000. A solução foi então resfriada para 4,0°C e mantida sob agitação magnética. Feito isso, etanol anidro foi adicionado à solução a uma vazão de 2 mL/min com o sistema de dosagem e resfriamento descrito no item 3.4, até que fosse observada a turvação visual do meio, quando a adição de álcool era interrompida. O ponto de turvação então foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\text{Ponto de turvação (\%)} = \frac{\text{etanol dosado (mL)}}{\text{volume final (mL)}} \quad (3.1)$$

3.8. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza

Em um reator de vidro encamisado de 100 mL equipado com o agitador mecânico Q-251D (IKA Labortechnik, Alemanha) foram adicionados 18,8 mL de mix protéico com concentrações teóricas de lisozima e BSA iguais a 10 mg/mL e de insulina igual a 0,8 mg/mL. Depois, a temperatura do sistema foi ajustada para 4,0°C sob agitação mecânica de 150 rpm. Quando a temperatura foi atingida, foram adicionados 1,2 mL (6% v/v, abaixo do ponto de turvação determinado para esse mix) de etanol anidro resfriado a uma vazão de 2 mL/min, totalizando um volume de 20 mL no interior do reator. Feito isso, foram adicionados 13 mg de liofilizado de lisozima (L6876 Sigma, EUA) ao interior do reator (5% do total de proteína no interior do reator, medido por A_{280}), foi verificado se os sólidos adicionados estavam em suspensão, para então serem adicionados mais 6,857 mL de etanol anidro resfriado a uma vazão de 2 mL/min, totalizando uma concentração final de etanol igual a 30% (v/v). Então, o sistema foi mantido sob a mesma temperatura e agitação por 3 h, quando o conteúdo

do reator foi distribuído igualmente em tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugado a 9000 *g* a 4°C por 30 min. O mesmo experimento foi realizado sem a adição da semente de lisozima como condição controle. Os sobrenadantes gerados foram analisados para concentração de proteínas determinada por A_{280} , atividade de lisozima e SDS-PAGE (eletroforese feita com gel de 15% de acrilamida a 150 V). Os precipitados tiveram seu hábito cristalino analisado por microscopia ótica.

3.9. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza em diferentes concentrações de etanol

No reator de 100 mL do sistema de cristalização Crystal Eyes, foram adicionados 19,4 mL de mix proteico com concentrações teóricas de lisozima e BSA iguais a 10 mg/mL e de insulina igual a 3,0 mg/mL. Depois, a temperatura do sistema foi ajustada para 4,0 °C sob agitação magnética de 900 rpm. Quando a temperatura foi atingida, foram adicionados 0,6 mL (3% v/v, abaixo do ponto de turvação determinado para esse mix) de etanol anidro resfriado a uma vazão de 2 mL/min, totalizando um volume de 20 mL no interior do reator.

Para a realização da semeadura nesse experimento, 13 mg de liofilizado de lisozima (L6876 Sigma, EUA) (equivalente a 5% do total de proteína no interior do reator, medido por A_{280}) foram pesados em um tubo de centrífuga de 1,5 mL. Então, com auxílio de uma micropipeta de 1000 µL com a ponteira cortada na ponta, 1 mL do conteúdo do reator foi transferido para o microtubo contendo a semente, homogeneizado para suspensão das partículas e então retornado para o reator. Isso foi repetido mais duas vezes para garantir a lavagem de eventuais sólidos que pudessem permanecer no interior do tubo.

Feita a semeadura, foi verificado se os sólidos adicionados estavam em suspensão, para então ser adicionado um volume de etanol necessário para atingir as concentrações (v/v) de 10%, 15%, 20% ou 25%. Então, o sistema foi mantido sob as mesmas temperatura e agitação por 3 h, quando o conteúdo do reator foi distribuído igualmente em tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugado a 9000 *g* a 4°C por 30 min. O mesmo experimento foi realizado para cada concentração de etanol sem a adição da semente de lisozima como condição controle. As análises de concentração de proteínas por A_{280} , atividade de lisozima e SDS-PAGE (gel com 15% de acrilamida corrido com 150V) foram feitas com todos os precipitados e sobrenadantes gerados.

3.10. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente na forma de precipitado

Este experimento foi similar ao experimento descrito no item 3.9 até a etapa de adição do etanol a uma concentração pouco menor que o ponto de turvação, com a diferença de que o volume inicial de mix foi de 20 mL e a concentração de etanol ao fim desta etapa foi de 1% (v/v). O método de semeadura foi novamente alterado visando utilizar sementes com estruturas mais próximas à do precipitado gerado. Para tal, foi preparada uma solução contendo 30 mg/mL de lisozima dissolvida em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2 e adicionou-se 60% de etanol, de maneira que mais de 90% da lisozima precipitasse. Todos os reagentes utilizados foram refrigerados e a solução mantida em geladeira para evitar qualquer perda de atividade enzimática por desnaturação proteica.

Para a realização da semeadura em si, 433 μL dessa suspensão (contendo aproximadamente 5% do total de proteínas presentes no reator) foram transferidos para o mix supersaturado. Após a transferência, foi acompanhada a evolução da turvação da solução pelo sistema Crystal Eyes, até que a mesma estabilizasse e, ao fim de 3 h após a adição das sementes, o conteúdo do reator foi centrifugado a 9000 g a 4°C por 30 min. Sobrenadante e precipitado tiveram seu teor de proteínas (A_{280}) e atividade de lisozima analisados.

Como experimento controle, o procedimento aqui descrito foi repetido elevando a concentração de etanol até o ponto de turvação, sem a adição da semente.

3.11. Determinação dos limites de turvação e de saturação do mix diluído e dopado com lisozima

Inicialmente, foi preparado o mix proteico tal como descrito no item 3.5 e uma solução de lisozima, concentração de 90 mg/mL em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2. Então, para a diluição e dopagem do mix, 134 μL (diluição de 74,6 vezes) do mesmo foram misturados com diversos volumes de solução de lisozima (de acordo com a Tabela 3) e o volume de solução completado para 10 mL em balão volumétrico.

Ao fim do preparo de cada solução, 5 mL foram transferidos para o frasco de 20 mL do reator Crystal Eyes para determinação de seu ponto de turvação. Para tal, a solução era resfriada até a temperatura de 4,0 °C sob agitação magnética constante de 900 rpm. Então, etanol anidro foi adicionado ao meio com auxílio de uma

bomba dosadora a uma vazão de 2 mL/min em pulsos que aumentassem sua concentração em 1% (v/v) até que a turbidez do meio fosse acrescida em 0,02 em relação ao valor de base. O sistema de resfriamento de etanol deixou de ser utilizado devido a problemas operacionais. Dessa maneira, após cada pulso de etanol, era necessário aguardar que a temperatura do sistema atingisse novamente o valor de 4 °C para que outro pulso fosse dosado.

Tabela 3 – Volumes de solução de lisozimas utilizados para dopagem do mix diluído 74,6 vezes

Dopagem da lisozima (aumento de concentração)	Volume de solução de lisozima 90 mg/mL (μL)
0	0
4,5	34
34	214
69	656
104	546

Atingido o ponto de turvação, 4 mL de amostra eram retirados e incubados *overnight* em banho termostatizado a 4,0 °C. As amostras foram então centrifugadas a 9000 *g* a 4°C por 30 min. Feito isso, cada sobrenadante foi coletado e teve sua concentração de proteínas determinada por A_{280} .

3.12. Precipitação de mix proteico diluído dopado com lisozima e semente de lisozima precipitada

Neste tópico, convém descrever inicialmente o experimento controle (sem semeadura), uma vez que o mesmo foi realizado primeiro, para servir como base para a execução da condição principal.

Para o experimento controle, foram adicionados 20 mL de mix diluído 74,6 vezes em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2 e dopado com lisozima ao reator de 100 mL do Crystal Eyes, de maneira que as concentrações alvo da enzima e total de proteínas fossem, respectivamente, 0,4 mg/mL e 0,5 mg/mL (conteúdo proteico em lisozima de 80%). A solução foi resfriada a 4,0 °C sob agitação magnética (agitador tipo âncora) constante igual a 900 rpm. Feito isso, seu ponto de turvação foi

determinado tal como descrito no item 3.11. Então, a concentração de etanol foi elevada para 40% (v/v) e o reator foi amostrado após 5 min. Em seguida, a concentração de etanol foi elevada para 52,3%, e o reator foi novamente amostrado após 5 min. Isso foi repetido mais duas vezes para as concentrações de 60 e 70% de etanol. Após a retirada das amostras, as mesmas eram incubadas em banho termostático a 4,0 °C até que a última fosse coletada, quando então todas as amostras foram centrifugadas a 9000 *g* a 4°C por 30 min. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante era separado e o precipitado solubilizado em tampão KH₂PO₄ 66 mmol/L pH 6,2 e analisado para concentração de proteínas pelo método de Bradford e atividade de lisozima.

A precipitação com semeadura foi realizada da mesma maneira, com as seguintes alterações: assim como no item 3.10, foi preparada uma solução de lisozima dissolvida em tampão KH₂PO₄ 66 mmol/L pH 6,2 e etanol, porém as concentrações da enzima e do antissolvente foram alteradas, respectivamente, 10 mg/mL e 70% (v/v). Quando foi detectado um acréscimo de 0,01 no valor turbidez em relação ao valor base marcado pelo sensor do Crystal Eyes, foram adicionados 100 µL da solução de lisozima precipitada ao reator e em seguida a concentração de etanol foi elevada para 30, 40, 50, 60 e 70%, intercaladas por intervalos de 5 min e amostragens, tal como foi descrito no parágrafo anterior.

3.13. Métodos analíticos

3.13.1. Análise de precipitados por microscopia ótica

Para as análises de microscopia ótica, uma amostra dos precipitados gerados era coletada do interior do tubo de centrifuga com auxílio de uma alça de inoculação de plástico e transferida para a superfície de uma lâmina de microscópio previamente higienizada com isopropanol ou etanol 70%. Sobre a amostra era colocada uma lamínula de vidro igualmente higienizada. A lâmina era então analisada em um microscópio ótico trinocular modelo TIM-108 (Opton, Brasil). As imagens das microscopias foram capturadas com a câmera traseira de um aparelho celular.

3.13.2. Análise de atividade de lisozima

A análise de atividade de lisozima foi feita de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante da enzima (SIGMA-ALDRICH INC., 2017), baseado na publicação de Shugar (1952). O substrato da reação enzimática é uma suspensão da bactéria *Micrococcus lysodeikticus*, ATCC nº 4698, fornecida na forma liofilizada pela Sigma (EUA), na concentração aproximada de 0,01% (m/v), preparada em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2. Esta suspensão deve apresentar absorvância a 450 nm (A_{450}) entre 0,6 e 0,7 utilizando o tampão de preparo como branco.

Preparado o substrato, eram transferidos 2,5 mL do mesmo para uma cubeta de quartzo de tamanho apropriado, a qual era então alocada em um espectrofotômetro modelo DU 650 (Beckman, EUA) ligado a um banho termostatizado TE-2000 (Tecnal, Brasil) previamente ajustado para a temperatura de 25°C. Lá, a cubeta permanecia por 5 min para equilíbrio de sua temperatura. Decorrido esse tempo, eram adicionado 0,1 mL da amostra que se desejava medir a atividade enzimática, devidamente diluída para uma concentração de proteínas compatível com a faixa de linearidade do método. Após a adição da enzima, a variação da A_{450} da amostra era monitorada por 5 min, tendo seu valor registrado em intervalos de 1 min. Estes valores eram utilizados para calcular a taxa máxima de variação linear ($\Delta A_{450}/\text{min}$), a qual pode ser convertida em atividade volumétrica pela seguinte relação:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{(\Delta A_{450}/\text{min})f_D}{0,001*0,1} \quad (3.2)$$

em que f_D é o fator de diluição da amostra, 0,001 é a razão de variação de A_{450} por minuto ($\Delta A_{450}/\text{min}$) que uma unidade de atividade de lisozima produz em 2,6 mL de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* em pH 6,2 a 25°C e 0,1 é o volume (mL) da solução enzimática analisada. A atividade específica (U/mg) da amostra pode ser obtida dividindo a sua atividade volumétrica (U/mL) pela sua concentração de proteínas (mg/mL).

3.13.3. Análise de concentração de proteínas por A_{280}

Para a determinação da concentração de proteínas por A_{280} , a absorbância da amostra, diluída para estar dentro da faixa de linearidade do método, nesse comprimento de onda foi medida no espectrofotômetro modelo DU 650 (Beckman, EUA) em cubeta de quartzo. O volume mínimo analisado era de 500 μL e o branco da análise era o tampão de diluição da proteína em questão, o que na maioria dos casos era KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2. Para o cálculo da concentração de proteínas, foi utilizada uma curva padrão gerada a partir de concentrações conhecidas de lisozima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de proteínas para composição do mix proteico

O gel de eletroforese com as proteínas submetidas à seleção está apresentado na Figura 7.

O grupo de proteínas que iria compor o mix, além da lisozima, deveria cumprir dois critérios:

- i. Serem visivelmente puras ou com poucas bandas contaminantes;
- ii. Não possuir bandas que se sobrepusessem às bandas de outras possíveis candidatas.

As proteínas selecionadas foram insulina e BSA. A primeira apresentou alto grau de pureza e uma banda bem definida no gel de eletroforese, em comparação ao glucagon, proteína de massa molecular semelhante. Tripsina, quimiotripsina e pepsina, apesar de possuírem atividade enzimática passível de ser medida, são proteases, capazes de, em solução, degradar as demais proteínas do meio, além de si mesmas (autólise). A pepsina ainda apresentou mais pontos desfavoráveis, tais como baixa pureza e uma banda “negativa” (ausência de coloração em seu interior), que pela massa molecular corresponde à própria proteína. A α -amilase, apesar de também possuir atividade catalítica, ficou aquém no critério de pureza, além de ter apresentado baixa solubilidade mesmo no solvente recomendado pelo fabricante (dados não publicados) e possuir uma banda que se sobrepunha a outra possível candidata, a BSA. Esta apresentou bandas bem definidas e que cobriam uma faixa de tamanhos desejável (aproximadamente 45, 66 e 97 kDA) em SDS-PAGE e foi a última proteína selecionada. Como tampão de dissolução, foi escolhido o KH_2PO_4 66 mmol/mL pH 6,2, por ser o recomendado para uso no ensaio de atividade enzimática de lisozima (SIGMA-ALDRICH INC., 2017).

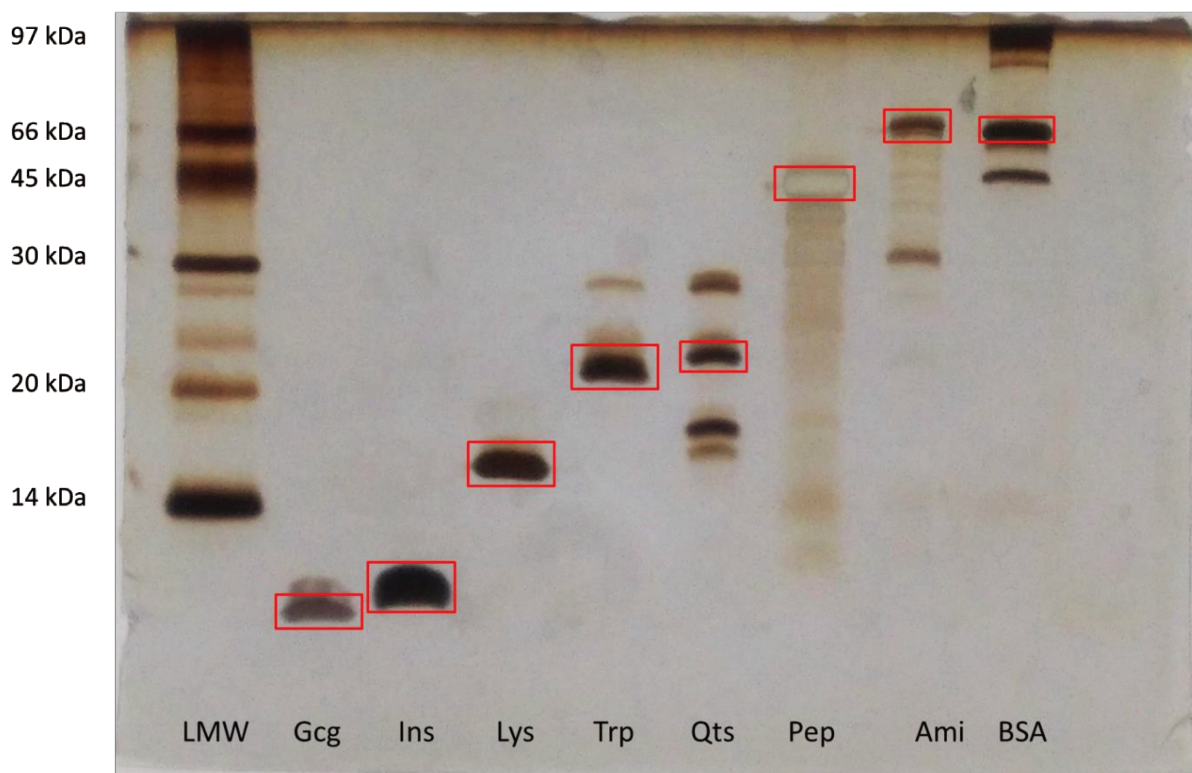


Figura 7 - Eletroforese para seleção das proteínas componentes do mix. LMW – marcador de baixa massa molecular, Gcg – glucagon, Ins – insulina, Lys – lisozima, Trp – tripsina, Qts – quimiotripsina, Pep – pepsina, Amy - α -amilase, Bsa – BSA.

4.2. Cinética da precipitação da lisozima

O objetivo desse experimento foi determinar o tempo necessário para estabilização da concentração de proteínas na fase líquida na precipitação com etanol de uma solução de lisozima em tampão fosfato. As massas de lisozima no sobrenadante e no precipitado ao longo de tempo estão apresentados na Figura 8. O balanço de massa para cada tempo está representado na Tabela 4.

Um teste estatístico de Tukey revelou não haver diferença estatística entre as massas de lisozima presentes no sobrenadante (dados não apresentados). O mesmo teste foi feito para o comparar as massas de precipitado e apontou diferença estatística significativa entre o ponto de 168 h e os pontos de 8 e 24 h, mas não entre o de 1 h (dados não apresentados). Os resultados dos testes estatísticos aliados ao fato do balanço de massa (Tabela 4) para cada tempo ter apresentado uma tendência decrescente com o passar dos dias sugerem a concentração de proteínas na fase líquida estabiliza nas primeiras horas de precipitação, e que as diferenças que

surgiram podem ser provenientes de perdas por desnaturação causadas pelo contato das proteínas com o etanol por um período prolongado.

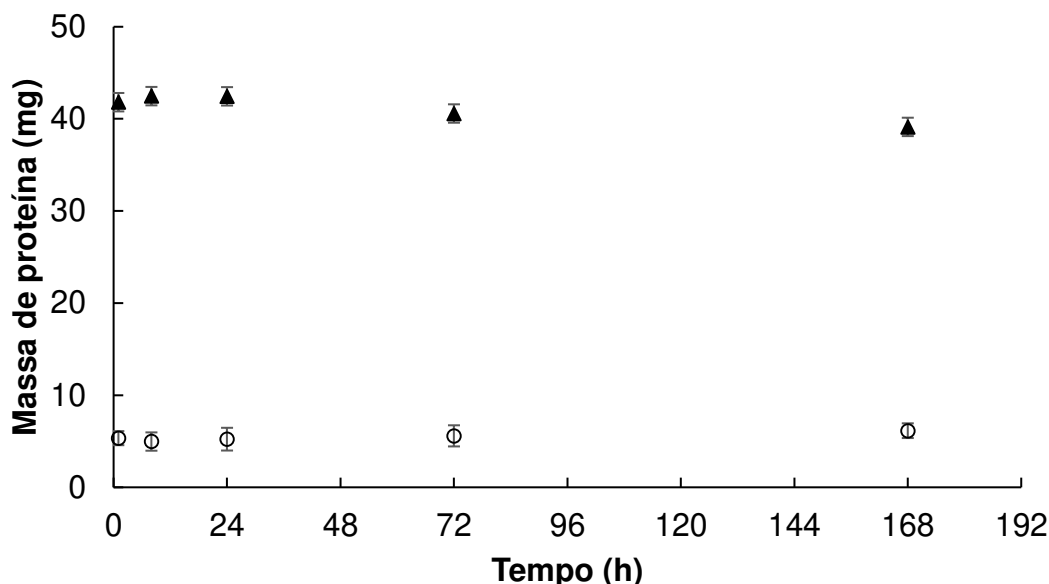


Figura 8 - Cinética de precipitação da lisozima com etanol. (▲) – precipitado, (○) – sobrenadante. Condições: massa inicial de lisozima, 45 mg; concentração de etanol: 50% (v/v), temperatura 4,0°C.

Tabela 4: Balanço de massa da precipitação de solução de lisozima com etanol⁽¹⁾

Tempo (h)	Massa de proteínas no sobrenadante (mg)	Massa de proteínas no precipitado (mg)	Recuperação de proteína global ⁽²⁾
1	5,3 ± 0,8	41,8 ± 2,2	105 ± 3%
8	5,0 ± 1,0	42,5 ± 1,0	105 ± 4%
24	5,2 ± 1,2	42,4 ± 0,4	106 ± 3%
72	5,6 ± 1,1	40,6 ± 0,5	103 ± 3%
168	6,2 ± 0,8	39,1 ± 1,1	101 ± 2%

(1) Média dos resultados de precipitações em triplicata

(2) Referente aos 45 mg de proteína inicial

Com base no resultado deste experimento, foi decidido aguardar 3 h entre o início da precipitação, marcado pelo fim da adição de etanol ao meio, e o seu fim, marcado pela centrifugação das amostras para análise.

4.3. Curvas de solubilidade das proteínas

Este experimento foi proposto para melhor entender como as proteínas selecionadas para compor o mix proteico se comportariam separadamente na presença de etanol. BSA: o ensaio para determinação da solubilidade da BSA em etanol (5-50% v/v) não resultou em formação de precipitado. Ainda assim, o experimento foi conduzido até o fim. O resultado da análise de proteínas do sobrenadante pode ser observado na Figura 9 e confirma o que foi verificado visualmente: na concentração de 4 mg/mL, a BSA não precipitou em nenhuma das concentrações de etanol testadas. Este resultado é condizente com as altas solubilidade de albuminas reportadas na literatura. Como exemplo, temos o trabalho de Yoshikawa *et al.* (2012) no qual a solubilidade de aproximadamente 42,5 mg/mL foi medida em uma solução de BSA em água com 50% de etanol (v/v) a 25°C.

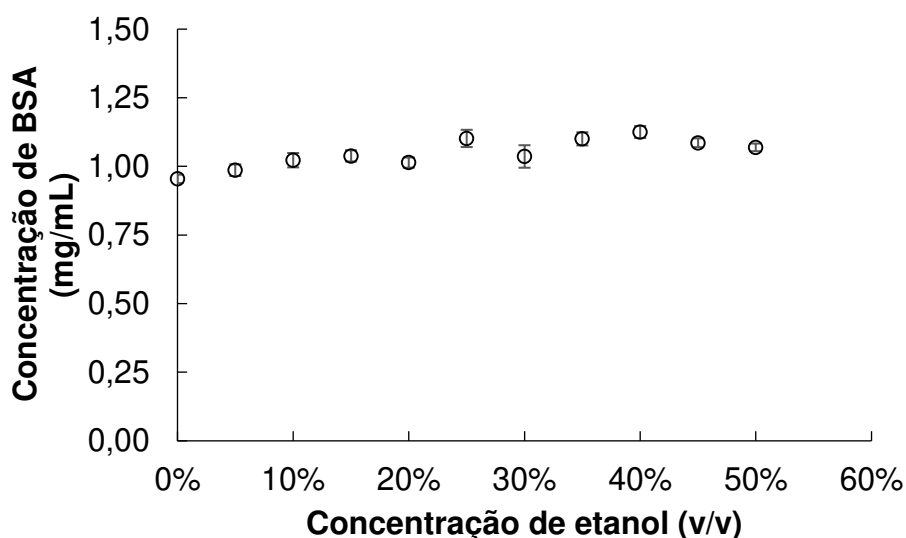


Figura 9 – Concentração de BSA no sobrenadante. As barras de erro correspondem ao desvio padrão amostral das triplicatas de precipitação.

As curvas de solubilidade da lisozima estão apresentadas na Figura 10. Nas concentrações de etanol com símbolo fechado (■ e ●) a solução estava completamente translúcida anteriormente à centrifugação, sendo assim, não podem ser considerados a solubilidade da lisozima nessas condições. Já os símbolos abertos (□ e ○) representam condições em que foi observada a formação de precipitado, ou seja, podem ser consideradas a solubilidade da lisozima naquele ponto. Tal como foi observado por outros autores (HARDY, 1905; MELLANBY, 1905; NORTHROP, 1946;

PINHEIRO et al., 2016; SHIH; PRAUSNITZ; BLANCH, 1992), a concentração inicial de lisozima teve efeito na sua concentração na fase líquida após a precipitação. Assim, pode-se inferir que não formados sólidos com diferentes solubilidades.

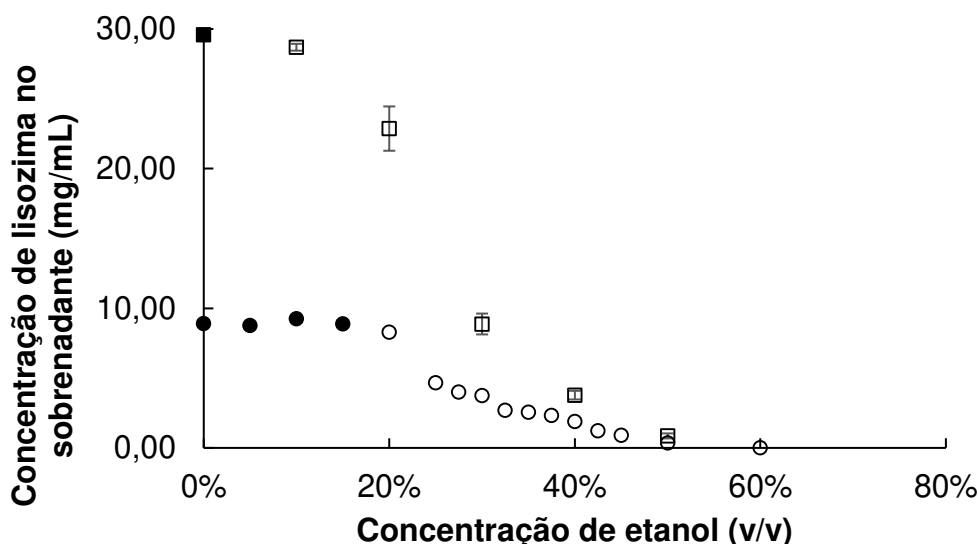


Figura 10 - Concentração de lisozima no sobrenadante após precipitação com etanol. Os quadrados (■ e □) correspondem à concentração inicial de 33,3 mg/mL (com barras de erro que correspondem ao desvio padrão amostral de triplicatas), enquanto os círculos (● e ○) correspondem à de 10 mg/mL (não foram realizadas triplicatas).

A atividade específica da lisozima (aproximadamente 25900 U/mg) foi mantida em todas as precipitações realizadas na concentração inicial de 33,3 mg/mL, o que implica que a enzima não está sofrendo desnaturação pelo etanol na temperatura escolhida (dados não apresentados). A manutenção da atividade específica da lisozima a baixas temperaturas em diversas concentrações de etanol também foi observada por Pinheiro (2016).

Não foi possível visualizar os sólidos gerados na precipitação da solução com 10 mg/mL de lisozima inicial a concentrações de etanol abaixo de 32,5%. Ao ser transferido para a lâmina de vidro, o precipitado voltava a se dissolver na fase líquida residual que o acompanhava. Este efeito provavelmente foi causado pelo aumento da temperatura do sistema passado pelo sólido, de 4°C para a temperatura ambiente, o que resultou no aumento de sua solubilidade em função da temperatura e, consequentemente, sua ressolubilização. As micrografias dos sólidos gerados nas concentrações de etanol superiores a 30% estão ilustradas na Figura 11.

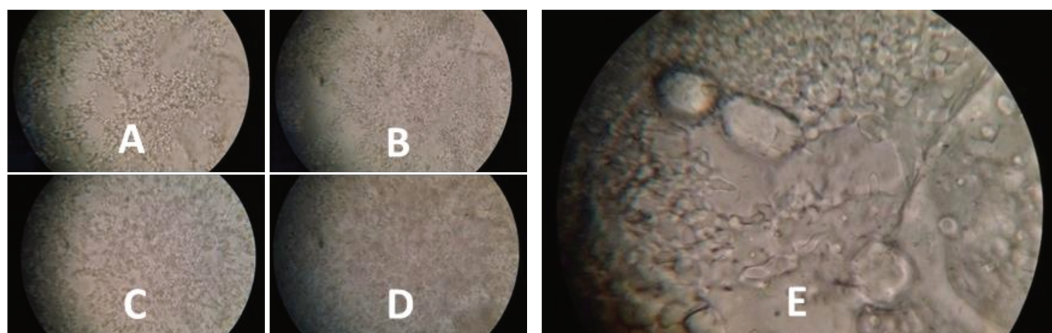


Figura 11 – Micrografias dos sólidos gerados na precipitação de uma solução com concentração inicial de lisozima de 10 mg/mL e etanol (v/v) de: A, 35%; B, 40%; C, 45%; D, 50% e E, 60%. Amplificação de 1000x.

Devido à baixa resolução das imagens, não é possível avaliar o hábito das partículas. A concentração de 60% de etanol (v/v) foi a única que, além de precipitados de tamanhos indistinguíveis no aumento de 1000 vezes, também apresentou sólidos maiores com hábito cristalino. Não foram investigados os motivos que levaram à formação desses cristais.

A concentração da insulina no sobrenadante em diferentes concentrações de etanol apresentou um comportamento anômalo, como pode ser observado na Figura 12. Até a concentração de 20% de etanol, o teor de insulina na fase líquida foi apresentando valores cada vez menores até atingir um valor mínimo de 0,016 mg/mL. Entretanto, a partir desta concentração, sua concentração no sobrenadante voltou a subir, até atingir, nas concentrações de etanol mais altas (acima de 40%), o mesmo patamar das concentrações mais baixas, abaixo de 5%, cerca de 0,080 mg/mL.

Embora em todas as condições de precipitação não tenha sido possível observar turvação, tampouco deposição de sólidos nos tubos após a centrifugação, o mínimo de concentração de insulina também pôde ser observado através da perda de intensidade das bandas da insulina em SDS-PAGE, cujo gel está representado na Figura 13. Nesta eletroforese, os sobrenadantes não foram diluídos, de maneira que a intensidade de cada banda é diretamente proporcional à concentração de insulina de cada um. Assim como na Figura 12, as concentrações de amostras de precipitações entre 15, 20 e 25% de etanol apresentaram uma quantidade de insulina na fase líquida notavelmente menor.

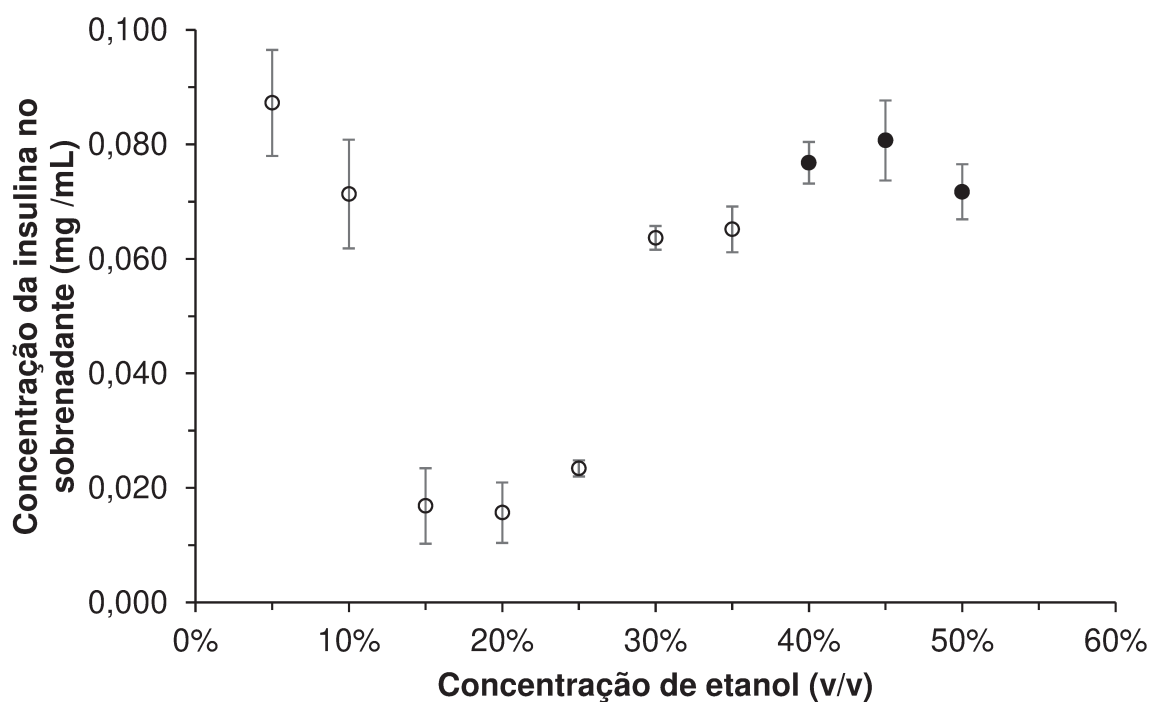


Figura 12 – Concentrações de insulina na fase líquida em sistema etanol-tampão fosfato 66 mmol/L pH 6,2 a 4,0°C (● e ○). A concentração de insulina do controle (0% etanol) foi 0,088 mg/mL. Barras de erro: desvio padrão amostral de precipitações realizadas em triplicata.

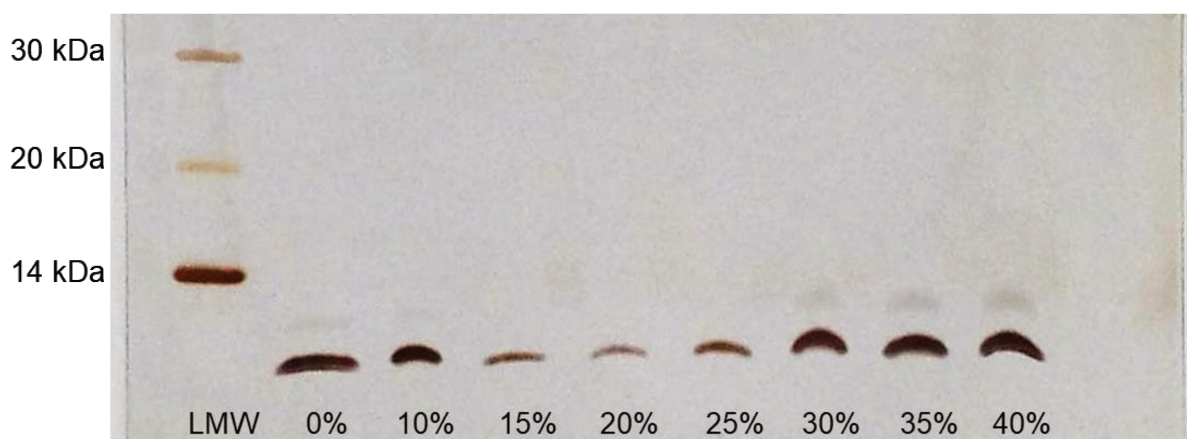


Figura 13 - SDS-PAGE dos sobrenadantes das precipitações de insulina com etanol a diferentes concentrações. LMW - marcador de baixa massa molecular; demais raias: sobrenadantes da precipitação na concentração de etanol indicada.

Parte dos sólidos adicionados ao tampão fosfato no preparo da solução de insulina para este ensaio não foram solubilizados, tendo sido descartados após a centrifugação. Isso implica que, antes da adição de qualquer volume de etanol, a solução já estava saturada. Como até a concentração de 20% de etanol a concentração de insulina no sobrenadante apresentou um perfil de queda, pode-se afirmar que os valores medidos correspondem à solubilidade da proteína em cada condição. O mesmo ainda pode ser considerado para as concentrações de etanol de 30 e 35%, visto que o teor de insulina no sobrenadante é visivelmente inferior à concentração inicial.

Visto que os pontos fechados (●) da Figura 12 apresentaram concentrações da proteína no sobrenadante próximas à inicial, não é possível afirmar que eles correspondem à solubilidade, fato corroborado pela ausência de sólidos após as precipitações e pelas intensidades das bandas desses pontos comparadas à banda da solução de insulina com 0% de etanol em eletroforese (Figura 13). Sendo a insulina solúvel em misturas água-etanol, sua solubilidade em concentrações de etanol iguais ou superiores a 40% pode ser superior à sua solubilidade no tampão escolhido.

Como já discutido, a insulina em solução coexiste na forma de monômeros e como dímeros, tetrâmeros e hexâmeros, cujas proporções dependem da sua concentração, do pH da solução, da presença de íons divalentes, da concentração de sais e de solventes orgânicos (Figura 3). Os resíduos de aminoácidos envolvidos nestas associações são os de natureza apolar (BRANGE, 1987). Sendo assim, o etanol em diferentes concentrações pode favorecer a formação de diferentes especiações em solução, as quais terão solubilidades diferentes. Segundo esta hipótese, no caso deste trabalho, as especiações estabelecidas nas concentrações de etanol entre 15-25% seriam menos solúveis que aquelas predominantes em concentrações menores, ou em concentrações maiores. Outra hipótese é a insulina formar sólidos com estruturas cristalinas e/ou composições diferentes (transição polimórfica) de acordo com a concentração de etanol, os quais podem apresentar solubilidades diferentes.

4.4. Precipitação de solução de lisozima de alta pureza com sementeira

O objetivo deste ensaio foi verificar o efeito da adição de sementes de liofilizado de lisozima à precipitação de uma solução da enzima com etanol. Os dados

gerados no experimento em questão estão resumidos na Tabela 5. Considerando os desvios apresentados, vê-se que não houve melhoria na recuperação provocada pela utilização da técnica de sementeira.

Tabela 5 – Balanço de massas da precipitação de solução de lisozima de alta pureza com sementeira

Condição	Massa inicial de lisozima (mg)	Massa de lisozima no sobrenadante (mg)⁽²⁾	Porcentual de lisozima não precipitada (%)
Controle	180	$117,1 \pm 15,2$	$34,9 \pm 8,5\%$
Sementeira	$185,4^{(1)}$	$118,8 \pm 0,8$	$35,9 \pm 2,3\%$

(1) Massa inicial de lisozima acrescida da massa da semente.

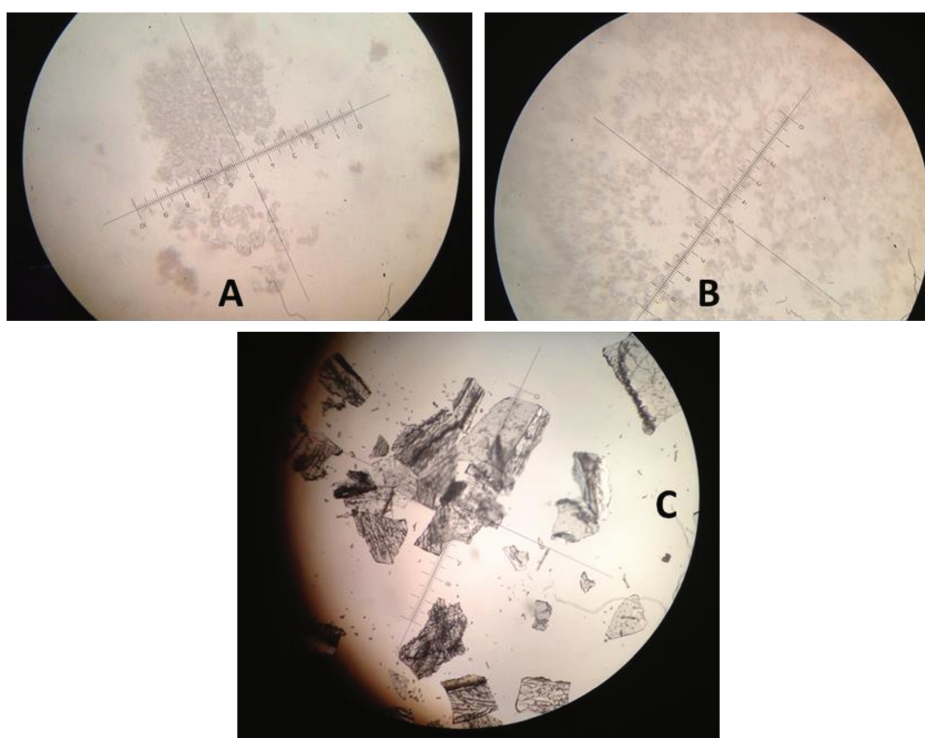


Figura 14 – Micrografias dos sólidos gerados na precipitação de solução de lisozima com etanol. (A) – controle, (B) – precipitação com semente de lisozima de alta pureza, (C) - micrografia dos cristais de lisozima utilizados como semente. Aumento de 400x.

Não foi observada diferença significativa entre os hábitos cristalinos dos precipitados gerados, como pode ser visto na Figura 14, ambos assumindo a forma de sólidos de baixa cristalinidade. Há notável diferença entre a semente e os sólidos

gerados na precipitação com seu uso. Isso indica que a semente pode ter se dissolvido ou, por ser consideravelmente maior que o precipitado, não estar em número suficiente para que fosse efetiva. Esse comportamento já foi reportado por Sousa *et al.* (1991), que adicionou cristais de T7 RNA polimerase a uma fase com precipitado amorfo e observou os primeiros perderem sua estrutura cristalina.

4.5. Caracterização do mix protéico por SDS-PAGE

A mistura de proteínas apresentava turvação durante toda a etapa de homogeneização do preparo do mix protéico, o que tornou necessária a adição de uma etapa de centrifugação para a separação de sólidos não solubilizados. De acordo com as solubilidades de cada proteína observadas no presente experimento, além do que se encontra na literatura, esperava-se que a lisozima e BSA, sendo bem solúveis em água, fossem completamente dissolvidas, enquanto a insulina, dosada em excesso, fosse o único componente presente na fração sólida da centrifugação. Entretanto ao submeter essa fração à análise de eletroforese, o resultado revelou que nenhuma das proteínas foi completamente solubilizada (Figura 15).

A raia correspondente aos sólidos não solubilizados da Figura 15 revela que a proporção de proteínas em solução foi similar à proporção de proteínas na fase sólida. A solubilidade de cada proteína, principalmente lisozima e BSA, foi amplamente afetada pela presença das demais, uma vez que a dosagem dessas proteínas (10 mg/mL) para o preparo do mix, foi substancialmente menor que sua solubilidade em água, tendo como valores de referência, por exemplo, 42 mg/mL da primeira a 4°C em 1% de NaCl (FORSYTHE; JUDGE; PUSEY, 1999) e superior a 585 mg/mL a 25°C para a última (KOZINSKI; LIGHTFOOT, 1972).

O fato de todas as proteínas componentes do mix estarem em excesso indica que o mesmo já está saturado para todas elas, de maneira que qualquer perturbação que cause a redução da solubilidade dos seus componentes, tal como a adição de etanol, já posicioná-las-á na zona metaestável de seu diagrama de fases.

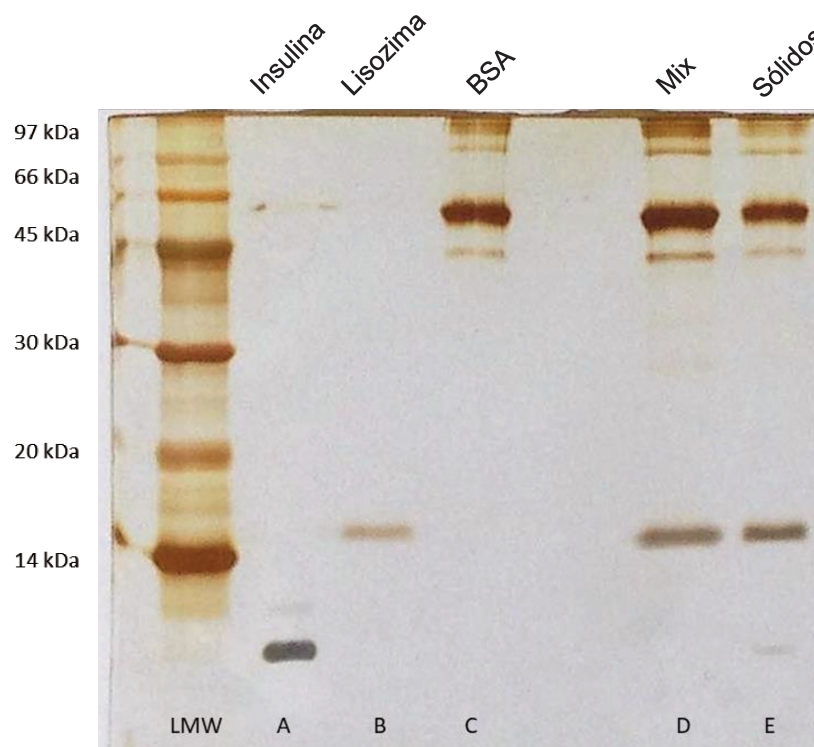


Figura 15 – Caracterização do mix proteico e sólidos não solubilizados. LMW - marcador de baixa massa molecular, A - solução de insulina sem diluição (0,05 mg/mL), B - solução de lisozima diluída 100 vezes (0,1 mg/mL), C - solução de BSA diluída 100 vezes (0,1 mg/mL), D - mix proteico diluído 50 vezes (0,25 mg/mL), E - sólidos não solubilizados do preparo do mix ressuspendidos 10 mL de tampão KH_2PO_4 66 mmol/mL pH 6,2, diluídos 5 vezes (0,2 mg/mL).

4.6. Precipitação da lisozima em mix proteico em volume constante

Antes de iniciar os experimentos de precipitação do mix com sementeira, foi considerado importante de estudar o comportamento de suas proteínas apenas mediante a presença do etanol. Dessa maneira, foi desenhado um experimento de precipitação que mantivesse os componentes do mix em volume constante, alterando apenas a concentração de etanol (Figura 16).

Os perfis de queda tanto da concentração de proteínas quanto da atividade volumétrica de lisozima (Figura 16) mostraram se bastante similares. Isso é um indício de que a enzima e as demais proteínas estão precipitando a proporções similares. Para melhor visualizar o comportamento de precipitação de cada proteína ao longo das diferentes concentrações de etanol, é importante analisar os dados acima em conjunto com o que foi revelado pelas análises de SDS-PAGE (Figuras 16 e 17).

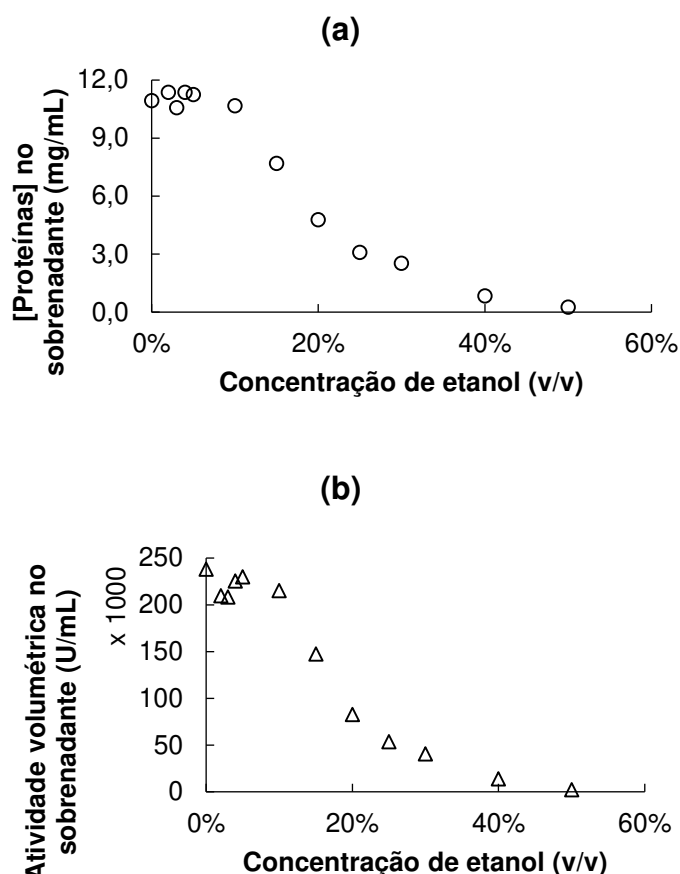


Figura 16 - Precipitação da lisozima em mix proteico em volume constante. (a) - variação na concentração de proteínas no sobrenadante, (b) - variação na atividade enzimática volumétrica do sobrenadante. Temperatura 4,0°C.

A mesma diluição (3 vezes) foi utilizada para todas as amostras aplicadas na eletroforese da Figura 17, para que a diferença entre a concentração de proteínas de cada amostra se mantivesse no gel. É visível que, com a exceção da insulina, a proporção entre lisozima, BSA e as bandas contaminantes se mantém até a concentração de etanol de 20%, a partir disso os últimos começam a precipitar em maior proporção, até que na concentração de 50% praticamente todas elas foram precipitadas. Também na Figura 17, é possível observar o mínimo de solubilidade que a insulina apresenta ao redor da concentração de 25% de etanol.

A Figura 18 ilustra de maneira mais clara a proporção de cada proteína nos sobrenadantes a diversas concentrações de etanol. As bandas da insulina estão ausentes nos pontos de concentração de etanol mais baixa pois seus respectivos sobrenadantes foram proporcionalmente mais diluídos, o que mostra que apenas uma pequena fração de toda essa proteína é solubilizada no preparo do mix, em

comparação com as outras proteínas escolhidas. Seu teor aumenta nas concentrações maiores de etanol, em que a mesma se torna mais solúvel, enquanto o oposto acontece com as demais.

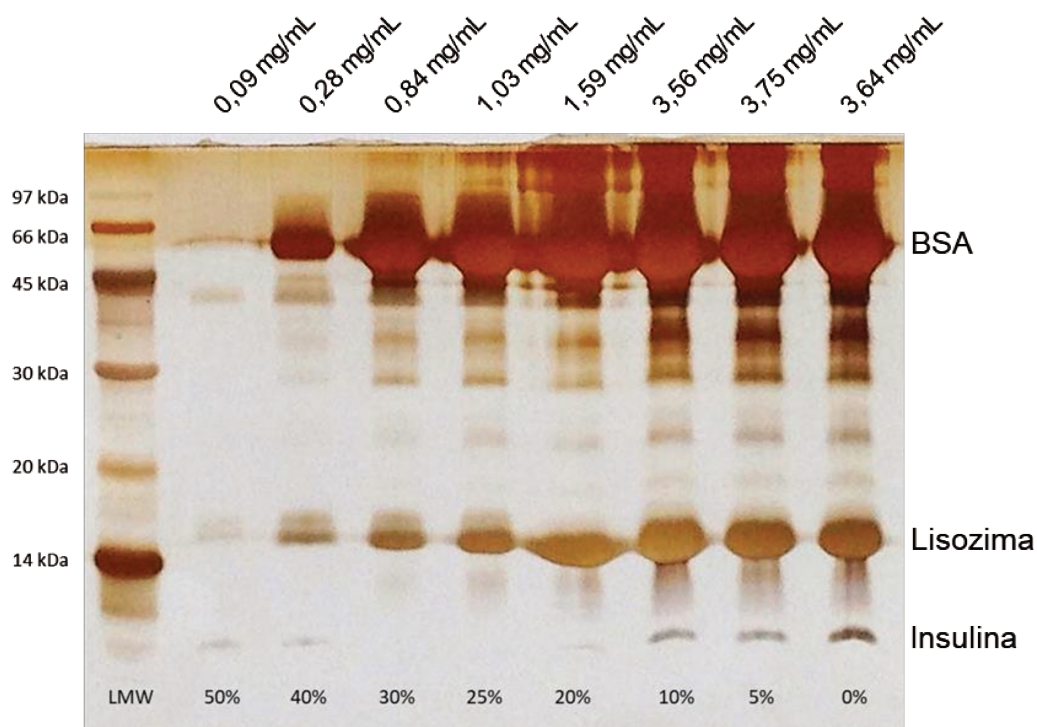


Figura 17 – Quantidade de proteínas em sobrenadantes provenientes da precipitação de mix proteico com etanol em volume fixo. Legenda: acima, concentrações de proteína das amostras inseridas em cada raia; abaixo, marcador de baixa massa molecular e concentrações de etanol em cada sobrenadante.

Com o aumento da quantidade de etanol utilizada na precipitação, podem ser visualizadas bandas de proteínas que, antes muito diluídas, passaram a compor uma parcela mais significativa do total, o que implica que a lisozima sofrerá o efeito oposto, se tornando proporcionalmente menos presente. Isso pode ser visualizado qualitativamente observando a redução do valor de atividade de lisozima específica dos sobrenadantes (Figura 19).

Os precipitados formados nesse experimento foram observados em microscópio ótico (Figura 20). Nas microscopias não foi detectada a presença de sólidos, mas sim de gotículas que se assemelham às fases líquidas densas que são citadas na literatura, tal como no mecanismo de nucleação em duas etapas. Segundo Muschol & Rosenberger (1997), a região do diagrama de fases de uma proteína onde

ocorre separação líquido-líquido é a mais propícia para o surgimento de precipitados. O fato de não terem sido observados sólidos nas micrografias da Figura 20 pode estar atrelada à temperatura na qual ela foi realizada (ambiente) não ser suficientemente para que os mesmos fossem estáveis.

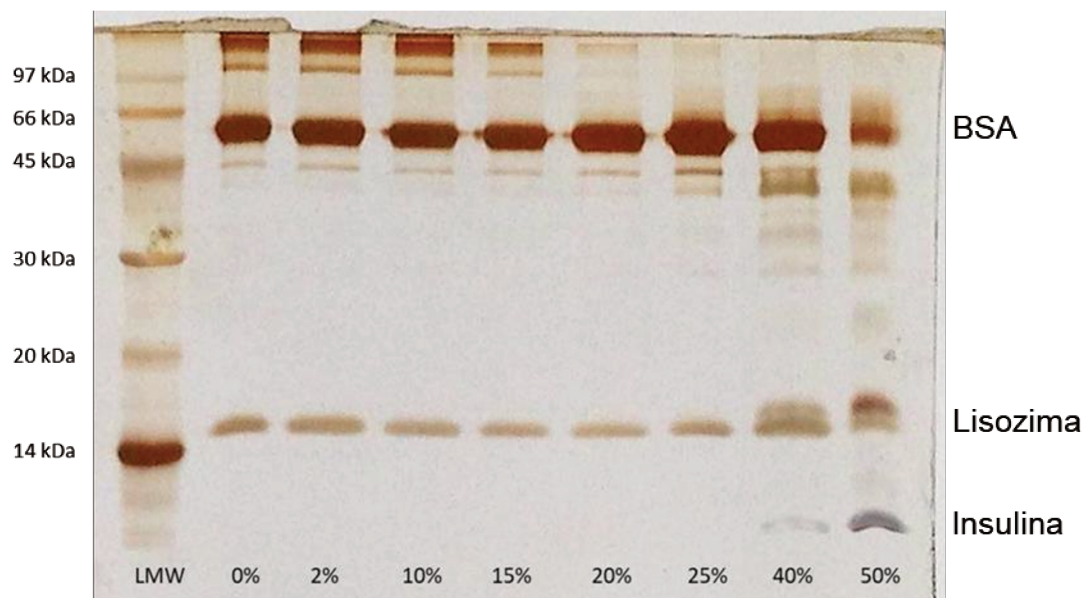


Figura 18 – Pureza das proteínas dos sobrenadantes provenientes da precipitação de mix proteico com etanol em volume fixo. Legenda: abaixo, marcador de baixa massa molecular (LMW) e concentrações de etanol em cada sobrenadante. Todos os sobrenadantes foram diluídos para a concentração de 0,26 mg/mL.

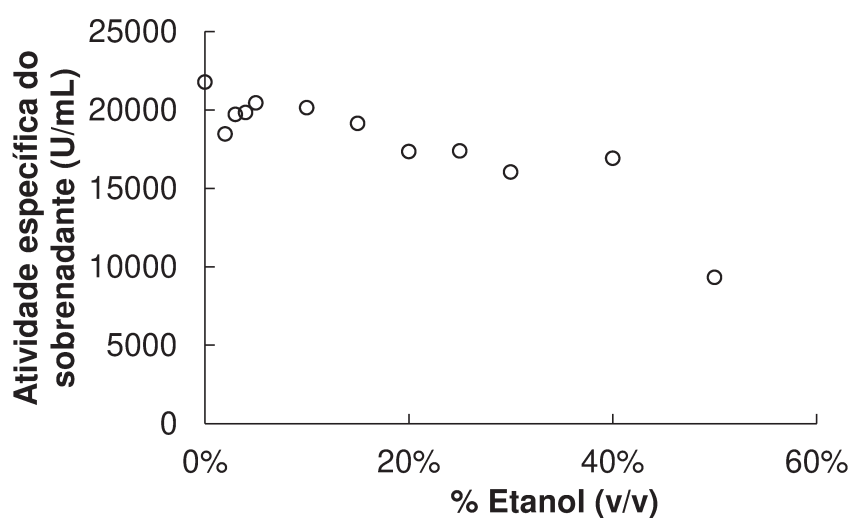


Figura 19 – Atividade específica de lisozima dos sobrenadantes provenientes da precipitação de mix proteico com etanol em volume fixo.

A primeira concentração de etanol em que foi observada turvação do meio foi em 4%, ao fim das 3 h do tempo de precipitação. Assim sendo, sabemos que esta concentração de etanol já é suficiente para levar o sistema à zona lábil do diagrama de fases, e que, provavelmente, as concentrações inferiores já podem deixá-lo supersaturado. Este acontecimento condiz bem com o fato do mix, sem qualquer adição de etanol, já está no limiar da saturação, uma vez que concentrações muito baixas do agente precipitante já precipitam as suas proteínas.

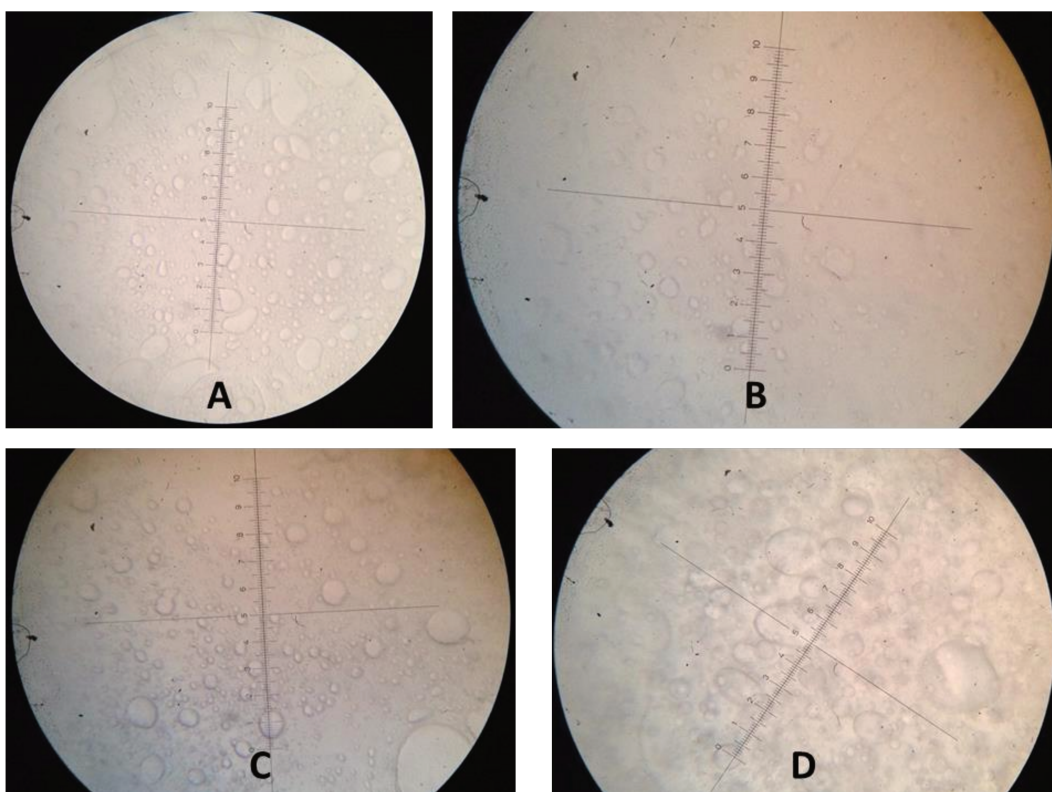


Figura 20 – Microscopias dos precipitados provenientes da precipitação de mix proteico com etanol em volume fixo. Precipitados gerados com: (A) - 25% de etanol, (B) - 30% de etanol, (C) - 40% de etanol, (D) - 50% de etanol. Aumento de 400x.

4.7. Determinação do ponto de turvação visual

Os pontos de turvação de soluções de insulina, lisozima e BSA, isoladamente, além do próprio mix, foram medidos (Tabela 6).

O ponto de turvação da insulina foi na mesma concentração de etanol em que foi observada a primeira queda na concentração da proteína no experimento para determinação de sua curva de solubilidade. O mesmo não aconteceu para as soluções de lisozima e BSA, em que os pontos de turvação visual foram em concentrações

inferiores às dos testes de solubilidade. O caso da lisozima é mais complexo, pode ter sido causado pela mudança de sistema estático para sistema agitado.

Tabela 6 – Turvações visuais de soluções proteicas

Solução⁽¹⁾	Concentração inicial (mg/mL)	Ponto de turvação (teor etanol v/v)
Insulina	0,05 ⁽²⁾	10,7 ± 1,3%
Lisozima	10,0	4,12 ± 2,1%
BSA	10,0	21,3 ± 3,5%
Mix	12,67 ⁽²⁾	7,75 ± 1,8%

(1): em tampão KH₂PO₄ 66 mmol/L pH 6,2.

(2): valores aferidos por A₂₈₀ devido à não solubilização completa de seus sólidos durante o preparo da solução.

O ponto de turvação do mix foi maior que o encontrado no experimento da sua precipitação com etanol em volume constante, além de ter sido maior que o valor encontrado para a lisozima. A primeira diferença pode ser decorrente da mudança de configuração de experimento de volume constante para volume variável, pois o segundo caso dilui o mix conforme o etanol é adicionado, de maneira que, para o mesmo volume de mix e uma mesma porcentagem do solvente, a concentração de proteínas (miligrama de proteína por mililitro de solução incluindo o etanol) na aferição do ponto de turvação é menor. Já a diferença entre os pontos de turvação da lisozima isolada e do mix pode ser explicada pelas mudanças nas características do meio causadas pela a adição de outras proteínas, que podem tornar a lisozima menos suscetível à precipitação com etanol.

A determinação do ponto de turvação mostrou-se propensa a erros, principalmente devido às baixas temperaturas em que foram feitas, o que causava o embaçamento das paredes do reator de vidro, dificultando a percepção da turvação. Com essa constatação, optou-se por fazer as medições de turvação seguintes no equipamento Crystal Eyes.

4.8. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza

Esse estudo foi realizado em reator agitado mecanicamente e temperatura controlada indiretamente pelo controle da temperatura do banho termostatizado. A

concentração inicial de proteínas do mix era 14,76 mg/mL, uma massa de liofilizado de lisozima equivalente a 5% do total de proteínas no reator foi adicionada como semente a uma concentração de etanol pouco abaixo do ponto de turvação visual do mix (6,3% de etanol v/v). A adição de semente foi dada como bem-sucedida, uma vez que foi possível observar seus sólidos em suspensão após serem transferidos para o reator. Após a semeadura, a concentração de etanol foi elevada para 30% (v/v). As micrografias dos precipitados (Figura 21) revelaram que, tanto na precipitação com semeadura quanto na condição controle, pôde ser observada tanto a formação de gotas de fase líquida densa (C1, C3 e S2), quanto de partículas sólidas (C2, S1 e S3). As amostras de precipitado deste experimento não preenchem completamente o espaço entre a lâmina de microscopia e a lamínula, como podem ser observado nos espaços vazios das imagens C1-3, S1 e S3.

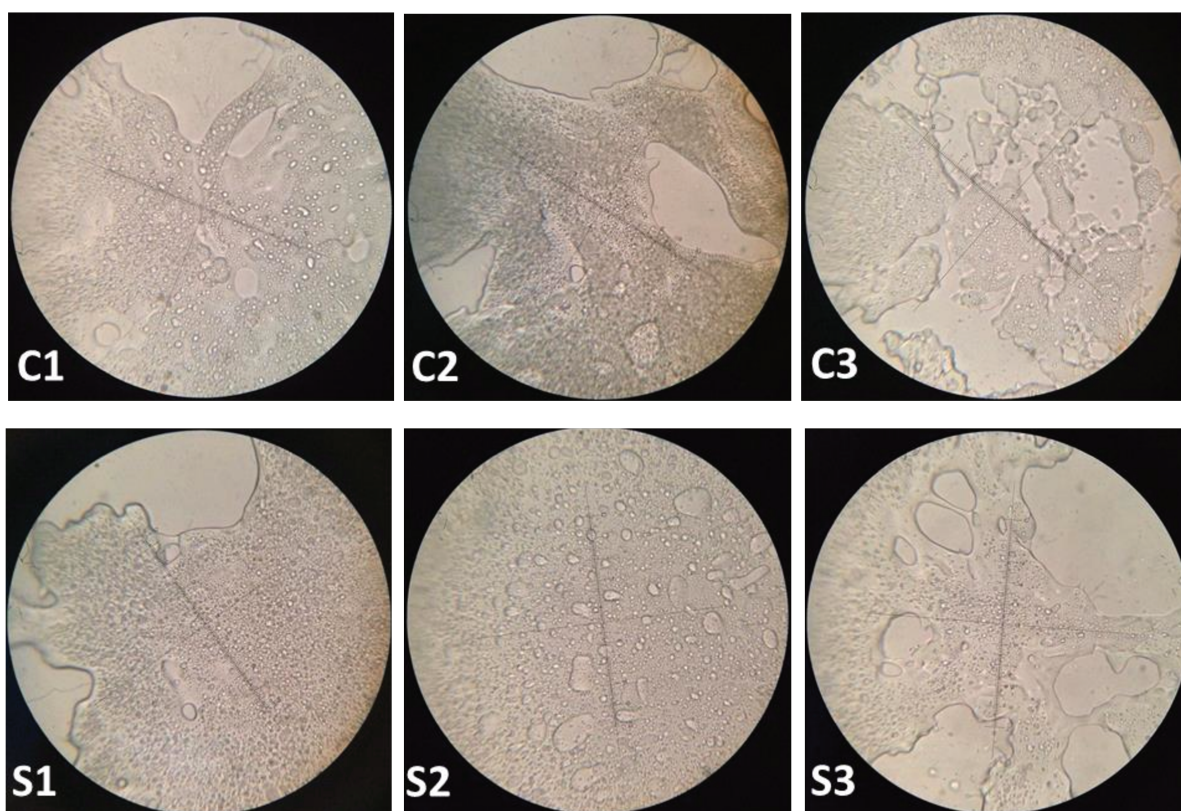


Figura 21 – Sólidos gerados na precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza. C1-3 - sólidos das precipitações controle, S1-3 - sólidos das precipitações com semeadura. Aumento de 400x.

Tal como na precipitação da solução de lisozima pura com semente e no trabalho de Costa (2016), a adição de sementes não teve efeito na recuperação de proteínas em relação ao controle. Este e outros dados estão contidos na Tabela 7.

Tabela 7 – Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza: proteína e atividade enzimática não precipitados.

Dados	Precipitação Controle	Precipitação com semeadura
Proteínas no sobrenadante (%)	21,6 ± 2,2	22,1 ± 1,3
Atividade não precipitada (%)	22,5 ± 2,8	21,5 ± 1,4
Atividade específica do sobrenadante (U/mg)	21.824 ± 1.190	22.735 ± 2.334

Ainda tratando da Tabela 7, vê-se que, considerando os desvios, não houve diferença significativa entre a atividade de lisozima não precipitada na precipitação com semente e na condição controle, indício de que a semente não favoreceu a migração das moléculas de lisozima da fase líquida para a fase sólida. Outro parâmetro que não foi afetado pela semente foi a atividade específica dos sobrenadantes, as quais, considerando os desvios apresentados, podem ser consideradas iguais. Tal resultado foi confirmado nas análises de eletroforese (Figura 22).

Neste experimento, não foi possível visualizar a banda correspondente à insulina, mesmo na banda do mix. Considerando que este foi preparado com uma quantidade menor da proteína que o habitual, 0,3 mg/mL, enquanto nos demais eram dosados 3,0 mg/mL na etapa de dissolução, uma possível explicação para a ausência da insulina no gel é o efeito da concentração inicial de proteínas na concentração da fase líquida em equilíbrio com a fase sólida. Dessa maneira, a solubilidade de 0,088 mg/mL da insulina em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2 a 4°C encontrada valeria apenas para a concentração inicial teórica de 3,0 mg/mL, enquanto para concentração menores, menor seria a solubilidade.

Com o uso da ponteira de 5 mL para a dosagem das sementes, foi observado que parte dos sólidos pesados ficava aderida ao interior da mesma, podendo ser uma fonte de erros para comparação com uma condição controle. Sendo assim, optou-se por alterar a metodologia de adição das sementes para o que foi

descrito no item 3.9, em que elas passaram a ser suspensas no próprio mix supersaturado para então serem transportadas para o interior do reator de precipitação.

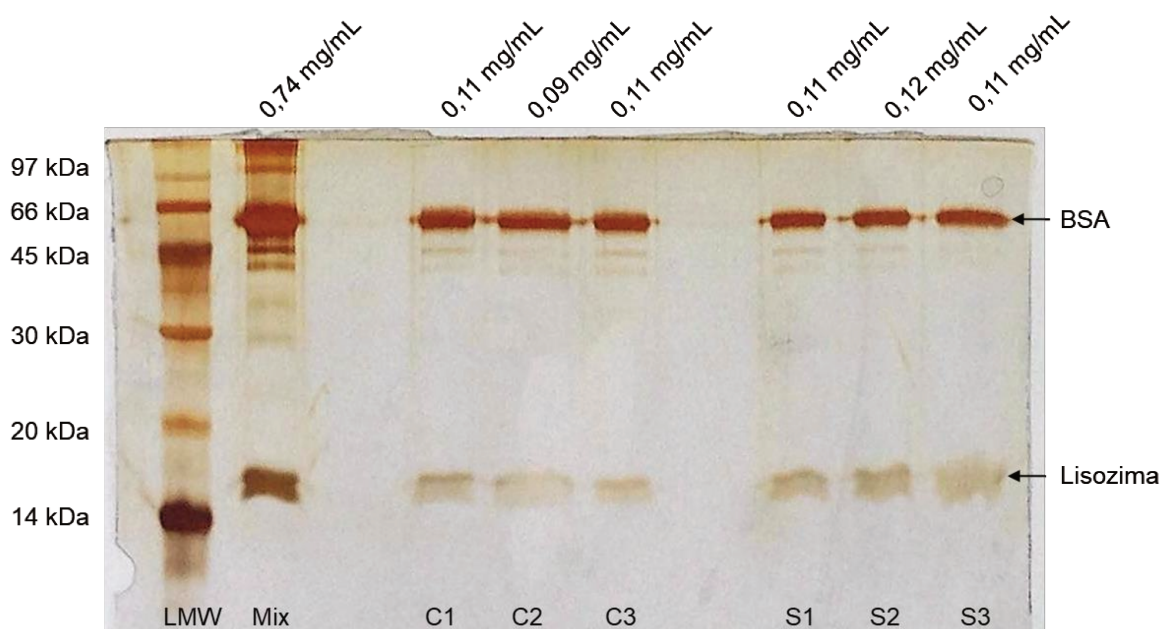


Figura 22 – Sobrenadantes provenientes da precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza. Abaixo: da esquerda para a direita, temos o marcador de massa molecular (LMW), mix proteico, sobrenadantes das precipitações controle (C1-3), sobrenadantes das precipitações com semente (S1-3). Acima: concentrações das amostras injetadas no gel.

O presente experimento não apresentou ganhos na recuperação de atividade enzimática comparado à condição controle sem semente, ao contrário do que obtido por Costa (2016), que obteve ganhos de recuperação de até 21%, mostrando a necessidade de entender o que pode ter prejudicado a eficácia da semente na precipitação do mix. O primeiro ponto levantado foi que, ao elevar a concentração de etanol (v/v) de 6 para 30%, o sistema foi levado direta e profundamente para a zona lábil do seu diagrama de fases, onde a nucleação primária é favorecida pelo elevado grau de supersaturação criado, havendo menos espaço para o crescimento dos núcleos adicionados. Com isso em mente, buscou-se estudar o comportamento das proteínas do mix a concentrações mais baixas de etanol, em que a supersaturação é menor, e, por consequência da equação 2.10, também será a taxa de nucleação.

4.9. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza em diferentes concentrações de etanol

Neste experimento as precipitações passaram a ser feitas no reator Crystal Eyes, o qual possui sensor de turbidez, que foi utilizado para aferir o ponto de turvação do meio. O sensor foi eficiente em detectar a turvação do meio, assim como a presença das sementes adicionadas pelo novo método, acontecimentos marcados pelo aumento da turbidez em relação ao valor de base (Figura 23). Na região (23.a) ocorre aumento da temperatura devido a adição do etanol até uma concentração pouco menor que o ponto de turvação. Na região (23.b), ocorreu a etapa de semeadura, onde pode ser observado um ligeiro aumento na turbidez e na temperatura. Já na região (23.c), foi dosado o restante do etanol até a concentração desejada, em que ocorre novo aumento de temperatura decorrente de sua adição e da turbidez, causado pela ocorrência de nucleação primária.

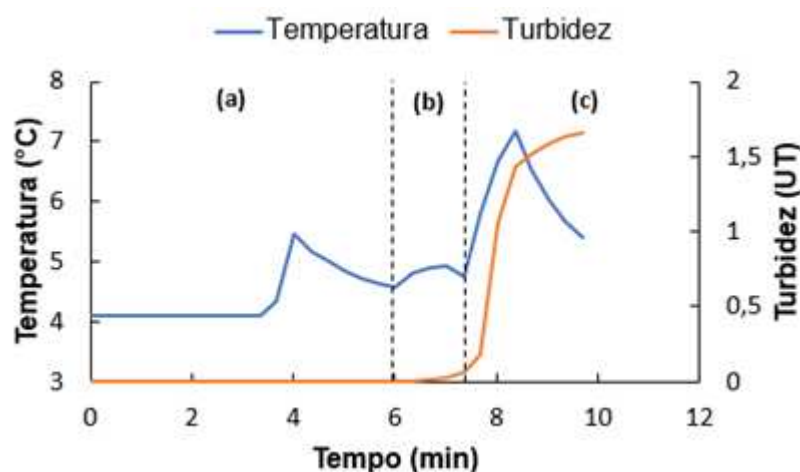


Figura 23 – Precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza em diferentes concentrações de etanol. Temperatura (azul) e turbidez (laranja). Concentração de proteínas do mix: 13,11 mg/mL. Massa de semente: aproximadamente 13 mg. Agitação: 900 rpm. Temperatura alvo: 4°C.

Os resultados de recuperação de proteínas e atividade de lisozima em cada fase para cada concentração de etanol estão listados na Tabela 8. Para uma melhor visualização, os mesmos dados também estão na Figura 24.

Tabela 8 – Recuperação de proteínas e de atividade de lisozima dos precipitados de mix proteico a diferentes concentrações de etanol.

Etanol (% v/v)	Controle		Semeadura	
	Recuperação proteínas (%)	Recuperação atividade (%)	Recuperação proteínas (%)	Recuperação atividade (%)
10%	6,9	4,5	10,5	7,6
15%	20,2	14,3	20,5	13,4
20%	41,6	31,2	46,2	31,9
25%	63,1	53,6	64	42,2

Cada precipitação foi realizada uma única vez.

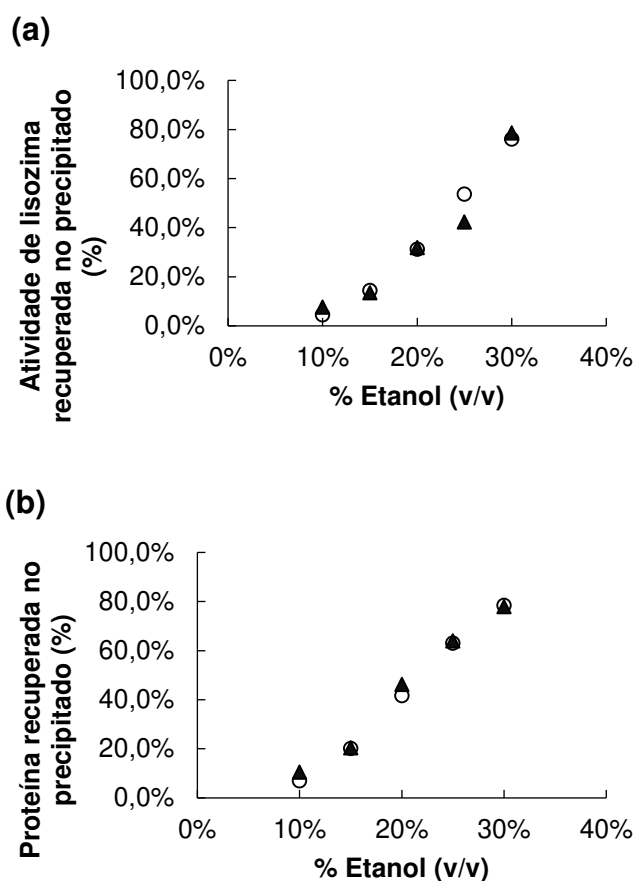


Figura 24 – Precipitação do mix proteico com diferentes concentrações de etanol. (a) - recuperação de proteínas no precipitado, (b) - recuperação de atividade de lisozima no precipitado. (○) - experimentos controle, (▲) - experimentos com semeadura. Os dados correspondentes à concentração de 30% de etanol são oriundos do experimento descrito no item 6.8.

A maior diferença de recuperação encontrada foi na concentração de 25% de etanol, em que a sementeura apresentou queda de 11,4% em relação ao controle. Entretanto, devido à ausência de replicatas e à grande variabilidade característica dos ensaios de atividade de lisozima, que segundo Klass *et al.* (1977) pode chegar a 12%, o resultado pode ser contestado. A eletroforese dos precipitados também dá suporte a este argumento, uma vez que, caso verdadeira, tamanha diferença na recuperação poderia ser vista na intensidade das bandas correspondentes à essa concentração (Figura 25). O ganho de rendimento propiciado pela sementeura na concentração de 10% de etanol parece ser mais coerente pois, apesar das mesmas fontes de desconfiância do resultado anterior, também apresentou aumento na recuperação de proteínas e uma banda de lisozima mais intensa em SDS-PAGE (Figura 25).

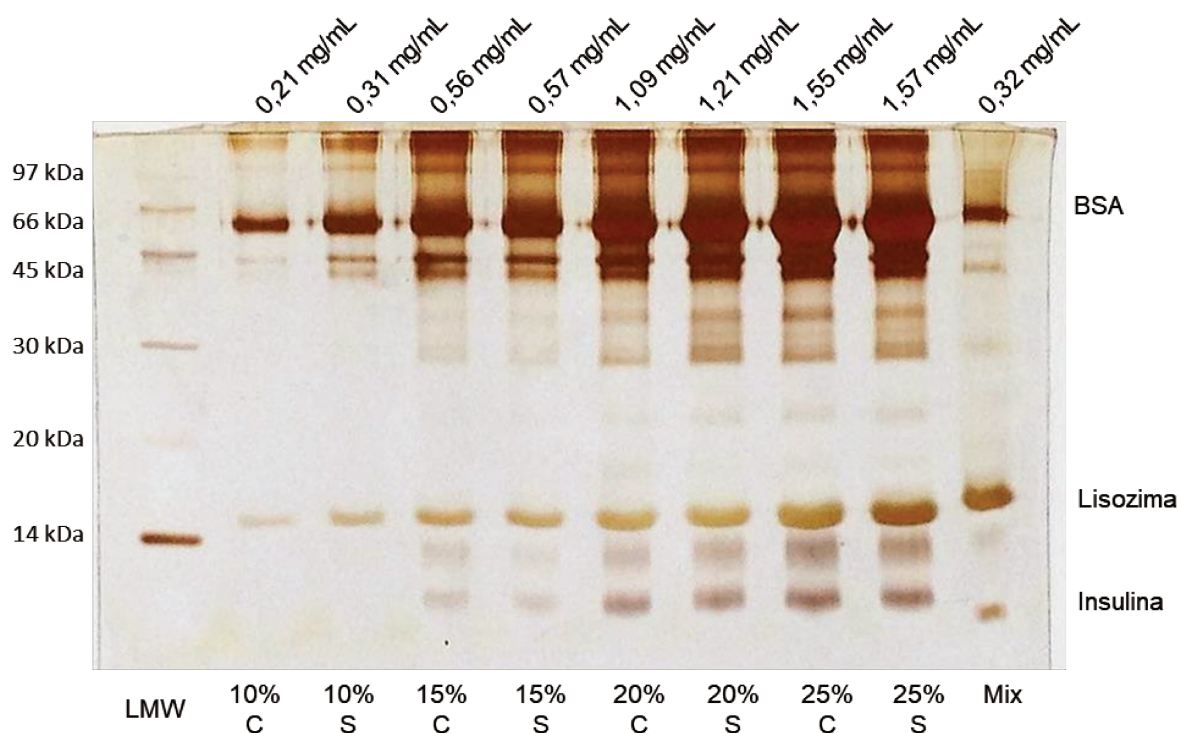


Figura 25 – SDS-PAGE dos precipitados da precipitação da lisozima de mix proteico com semente de alta pureza em diferentes concentrações de etanol. Legenda: abaixo, da esquerda para a direita, marcador de baixa massa molecular (LMW), precipitados provenientes da precipitação com a concentração indicada em condição controle (C) ou sementeura (S), mix proteico; acima, concentrações das amostras inseridas em cada poço. Amostras diluídas 4 vezes; exceto a amostra de mix, diluída 40x.

Os precipitados gerados em todas as concentrações, ao serem colocados na lâmina do microscópio, logo se redissolviam, o que impossibilitou sua visualização em microscópio ótico.

Novamente, não houve ganho de rendimento significativo com a aplicação da técnica de semeadura, embora a concentração de 10% de etanol tenha apresentado um resultado passível de ser verificado através da repetição do ensaio em triplicata. Mesmo reduzindo a concentração do agente precipitante em relação ao experimento anterior, ainda é possível que a supersaturação em um patamar que favoreça a nucleação em detrimento do crescimento das partículas da semente.

Sendo o trabalho de Costa (2016) a única referência encontrada até então do uso de semeadura na precipitação de proteínas, foram levantadas as principais características de seu procedimento e comparadas com a do presente trabalho, as quais estão listadas na Tabela 9, para que, através disso, pudessem ser encontradas possíveis variáveis que influenciem, e possivelmente favoreçam, o ganho de recuperação de atividade através do uso da técnica de semeadura na precipitação de proteínas.

Ao observar a Tabela 9 é possível notar três grandes diferenças entre os experimentos, além dos complexos proteicos. A primeira é a natureza da semente. Costa, ao utilizar como semente o próprio precipitado, acabou utilizando sólidos com estrutura cristalina e/ou composição muito mais semelhante ao sólido que seria gerado. Isto pode ter favorecido a efetividade da semeadura, uma vez que sementes com composições próximas à termodinamicamente favorecida pelo sistema podem favorecer a cristalização heterogênea, embora a taxas mais baixas, enquanto sementes com composição muito diferente podem agir como impurezas e suprimir a cristalização (ALLAHYAROV et al., 2015).

Outra diferença é a concentração inicial de proteínas de cada experimento, que no trabalho de Costa foi 100 vezes menor. Com isso, a solução é menos suscetível a entrar em uma região muito profunda da zona lábil do diagrama de fases e apresentará menores níveis de supersaturação, o que implica em taxas de nucleação mais baixas e maior possibilidade para haver crescimento das sementes.

Tabela 9 – Comparativo entre experimentos de precipitação de proteínas com etanol e semeadura

Característica	COSTA (2016)	Presente trabalho
Proteína-alvo	Xilanases	Lisozima
Meio	Fermentado proveniente da fermentação submersa do fungo <i>Aspergillus niger</i> em meio líquido centrifugado, com pH ajustado para 5,5 com tampão acetato, concentração final 0,2 mol/L.	Mistura de lisozima, BSA e insulina em tampão KH_2PO_4 66 mmol/L pH 6,2.
Concentração do agente precipitante utilizada	60-90% (v/v)	10-30% (v/v)
Sistema de precipitação	Reator de vidro, temperatura de 4,0°C controlada externamente, agitação mecânica de 150 rpm.	Reator de vidro, temperatura de 4,0°C controlada externamente, agitação mecânica de 150 rpm. Reator Crystal Eyes, temperatura de 4,0°C, agitação magnética de 900 rpm.
Semente	Sólidos liofilizados provenientes da precipitação do complexo enzimático com 90% de etanol.	Cristais de lisozima de alta pureza
Adição da semente	1,5% ou 3% da massa de proteínas no reator adicionados diretamente no seu interior. Abaixo ou acima do ponto de turvação.	5% da massa de proteínas no reator adicionados diretamente no seu interior ou a mesma quantidade suspensa no próprio meio supersaturado. Abaixo ou acima do ponto de turvação.
Concentração inicial de proteínas	0,1 mg/mL	11-13 mg/mL
Intervalo entre fim da dosagem de etanol e centrifugação	5 min	3 h

A última grande diferença é o tempo de precipitação utilizado. Em seu trabalho, Costa (2016) realizou cinéticas de precipitação com seu complexo enzimático, observando um aumento na quantidade de proteínas recuperada ao longo de 3 h. Entretanto, o autor, nos seus ensaios com semeadura, optou por amostrar o reator apenas 5 min após a concentração de etanol atingir o valor desejado, tempo que, segundo seus próprios resultados, é insuficiente para que o sistema atinja o equilíbrio. Isso leva à conclusão de que o ganho de recuperação obtido seja de natureza cinética, caso, por exemplo, as proteínas presentes no seu complexo enzimático possuam taxas diferentes de nucleação e crescimento.

4.10. Precipitação da lisozima de mix proteico com semente na forma de precipitado

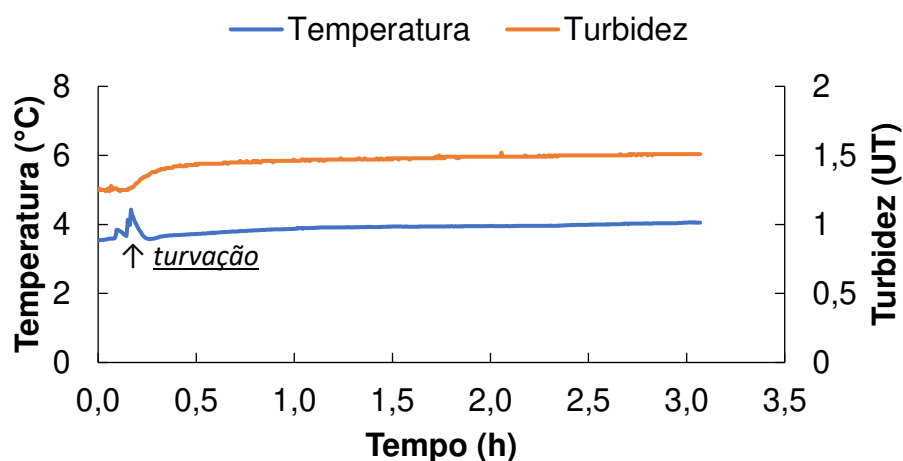
Com base no que foi discutido no item 4.9, foram elaborados experimentos que buscaram reduzir as diferenças entre o presente trabalho e o trabalho de Costa (2016), focando nos pontos que podem ter contribuído para que o autor obtivesse melhorias na recuperação de atividade enzimática e pureza do seu precipitado. Neste experimento, foram utilizadas sementes de lisozima precipitada com etanol, mesmo antissolvente utilizado na precipitação do mix, de maneira que elas possuíssem características mais próximas aos sólidos gerados na precipitação do sistema complexo. Além disso, após a semeadura não houve adição de etanol, para evitar que o sistema entrasse na zona lábil e, conseqüentemente, ocorresse nucleação primária.

Os dados de turbidez e temperatura registrado pelo software WinTOUCH do Crystal Eyes (do experimento controle e da precipitação com semeadura) podem ser visualizados na Figura 26.

Uma vez que houve a formação de uma nova fase no sistema, seja por nucleação (experimento controle) ou pela adição de sementes ao meio, a turbidez passou a crescer até quase alcançar um platô. A aproximação de um platô foi alcançada mais rapidamente no experimento controle, 2,5 h após a detecção da turvação. Nesta condição, o ganho de turbidez foi mais intenso, tendo o sistema alcançado 69% do seu incremento total da variável 0,28 h após a detecção da turvação, comportamento esperado em sistemas onde ocorre nucleação primária, uma vez que a supersaturação é consumida rapidamente. Já o experimento com semeadura atingiu seu platô de turbidez 2,8 h após a adição das sementes e, nas mesmas 0,28 h após a detecção da turvação, tinha atingido apenas 25% do seu

incremento total dessa variável, o que mostra que as taxas de formação de uma nova fase foram mais lentas em relação ao experimento controle. Este aumento na turbidez mais gradual indica o crescimento das sementes adicionadas.

(a)



(b)

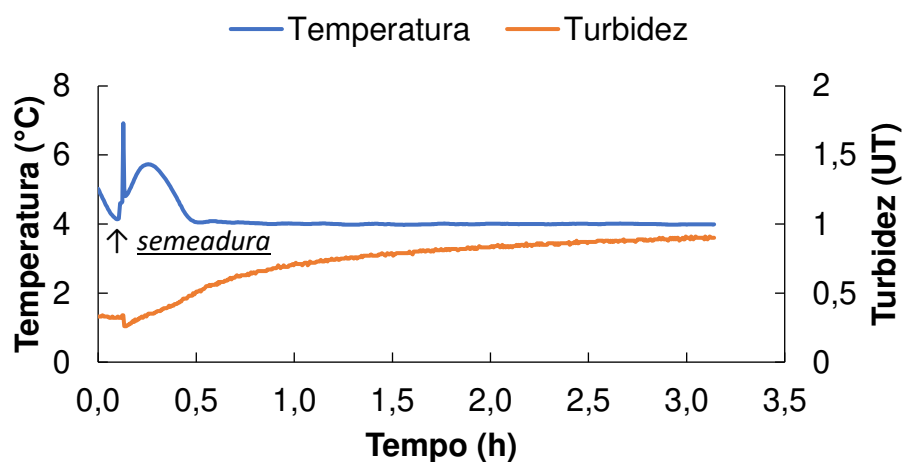


Figura 26 – Temperatura e turbidez ao longo do tempo nos experimentos de precipitação de mix proteico com etanol, condições controle (a) e com semente (b). O pico de temperatura no experimento (b) foi decorrente da remoção acidental do sensor de temperatura do sistema, a qual foi prontamente resolvida. Contração do mix: 13,35 mg/mL. Semente: aproximadamente 17 mg suspensos em 433 μ L de solução com 70% de etanol. Agitação: 900 rpm. Temperatura alvo: 4°C. Adição de etanol: 2,0% (a), 1,3% (b).

Os valores absolutos de turbidez não foram comparados, uma vez que este sensor não apresenta uniformidade nas suas medições. Isso pode ser atestado ao observar os valores iniciais desta variável antes de qualquer adição de etanol, que foram de 1,24 UT e 0,32 UT para, respectivamente, os experimentos controle e com semeadura, os quais são significativamente diferentes considerando que foi utilizado o mesmo lote de mix para ambas as condições. Dado que a única mudança entre as condições testadas foi a presença ou não de sementes, a diferença entre as taxas de aumento na turbidez entre elas pode ser explicada se os sólidos gerados por nucleação primária no experimento controle possuírem somados uma área superficial maior do que a massa de lisozima precipitada adicionada no experimento com semeadura.

As massas de proteína precipitadas e os percentuais de recuperação de proteínas e atividade de lisozima de cada condição estão listados na Tabela 10.

Tabela 10 – Recuperação de massa e atividade dos experimentos de precipitação do mix proteico

Balances	Controle	Semeadura*
Massa de precipitado (mg)	6,7	5,9
Proteína recuperada no precipitado (%)	2,4	2,1
Atividade de lisozima recuperada no precipitado (%)	5,9	4,8

* Massa de semente adicionada: 17 mg

O novo método empregado para a realização da semeadura, tal como os experimentos anteriores, não impactou na recuperação de proteínas ou de atividade de lisozima, como se pode ver pela pouca diferença entre os valores apresentados. Outro ponto importante a ser notado é que a massa de proteínas no precipitado do experimento com semeadura foi menor do que a massa de lisozima adicionada como semente, o que implica que pelo menos parte das sementes se dissolveram ao entrarem no sistema. As duas observações aqui apresentadas sugerem que os sólidos formados na precipitação dos componentes do mix são mais estáveis termodinamicamente do que a lisozima precipitada utilizada como semente, de maneira que a presença da última não teve influência no comportamento do sistema.

4.11. Determinação dos limites de turvação e de saturação do mix diluído e dopado com lisozima

O insucesso da utilização até então motivou algumas mudanças no sistema de precipitação. A primeira delas foi a decisão de aumentar a quantidade de lisozima no mix em relação às demais proteínas, para que o sistema se comportasse de maneira mais próxima a uma solução de lisozima de alta pureza. A segunda foi de trabalhar com uma concentração de proteínas menor visando reduzir a magnitude da supersaturação a ser gerada com a adição de etanol, resultando em taxas de nucleação primária mais baixas, o que é desejável ao empregar a técnica de semeadura.

Com as alterações acima, viu-se necessário determinar, para o mix diluído e dopado com diferentes concentrações de lisozima, os limites de turvação (evidência da ocorrência de nucleação primária) e de saturação (abaixo do qual a semente se dissolveria) a diferentes concentrações de etanol. O resultado destas medições está na Figura 27.

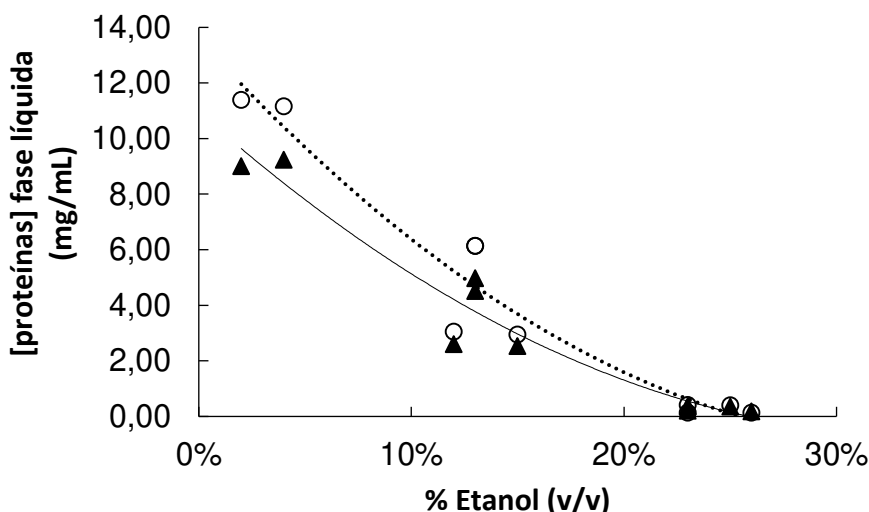


Figura 27 – Limites de turvação e de saturação para mix diluído (74,6 vezes) e dopado com lisozima em termos de concentração de proteínas na fase líquida. (○) – concentração de proteínas na turvação, (▲) – concentração de proteínas pós incubação. Foram ajustados polinômios de segundo grau apenas para visualização da tendência dos pontos, sem, contudo, emular nenhum comportamento. Linhas são guias visuais.

A Figura 27 mostra uma queda na concentração de proteínas na fase líquida de um sistema complexo quando o mesmo é elevado a uma concentração de etanol suficiente para favorecer a formação de uma nova fase. Os círculos abertos ($\circ$) foram calculados a partir das concentrações de proteína dos componentes utilizados no preparo inicial de cada solução e do volume de etanol necessário para que fosse atingida a turvação. A região entre os limites de turvação e de solubilidade seria uma área onde o sistema se encontra supersaturado, porém a nucleação primária não é favorecida, tal como a zona metaestável do diagrama de fases de uma substância pura, portanto, ideal para a adição de sementes.

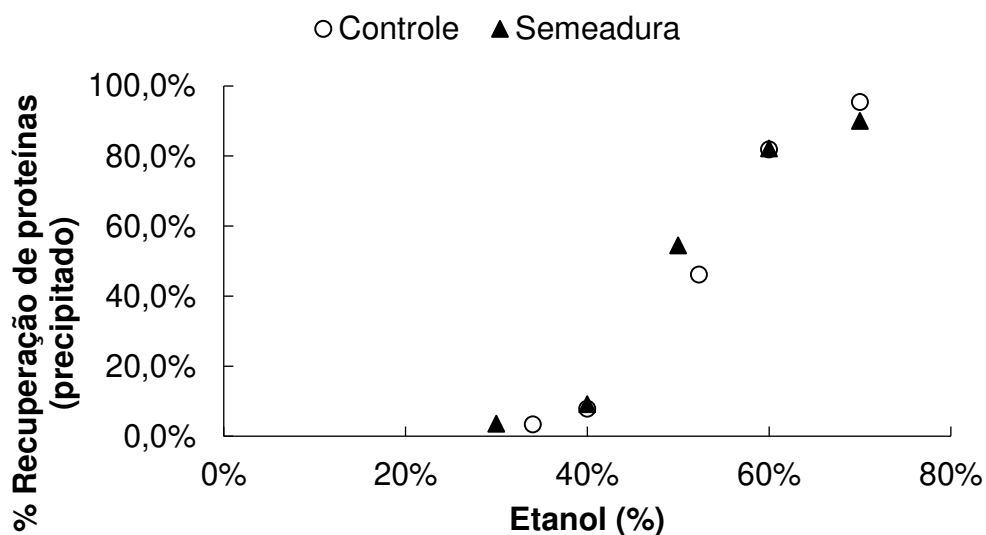
4.12. Precipitação de mix proteico diluído dopado com lisozima e semente de lisozima precipitada

As condições utilizadas neste experimento foram escolhidas visando minimizar ainda mais as diferenças do presente trabalho com o trabalho de Costa (2016). Assim como no seu trabalho com xilanases, foram utilizadas sementes compostas por precipitado proteico obtido com o mesmo solvente utilizado posteriormente na precipitação do sistema complexo, além disso, o reator foi amostrado 5 min após cada adição de etanol, o que permitiria verificar um possível efeito cinético da semeadura caso a mesma apresentasse o efeito desejado. Por último, a concentração de proteínas do sistema foi reduzida para a mesma ordem de grandeza do complexo enzimático utilizado por Costa, visando reduzir as altas taxas de nucleação causadas por supersaturações elevadas.

Os resultados de recuperação de proteínas e atividade de lisozima em cada fase para cada concentração de etanol estão listados na Figura 28 e Tabela 11. Ambas mostram que a adição das sementes à precipitação não teve efeito na recuperação de proteínas, tampouco na recuperação de atividade enzimática. Para explicar a ineficiência da semente no experimento em questão, foram levantadas três hipóteses. A primeira é decorrente da observação de que, segundo a Figura 27, a largura da região de metaestabilidade do sistema para essa concentração de proteínas seria muito pequena tal que as curvas de turvação e saturação neste ponto praticamente se sobrepõem. Com isso, mesmo com a adição das sementes o mais próximo do ponto de turvação do sistema que o sensor de turbidez do reator Crystal Eyes permitia, elas podem ter se dissolvido ao entrar em contato com o sistema. Isso

pode ser observado no comportamento da turbidez apresentado na Figura 29, na qual se pode observar o seu aumento logo após a realização da semeadura, seguido de sua queda até o valor de base 5 min após a adição da lisozima precipitada.

(a)



(b)

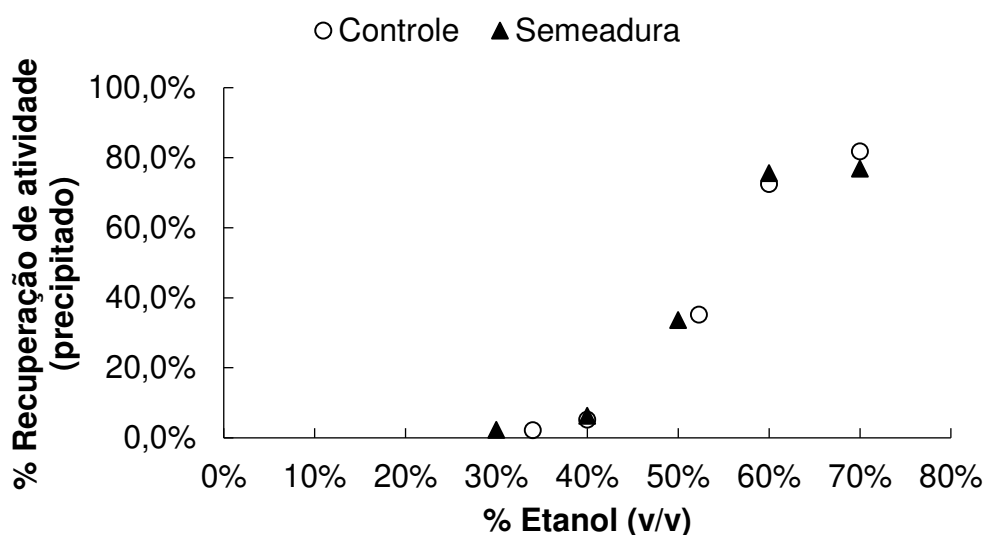


Figura 28 – Recuperação de proteínas (a) e de atividade de lisozima (b) dos precipitados de mix proteico diluído e dopado com lisozima a diferentes concentrações de etanol. Concentração inicial de proteínas: 0,56 mg/mL. Massa de semente: 0,57 mg. Temperatura: 4°C. Agitação: 900 rpm.

Tabela 11 - Recuperação de proteínas e de atividade de lisozima dos precipitados de mix proteico diluído e dopado com lisozima a diferentes concentrações de etanol

Etanol (% v/v)	Controle		Semeadura	
	Recuperação proteínas (%)	Recuperação atividade (%)	Recuperação proteínas (%)	Recuperação atividade (%)
30	-	-	3,5	2,3
34	3,3	2,2	-	-
40	7,9	5,2	9,1	6,4
50	-	-	54,4	33,6
52,3	46,1	35,3	-	-
60	81,9	72,5	82,1	75,7
70	95,4	81,8	90,0	76,9

Cada precipitação foi realizada uma única vez.

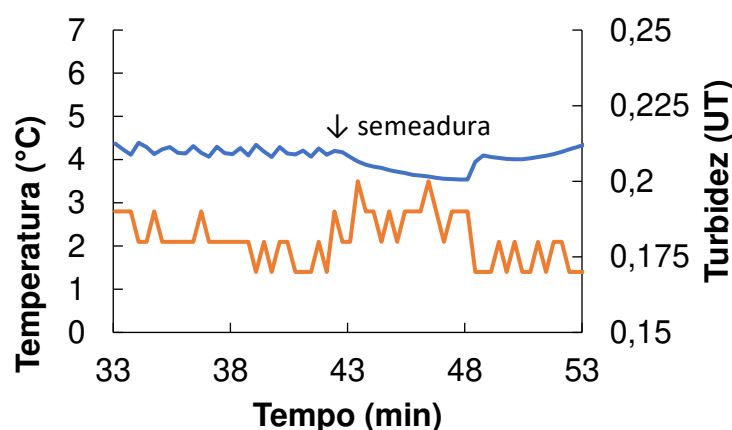


Figura 29 – Temperatura (azul) e turbidez (laranja) ao redor de 10 min da adição da semente nos experimentos de precipitação de mix proteico diluído e dopado com lisozima a diferentes concentrações de etanol.

Ainda que tenha sido observado o comportamento da turvação apresentado acima, não se pode afirmar que 100% das sementes adicionadas foram dissolvidas, uma vez que não se sabe sobre o menor tamanho de núcleo que o sensor de turbidez do Crystal Eyes é capaz de detectar. Portanto, a segunda hipótese levantada para explicar a ineficiência do emprego da semeadura é a mesma levantada no item 4.10, quando se considerou que os sólidos gerados na precipitação das proteínas do sistema complexo sejam mais estáveis que os adicionados como semente. Por último, o fato das dosagens de etanol terem sido feitas em um intervalo

curto de tempo e em incrementos de 10% pode ter levado o sistema para a região lábil de seu diagrama de fases, resultando na ocorrência de nucleação primária mesmo com a presença de sólidos previamente formados no sistema. Isto, como foi discutido no item 2.2.4, minimiza o efeito da sementeira.

Com este último experimento, tem-se que todas as tentativas do uso da técnica de sementeira na precipitação da lisozima em sistema complexo não reproduziram o aumento na recuperação de atividade enzimática que Costa (2016) obteve em seu trabalho com xilanases, mesmo quando foram utilizadas condições muito favoráveis, como as do experimento 3.10, em que o mix certamente estava saturado e o sistema não foi levado à zona lábil de seu diagrama de fases em nenhum momento. Isso leva a crer que a causa mais provável da ineficiência da sementeira é a semente de lisozima de alta pureza ser menos estável do que o sólido formado na precipitação das proteínas do mix, para todas as formas de semente e estratégias de adição testadas.

Motivos para a maior estabilidade termodinâmica do precipitado dos componentes do mix podem estar relacionados com propriedades inerentes a este sistema, tais como a interação das proteínas do mix entre si. Analisando o pI de cada uma, se vê que a lisozima (pI igual a 11,35) possuirá um excesso de cargas positivas no pH utilizado na precipitação (6,2), enquanto insulina (pI igual a 5,3) e BSA (pI igual a 4,9) possuirão excesso de cargas negativas, o que favorece que a primeira tenha interações eletrostáticas com as últimas, ao mesmo tempo que interações lisozima-lisozima seriam desfavorecidas por repulsão eletrostática. Essas interações são favorecidas com a diminuição da constante dielétrica causada pela adição de etanol ao meio. Independente da natureza dessas interações entre as proteínas selecionadas, o fato de que no preparo do mix a solubilidade de seus componentes é profundamente afetada, como foi discutido no item 4.5, é uma evidência de que esse é um fenômeno presente e significativo neste sistema.

Dessa maneira, os componentes do sistema estudado por Costa (2016) podem ter um perfil de interações diferentes, que tornassem o precipitado gerado na precipitação das proteínas de seu complexo enzimático menos estáveis termodinamicamente do que os sólidos que o autor utilizou como semente, fazendo com que o uso da sementeira para este caso tenha sido efetivo para a recuperação de atividade enzimática.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

A principal conclusão deste trabalho foi que o precipitado formado na precipitação do mix com etanol se mostrou como uma fase líquida, levando a crer que o mecanismo de nucleação nesse sistema ocorre em duas etapas, fenômeno observado em sistemas proteicos. Além disso, a técnica de semeadura utilizada não teve impacto na recuperação de atividade de lisozima nos sistemas complexos propostos, levantando possíveis variáveis que influenciem tal fenômeno, sendo elas:

- (i) A forma da semente, que pode favorecer ou desfavorecer a cristalização, de acordo com sua estabilidade termodinâmica em comparação com a do sólido a ser formado na precipitação, sendo que a última pode ser influenciada pelos componentes do meio e por fatores ambientais, tais como o pH do meio;
- (ii) A concentração inicial de proteínas precipitadas, a qual, estando baixa, pode levar a supersaturações menores que favoreçam o crescimento das sementes. Em contrapartida, supersaturações elevadas acabam favorecendo a nucleação primária, tornando a presença da semente insignificante;
- (iii) O ganho de recuperação de atividade pode ser de natureza cinética, favorecido por tempos de precipitação da ordem de minutos.

Como conclusões secundárias, foi visto que a solubilidade da insulina apresentou um mínimo em função da concentração de etanol, fenômeno até então não reportado na literatura para essa proteína, possivelmente causado pela influência que a quantidade do solvente pode ter na formação de diversas especiações da proteína ou pela formação de sólidos com diferentes estruturas cristalinas e/ou composição de acordo com o teor do agente precipitante.

O efeito da concentração inicial também se mostrou presente na dissolução da insulina no mix proteico, em que uma maior dosagem de proteínas permitiu que

uma quantidade maior da mesma fosse solubilizada. Isso é um indício de que este fenômeno pode estar presente nos mais diversos casos de equilíbrio sólido-líquido envolvendo proteínas, sem depender da presença de um agente precipitante.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

- (i) Traçar o diagrama de fases da lisozima em sistema água/etanol. Analisar a variação da concentração da enzima na fase líquida ao longo do tempo até que seja atingido o equilíbrio termodinâmico. Acompanhar possíveis transições polimórficas do sólido ao longo do tempo até que seja estabelecida a conformação mais estável.
- (ii) Estudar a influência do pH no diagrama de fases da lisozima em sistema tampão/etanol.
- (iii) Verificar a influência da adição de sementes de lisozima precipitada na zona metaestável do diagrama de fases da proteína em sistema tampão/etanol em diversas faixas de pH.

6. REFERÊNCIAS

ALLAHYAROV, E. et al. Crystallization seeds favour crystallization only during initial growth. **Nature communications**, v. 6, p. 7110, 15 maio 2015.

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Theory of Protein Solubility. **Methods in Enzymology**, v. 114, n. 1956, p. 49, 1985.

ASHERIE, N. Protein crystallization and phase diagrams. **Methods**, v. 34, n. 3, p. 266–272, 2004.

BAKER, B. Y. et al. Crystallization of proteins from crude bovine rod outer segments. **Methods in Enzymology**, v. 557, n. March 2014, p. 439–458, 2015.

BECKER, T.; LAWLIS, V. B. **Subtilisin crystallization process**. Genencor International Inc., , 1990.

BERGFORS, T. Seeds to crystals. **Journal of Structural Biology**, v. 142, n. 1, p. 66–76, 2003.

BONNETE, F.; FINET, S.; TARDIEU, A. Second virial coefficient : variations with lysozyme crystallization conditions. **Journal of Crystal Growth**, v. 196, p. 403–414, 1999.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRANGE, J. **Galenics of Insulin : the Physico-chemical and Pharmaceutical Aspects of Insulin and Insulin Preparations**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1987.

BURGESS, R.; DEUTSCHER, M. **Guide to protein purification**. 2nd. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2009.

CACIOPPO, E.; MUNSON, S.; LEE PUSEY, M. Protein solubilities determined by a

rapid technique and modification of that technique to a micro-method. **Journal of Crystal Growth**, v. 110, n. 1–2, p. 66–71, 1991.

CANFIELD, R. E. The amino acid sequence of egg white lysozyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 238, n. 8, p. 2698–2707, 1963.

CARBONE, M. N.; JUDGE, R. A.; ETZEL, M. R. Evaluation of a model for seeded isothermal batch protein crystallization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 84–90, 2005.

CHAYEN, N. E.; SARIDAKIS, E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. **Nature Methods**, v. 5, n. 2, p. 147–153, 2008.

CHEN, Q. et al. Precipitation of heavy metals from wastewater using simulated flue gas: sequent additions of fly ash, lime and carbon dioxide. **Water Research**, v. 43, n. 10, p. 2605–2614, 2009.

CHRISTOPHER, G. K.; PHIPPS, A. G.; GRAY, R. J. Temperature-dependent solubility of selected proteins. **Journal of Crystal Growth**, v. 191, n. 4, p. 820–826, 1 ago. 1998.

COHN, E. J. et al. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 3, p. 459–475, mar. 1946.

CONWAY-JACOBS, A.; LEWIN, L. M. Isoelectric focusing in acrylamide gels: Use of amphoteric dyes as internal markers for determination of isoelectric points. **Analytical Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 394–400, 1 out. 1971.

COSTA, M. A. L. **Estudo da precipitação com etanol de xilanases de complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido e fermentação submersa**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2016.

DAVIES, R. C.; NEUBERGER, A.; WILSON, B. M. The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. **Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology**, v. 178, n. 2, p. 294–305, 1969.

DE WIT, J. N. Thermal Stability and Functionality of Whey Proteins. **Journal of Dairy**

Science, v. 73, n. 12, p. 3602–3612, dez. 1990.

DORAN, P. **Bioprocess Engineering Principles**. 2nd. ed. Waltham, MA: Academic Press, 2013.

DURRANT, A. E. et al. Review of the Feasibility of Recovering Phosphate from Wastewater for Use as a Raw Material by the Phosphate Industry. **Environmental Technology**, v. 20, n. 7, p. 749–758, 11 jul. 1999.

DUTRIZAC, J. E. The effect of seeding on the rate of precipitation of ammonium jarosite and sodium jarosite. **Hydrometallurgy**, v. 42, n. 3, p. 293–312, 1996.

DUTRIZAC, J. E. The effectiveness of jarosite species for precipitating sodium jarosite. **JOM**, v. 51, n. 12, p. 30–32, dez. 1999.

FENG, D.; ALDRICH, C.; TAN, H. Treatment of acid mine water by use of heavy metal precipitation and ion exchange. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 6, p. 623–642, 1 jun. 2000.

FORSYTHE, E. L.; JUDGE, R. A.; PUSEY, M. L. Tetragonal Chicken Egg White Lysozyme Solubility in Sodium Chloride Solutions. 1999.

HAIRE, L. F.; BLOW, D. M. **A novel spin filter method for the measurement of solubility**. Journal of Crystal Growth. **Anais...**2001

HARDY, W. B. Colloidal solution. The globulins. **The Journal of Physiology**, v. 33, n. 4–5, p. 251–337, 30 dez. 1905.

HARRISON, R. et al. **Bioseparations science and engineering**. 2nd. ed. New York, NY: Oxford University Press, 2015.

HEKMAT, D. Large-scale crystallization of proteins for purification and formulation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 7, p. 1209–1231, 21 jul. 2015.

HIRAYAMA, K. et al. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, n. 2, p. 639–646, 14 dez. 1990.

JACOBSEN, C.; GARSIDE, J.; HOARE, M. Nucleation and growth of microbial lipase crystals from clarified concentrated fermentation broths. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 6, p. 666–675, 20 mar. 1998.

JOLLÈS, P. Lysozymes: A Chapter of Molecular Biology. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 8, n. 4, p. 227–239, 1 abr. 1969.

JUDGE, R. A.; FORSYTHE, E. L.; PUSEY, M. L. The effect of protein impurities on lysozyme crystal growth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 6, p. 776–785, 20 set. 1998.

JUDGE, R. A.; JOHNS, M. R.; WHITE, E. T. Protein purification by bulk crystallization: The recovery of ovalbumin. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, n. 4, p. 316–323, 20 nov. 1995.

KLASS, H. J. et al. The Estimation of Serum Lysozyme: of Four Assay Methods A Comparison. **Biochemical Medicine**, v. 18, n. 1, p. 52–57, 1 ago. 1977.

KOYAMA, H. et al. Effect of Seed Particles on Precipitation of Weak Base Drugs in Physiological Intestinal Conditions. **Molecular Pharmaceutics**, p. acs.molpharmaceut.6b00297, 2016.

KOZINSKI, A. A.; LIGHTFOOT, E. N. Protein ultrafiltration: A general example of boundary layer filtration. **AIChE Journal**, v. 18, n. 5, p. 1030–1040, 1 set. 1972.

KUNDU, S.; ASWAL, V. K.; KOHLBRECHER, J. Effect of ethanol on structures and interactions among globular proteins. **Chemical Physics Letters**, v. 670, p. 71–76, 16 fev. 2017.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEWIS, A. E. et al. **Industrial crystallization: Fundamentals and applications**. 1st. ed. Cambridge: Cambridge University Prtess, 2015.

LI, H.; YANG, H.; CHEN, G. Catalytic performance of biological method seeds on jarosite process. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 26, n. 2, p. 557–564, fev. 2016.

LIU, W. et al. Effect of alcohols on aqueous lysozyme–lysozyme interactions from static light-scattering measurements. **Biophysical Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 289–298, 15 fev. 2004.

LIU, Y.; WANG, X.; CHING, C. B. Toward Further Understanding of Lysozyme

Crystallization: Phase Diagram, Protein-Protein Interaction, Nucleation Kinetics, and Growth Kinetics. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 2, p. 548–558, 2010.

LORBER, B. et al. The influence of impurities on protein crystallization; the case of lysozyme. **Journal of Crystal Growth**, v. 128, p. 1203–1211, 1993.

LOUREIRO, J. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS. **Actas de Bioquímica**, v. 5, p. 97–109, 1991.

MARKETSANDMARKETS. **Protein Expression Market by Expression Systems (Mammalian, Prokaryotic, Baculovirus, Yeast), by Products (Expression Vector, Service, Reagent), by Application (Industrial, Therapeutic) by End User (Pharmaceutical, Biotechnology, CRO) - Global Forecast**. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/protein-expression-market-180323924.html>>. Acesso em: 1 set. 2016.

MBAMBA, C. K. et al. A generalised chemical precipitation modelling approach in wastewater treatment applied to calcite. **Water Research**, v. 68, p. 342–353, 1 jan. 2015.

MELLANBY, J. Globulin. **The Journal of Physiology**, v. 33, n. 4–5, p. 338–373, 30 dez. 1905.

MORENO, E. C. et al. Precipitation of Hydroxyapatite From Dilute-Solutions Upon Seeding. **Calcified Tissue Research**, v. 24, n. 1, p. 47–57, 1977.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 307–310, 1 nov. 1981.

MUSCHOL, M.; ROSENBERGER, F. Liquid–liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization. **The Journal of Chemical Physics**, v. 107, 4 jun. 1997.

MYERSON, A. **Handbook of industrial crystallization**. 2nd. ed. Woburn, MA: Butterworth-Heinemann, 2002.

NC-IUB. Units of Enzyme Activity Recommendations 1978. **European Journal of Biochemistry**, v. 7, p. 319–320, 1978.

NELSON, C. D.; GLATZ, C. E. Primary particle formation in protein precipitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 10, p. 1434–1444, 1 out. 1985.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: Macmillan, 2009.

NORTHROP, J. H. Crystallization of pepsin from alcohol. **The Journal of General Physiology**, v. 30, n. 2, p. 177–184, 1946.

OSS, C. J. VAN. On the mechanism of the cold ethanol precipitation method of plasma protein fractionation. **Journal of Protein Chemistry**, v. 8, n. 5, p. 661–668, out. 1989.

PETSEV, D. N. et al. Thermodynamic Functions of Concentrated Protein Solutions from Phase Equilibria. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 16, p. 3921–3926, 2003.

PINHEIRO, M. J. **Estudos de equilíbrio de fases de enzimas em soluções aquosas de solventes orgânicos**. [s.l.] Unicamp, 2016.

PINHEIRO, M. J. et al. Solubility of lysozyme in aqueous solution containing ethanol or acetone: Unexpected dependence on the initial protein concentration. **Fluid Phase Equilibria**, v. 429, p. 9–13, 15 dez. 2016.

PUTNAM, F. **The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control**. 2nd. ed. Orlando: Academic Press, 1984.

RADOLA, B. J. Isoelectric focusing in layers of granulated gels: I. Thin-layer isoelectric focusing of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, v. 295, n. 2, p. 412–428, 21 fev. 1973.

ROSENBERGER, F. et al. Temperature dependence of protein solubility — determination and application to crystallization in X-ray capillaries. **Journal of Crystal Growth**, v. 129, n. 1, 1993.

ROUVINEN, J. et al. Three-Dimensional Structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 249, n. 4975, p. 1359–1359, 21 set. 1990.

RUSSEL, E.; WANG, A.; RATHORE, A. **Process scale bioseparations for the biopharmaceutical industry**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

SAZAKI, G. et al. A novel approach to the solubility measurement of protein crystals by two-beam interferometry. **Journal of Crystal Growth**, v. 169, n. 2, p. 355–360, 2 nov. 1996.

SCHLICHTKRULL, J. **Insulin crystals. Chemical and biological studies on insulin crystals and insulin zinc suspension**. [s.l.] Ejnar Munksgaard Publ., Copenhagen, 1958.

SCOPES, R. **Protein purification: principles and practice**. New York, NY: Springer Science & Business Media, 2013.

SCOPES, R. K. **Protein purification : principles and practice**. [s.l.] Springer-Verlag, 2007.

SCOTT, T. A.; MERCER, E. I. **Concise Encyclopedia: Biochemistry and Molecular Biology**. 3rd. ed. New York: Walter de Gruyter Berlin, 1997.

SHIAU, K.-S.; CHEN, T.-L. Initial protein concentration effects on precipitation by salt. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, n. 2, p. 202–206, 20 jan. 1997.

SHIH, Y.-C.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. W. Some characteristics of protein precipitation by salts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 10, p. 1155–1164, 5 dez. 1992.

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

SIGMA-ALDRICH INC. **Albumin from bovine serumA7030**. Sigma-Aldrich, , 2000. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A2058>>

SIGMA-ALDRICH INC. **Lysozyme from chicken egg white**. St. LouisSigma-Aldrich, , 2008. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/7/l6876dat.Par.0001.File.tmp/l6876dat.pdf>>

SIGMA-ALDRICH INC. **Enzymatic Assay of Lysozyme (EC 3.2.1.17)**, 2017.

Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-lysozyme.html>>. Acesso em: 3 jul.

2017

SLUZKY, V.; LANGER, R. S. **Insulin stability and aggregation in agitated aqueous solutions**. [s.l.] Stanford University, 1992.

SOUSA, R.; LAFER, E. M.; WANG, B. C. Preparation of crystals of T7 RNA polymerase suitable for high-resolution X-ray structure analysis. **Journal of Crystal Growth**, v. 110, n. 1–2, p. 237–246, 1 mar. 1991.

TALEB, M. et al. Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field. **Journal of Crystal Growth**, v. 232, p. 250–255, 2001.

TANFORD, C. **Physical chemistry of macromolecules**. [s.l.] Wiley, 1961.

THALLER, C. et al. [9] Seed enlargement and repeated seeding. **Methods in Enzymology**, v. 114, p. 132–135, 1985.

TOTIR, M. et al. Macro-to-Micro Structural Proteomics: Native Source Proteins for High-Throughput Crystallization. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e32498, 29 fev. 2012.

VEKILOV, P. G. **Dense liquid precursor for the nucleation of ordered solid phases from solution** **Crystal Growth and Design** American Chemical Society, , 2004. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cg049977w>>. Acesso em: 2 maio. 2018

VEKILOV, P. G. Nucleation. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 12, p. 5007–5019, dez. 2010.

WETTER, L. E.; DEUTSCH, H. F. Immunological studies on egg white proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 192, p. 237–242, 1951.

YOSHIKAWA, H. et al. Effects of alcohol on the solubility and structure of native and disulfide-modified bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 5, p. 1286–1291, 1 jun. 2012.