



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

MOYSÉS BATISTA DE ARAÚJO JÚNIOR

ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE FASES NA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS: EFEITO
DA CONCENTRAÇÃO INICIAL E DA MASSA MOLECULAR

STUDY OF PHASE EQUILIBRIUM IN PROTEIN PRECIPITATION: EFFECT OF
INITIAL CONCENTRATION AND MOLECULAR MASS

CAMPINAS-SP

2019

MOYSÉS BATISTA DE ARAÚJO JÚNIOR

ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE FASES NA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS: EFEITO
DA CONCENTRAÇÃO INICIAL E DA MASSA MOLECULAR

STUDY OF PHASE EQUILIBRIUM IN PROTEIN PRECIPITATION: EFFECT OF
INITIAL CONCENTRATION AND MOLECULAR MASS

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

*Dissertation presented to the School of
Chemical Engineering of the University of
Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Master, in the
area of Chemical Engineering.*

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO MOYSÉS
BATISTA DE ARAÚJO JÚNIOR E
ORIENTADA PELO PROF. DR.
EVERSOR ALVES MIRANDA.

CAMPINAS-SP

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3837-1440>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Ar15e Araújo Júnior, Moysés Batista de, 1990-
Estudo de equilíbrio de fases na precipitação de proteínas : efeito da concentração inicial e da massa molecular / Moysés Batista de Araújo Júnior. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

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

1. Precipitação. 2. Proteínas. 3. Solubilidade. 4. Equilíbrio de fases. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of phase equilibrium in protein precipitation : effect of initial concentration and molecular mass

Palavras-chave em inglês:

Precipitation

Proteins

Solubility

Phase equilibrium

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Everson Alves Miranda [Orientador]

Érika Ohta Watanabe

Bradley David Olsen

Data de defesa: 25-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Moysés Batista de Araújo Júnior e aprovada em 25 de fevereiro de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Prof. Dr. Everson Alves Miranda
FEQ / UNICAMP

Profa. Dra. Érika Ohta Watanabe
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Dr. Bradley David Olsen
Massachusetts Institute of Technology (MIT)

*A ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelas bênçãos concedidas ao longo do caminho.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas (UFAM) por viabilizar o afastamento de minhas atividades laborais e permanência em Campinas para realizar o mestrado do qual esta dissertação é fruto.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Everson Alves Miranda pela atenção dedicada, pelos conselhos dados, pelos questionamentos feitos, enfim, pela significativa contribuição para a formação deste pesquisador. Além da orientação, agradeço pelas conversas e pelo seu lado humano que foram importantes para aliviar o fardo da distância de casa.

Agradeço ao professor Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho pela sua disponibilidade e sugestões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço às professoras Dr. Ângela Maria Moraes e Dr. Sônia Maria Alves Bueno por permitirem a utilização de laboratórios e equipamentos sob suas responsabilidades que foram importantes para a obtenção dos dados apresentados aqui.

Agradeço aos colegas de laboratório: Cristiane Costa Amorim, Helberth Junnior Santos Lopes, Juliano Sabedotti de Biaggi, Luisa Pires Vaz, Marina Júlio Pinheiro e Rafael Matsumoto Pereira pelo companheirismo, pelas discussões, pela palavra de incentivo e pela crítica sempre construtiva.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus familiares e amigos cujo carinho e apoio foram essenciais para que pudesse realizar o mestrado. Em especial gostaria de agradecer a minha Mãe, Socorro do Rosário Pereira de Assis, minha primeira e eterna educadora.

RESUMO

Precipitação é uma operação de separação de baixo custo, de grande capacidade de concentração e é empregada em processos industriais como em recuperação de proteínas. No projeto de precipitações, a solubilidade é a propriedade termodinâmica a ser considerada na seleção do método e das condições de processo. No entanto, na literatura há relatos de alterações de solubilidade de proteínas, entre os quais o trabalho de Shih e colaboradores (1990), que verificaram em processos de precipitação um aumento na concentração de proteína na fase leve em função da concentração inicial da proteína empregada na precipitação. As alterações na solubilidade de proteínas têm sido atribuídas à presença de impurezas e ao grau de cristalinidade da fase densa em equilíbrio com a solução saturada. Durante a precipitação, as impurezas se associam ao precipitado modificando as interações proteína-solvente e, conseqüentemente, afetando o equilíbrio de fases. Quanto ao grau de cristalinidade, diferenças de concentração inicial de proteína produzem diferentes taxas de nucleação que levam à formação de precipitados amorfos com diferentes graus de amorfia e solubilidade. Neste trabalho, verificou-se, em precipitação, o efeito da massa molecular da proteína na dependência da concentração de proteína no equilíbrio (aqui chamada de solubilidade aparente) com a concentração inicial. Para isto, foram realizadas precipitações de proteínas de diferentes massas moleculares (insulina bovina, 5,7 kDa; lisozima de clara de ovo de galinha, 14,7 kDa; tripsina suína, 23,4 kDa; ovalbumina, 42,7 kDa; BSA, 66,0 kDa e IgG bovina, 150,0 kDa) a diferentes concentrações iniciais através do método de *salting-out* com cloreto de sódio com acompanhamento cinético para encontrar o tempo requerido para o equilíbrio de fases e obter as desejadas medidas de solubilidade. Os dados de solubilidade obtidos foram avaliados e a dependência da solubilidade com a concentração inicial de proteína foi determinada. Lisozima foi a única proteína que não apresentou variação na solubilidade mesmo a baixa concentração de sal. Insulina apresentou variação somente em baixa concentração de sal. As proteínas de massa molecular mais elevadas, tripsina, albumina e IgG apresentaram solubilidade aparente dependente da concentração inicial de proteína: quanto mais alta a concentração inicial da proteína, maior foi a solubilidade aparente. Com base nos dados deste trabalho e na literatura, a massa molecular aparenta ter efeito sobre a solubilidade de proteínas em processos de precipitação.

Palavras-chave: Massa molecular. Solubilidade. *Salting-out*. Precipitação de proteínas.

ABSTRACT

Precipitation is a low cost unit operation for separation employed in industrial processes such as protein recovery. In precipitation design, solubility is the thermodynamic property most relevant in the selection of the method of operation and process condition selection. However, there are reports of changes in protein solubility such as the work of Shih and co-workers (1990). They report changes in protein concentration in the light phase (supernatant) as a function of the initial concentration of the protein employed in the precipitation. Changes in protein solubility have been attributed to the presence of impurities and to the degree of crystallinity of the dense phase (precipitate) in equilibrium with the saturated light phase solution. During precipitation, impurities associate with the precipitate and modify the protein-solvent interactions affecting the phase balance. With respect to the degree of crystallinity, differences in initial protein concentration produce different nucleation rates that lead to the formation of amorphous precipitates with different degrees of crystallinity and solubility. In this work, the effect of the molecular mass of the protein on the dependence of the concentration of protein in the light phase at equilibrium (here called apparent solubility) with the initial concentration was investigated. For this, proteins of different molecular masses (bovine insulin, 5.7 kDa, chicken egg white lysozyme, 14.7 kDa, porcine trypsin, 23.4 kDa, ovalbumin, 42.7 kDa, BSA, 66.0 kDa and bovine IgG, 150.0 kDa) at different initial concentrations were salted-out using sodium chloride. Lysozyme was the only protein that showed no change in solubility even at low salt concentration. Insulin presented this behavior only at low salt concentration. The higher molecular masses proteins - trypsin, albumin and IgG - showed apparent solubility as a function of the initial protein concentration: the higher the initial protein concentration, the greater the apparent solubility. Based on the data of this work and the literature, the molecular mass appears to have an effect on the solubility of proteins in precipitation processes.

Key-words: Molecular weight. Solubility. Salting-out. Protein precipitation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagramas de fase de um componente. Fonte: adaptado de Atkins e Paula (2012).	16
Figura 2. Diagrama de fase da precipitação de proteínas. Fonte: Adaptado de Asherie (2004).	18
Figura 3. Série de Hofmeister. Fonte: adaptado de Yang (2009).	20
Figura 4. Solubilidade da hemoglobina em função da concentração molal de sulfato de amônio. (—) curva de solubilidade experimental. (- - -) curvas de solubilidade a partir da equação 4.	24
Figura 5. Estrutura básica de um anticorpo. Fonte: adaptado de Afaneh et al. (2012).	28
Figura 6. Procedimento de precipitação, separação de fases e determinação da concentração de proteína.	33
Figura 7. Cinética de precipitação de insulina bovina com NaCl 4,0 mol/kg de solvente. Concentração inicial de proteína igual a 8,1 mg/mL, tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.	36
Figura 8. Cinética de precipitação de insulina bovina a tempos curtos de quatro concentrações iniciais de insulina: (\diamond) 7,9 mg/mL; (\square) 9,8 mg/mL; (Δ) 12,1 mg/mL e (\circ) 14,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.	36
Figura 9. Cinética de precipitação de insulina com NaCl 4,00 mol/kg de solvente. Concentrações iniciais de proteína (C_i) de 6,0 a 14,1 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.	37
Figura 10. Cinética de precipitação de insulina bovina com NaCl 3,00 mol/kg de solvente. Concentração inicial de proteína (C_i) de 8,0 a 14,1 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.	38

Figura 11. Cinética de precipitação de insulina bovina com NaCl 1,10 mol/kg de solvente. Concentração inicial de proteína (Ci) de 5,0 a 15,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a 25,0 ± 0,1 °C.....	39
Figura 12. Cinética de precipitação de BSA com NaCl 0,65 mol/L. Concentração inicial de proteína (Ci) de 4,9 a 20,1 mg/mL. Tampão acetato 0,010 mol/L, pH 4,0 a 25,0 ± 0,1 °C. ...	40
Figura 13. Cinética de precipitação de lisozima com NaCl 3,50 mol/L. Concentração inicial de proteína (Ci) de 5,0 a 20,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a 25,0 ± 0,1 °C.	41
Figura 14. Cinética de precipitação de lisozima com NaCl 1,05 mol/L. Concentração inicial de proteína (Ci) de 20,0 a 75,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a 25,0 ± 0,1 °C.	43
Figura 15. Cinética de precipitação de tripsina com NaCl 2,50 mol/L. Concentração inicial de proteína (Ci) de 5,0 a 20,0 mg/mL. Tampão glicina/NaOH 0,010 mol/L, pH 3,0 a 25,0 ± 0,1°C.	44
Figura 16. Cinética de precipitação de IgG com NaCl 1,00 mol/L. Concentração inicial de proteína (Ci) de 5,0 a 12,8 mg/mL. Tampão tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a 25,0 ± 0,1°C....	46
Figura 17. Cinética de precipitação de IgG com NaCl 2,50 mol/L. Concentração inicial de proteína (Ci) de 4,5 a 18,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a 25,0 ± 0,1°C. ..	48
Figura 18. Gel de eletroforese SDS-PAGE. A coluna M é referente aos marcadores de massa molecular. As colunas S de 1 a 4 correspondem aos sobrenadantes das precipitações a concentrações iniciais de IgG iguais a 18,0, 13,5, 9,0 e 4,5 mg/mL. As bandas de P1 a P4 são referentes aos precipitados das precipitações a concentrações iniciais de IgG iguais a 18,0, 13,5, 9,0 e 4,5 mg/mL. Na coluna I está a banda da solução de IgG empregada nas precipitações.	48
Figura 19. Cinética de precipitação de ovalbumina com NaCl 2,75 mol/kg de solvente. Concentração inicial de proteína (Ci) de 4,5 a 18,0 mg/mL.	50

Figura 20. Imagem do precipitado de ovalbumina com aumento de 400 vezes. Condições da precipitação: concentração inicial de proteína igual a 4,5 mg/mL e concentração de NaCl igual a 2,75 mol/kg de solvente.	51
Figura 21. Gráficos de concentração de proteína na fase sobrenadante no equilíbrio em função da concentração inicial de proteína. As “proteínas/concentração de NaCl” foram: (a) insulina/4,00 mol/kg de solvente; (b) insulina/3,00 mol/kg de solvente; (c) insulina/1,10 mol/kg de solvente; (d) lisozima/3,50 mol/L; (e) lisozima/1,05 mol/L; (f) BSA/0,65 mol/L; (g) tripsina/2,50 mol/L; (h) IgG/1,00 mol/L e (i) IgG/2,50 mol/L.	52
Figura 22. Concentração de proteína na fase sobrenadante em função da concentração inicial de proteína em precipitações a diferentes concentrações de NaCl.	55
Figura 23. Imagens dos precipitados com aumento de 400 vezes. (a) insulina precipitada a 5,0 mg/mL e NaCl a 1,10 mol/kg de solvente; (b) BSA precipitada a 5,00 mg/mL e NaCl a 0,65 mol/L; (c) IgG precipitada a 5,00 mg/mL e NaCl a 2,50 mol/L; (d) tripsina precipitada a 5,00 mg/mL e NaCl e (e) lisozima precipitada a 20,0 mg/mL e NaCl a 1,05 mol/L	56
Figura 24. Proteínas estudadas quanto ao efeito da concentração inicial de proteína na concentração de proteína no equilíbrio: (+) há dados que mostram efeito da concentração inicial sobre a concentração de proteína no equilíbrio; (-) há dados que mostram que não há efeito da concentração inicial da proteína sob a concentração de proteína no equilíbrio.	58

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
1. Introdução	13
1.1 Precipitação de proteínas	13
1.2 Colocação do problema.....	15
1.3 Objetivo e etapas do trabalho	15
2. Revisão bibliográfica.....	16
2.1 Diagrama de fase de precipitação de proteínas	16
2.2 Precipitação de proteínas por <i>salting-out</i>	20
2.3 Proteínas estudadas.....	24
3. Materiais e métodos	29
3.1 Materiais	29
3.2 Equipamentos	31
3.3 Estudos preliminares de precipitação de proteínas	31
3.4 Estudos de precipitação de proteínas	31
3.5 Determinação da concentração de proteínas	34
4. Resultados e discussão	35
4.1 Estudo cinético da precipitação de insulina bovina	35
4.2 Estudos preliminar e cinético da precipitação de BSA.....	39
4.3 Estudos preliminar e cinético da precipitação de lisozima.....	40
4.4 Estudos preliminar e cinético da precipitação de tripsina	43
4.5 Estudos preliminar e cinético da precipitação de IgG.....	45
4.6 Estudos preliminar e cinético da precipitação de ovalbumina	49
4.7 Efeito da concentração inicial de proteína na concentração de proteína no equilíbrio.....	51
5. Conclusão.....	60
6. Sugestão de trabalhos futuros.....	61
REFERÊNCIAS	62

APÊNDICE A: Eletroforese SDS-PAGE das soluções de proteína	68
APÊNDICE B: Curvas padrão para dosagem de proteínas.....	69
APÊNDICE C: Concentrações de insulina do estudo cinético de precipitação de insulina ..	70
APÊNDICE D: Concentrações de BSA do estudo cinético de precipitação de BSA.....	71
APÊNDICE E: Concentrações de lisozima do estudo cinético de precipitação de lisozima..	72
APÊNDICE F: Concentrações de tripsina do estudo cinético de precipitação de tripsina ...	73
APÊNDICE G: Concentrações de IgG do estudo cinético de precipitação de IgG.....	74

1. Introdução

1.1 Precipitação de proteínas

Precipitação é uma operação de separação que resulta na formação de uma fase densa, normalmente chamada de precipitado, e uma líquida leve saturada na espécie concentrada na fase densa. Ela tem como característica alta supersaturação e rápida formação do precipitado, geralmente, sólidos amorfos (BAŁDYGA, 2016).

Dependendo das condições do meio e da molécula precipitada, a fase densa também pode ser um gel, amiloide ou cristal (GREENE et al., 2015; KREBS; DEVLIN; DONALD, 2007). Quando a precipitação ocorre lentamente sob condições controladas as moléculas organizam-se, em muitos casos, em estruturas altamente ordenadas formando cristais. Quando cristais são formados, o processo de separação é chamado de cristalização enquanto que o termo precipitação é usualmente empregado quando sólidos amorfos são formados (MCPHERSON, 1999). Neste trabalho, o termo precipitação será empregado independentemente do grau de cristalinidade do sólido formado.

Economicamente, a precipitação é considerada de baixo custo. Sais, solventes orgânicos e até calor podem ser usados para induzir a precipitação. Normalmente, seu fator de purificação não é maior que três, mas possui grande capacidade de concentração. Por este motivo é com frequência usada como etapa anterior a outras operações de purificação (BUXBAUM, 2011). Este é o caso da purificação de proteínas em que a precipitação é, comumente, uma das primeiras etapas de recuperação e purificação (BURGESS, 2009). Os meios que contêm proteínas são complexos fazendo com que seja necessária a utilização de diferentes métodos de separação explorando diferentes propriedades dos componentes da mistura. Por exemplo, pode-se explorar diferenças de reatividade química, tamanho e solubilidade para a separação. A precipitação explora as diferenças de solubilidade (NELSON; COX, 2014).

Entretanto, vislumbra-se a possibilidade de emprego de precipitação/cristalização em substituição a processos de separação de alta resolução. Cromatografia, por exemplo, é um método empregado para purificação de anticorpos monoclonais e já existem estudos que apontam bons resultados em escala de laboratório para purificação de anticorpos unicamente por etapas de cristalização (GRONEMEYER; DITZ; STRUBE, 2014).

Precipitar proteínas não é o mesmo que precipitar compostos inorgânicos ou mesmo compostos orgânicos de baixa massa molecular. Proteínas são macromoléculas com

estruturas tridimensionais complexas com vários grupos funcionais com cargas positivas e negativas. Desta forma, para formar um cristal neutro, é requerido à presença de contra íons na estrutura cristalina, além de água de cristalização para estabilizar a estrutura (OSWALD; PIETZSCH; ULRICH, 2017).

Existem diferentes métodos de precipitação de proteínas, dentre eles destacam-se: precipitação com polímeros e com solventes orgânicos, *salting-out* e a precipitação isoelétrica. Os três primeiros baseiam-se na adição de agentes precipitantes que, como o nome sugere, são polímeros, solventes orgânicos e sais que provocam a diminuição da solubilidade da proteína. Já a precipitação isoelétrica consiste em adicionar ácidos ou bases com o intuito de alterar o pH em direção ao ponto isoelétrico da proteína, reduzindo a repulsão eletrostática proteína-proteína e causando a precipitação (DORAN, 2013).

Independentemente do método empregado, o projeto de precipitação é baseado na solubilidade da molécula de interesse. A condição necessária para que ocorra a precipitação é que se ultrapasse a solubilidade da molécula que se deseja precipitar formando uma solução supersaturada (ZAUNER, 1999). Da solução supersaturada, formam-se uma fase leve e uma fase densa na qual, usualmente, a molécula de interesse está concentrada. Porém, em alguns processos de precipitação as impurezas se concentram na fase densa deixando a molécula de interesse na fase leve com menor teor de impurezas (GIESE et al., 2013).

Embora a solubilidade seja uma propriedade termodinâmica invariável dada às condições de temperatura, pressão e composição do solvente, na literatura encontram-se relatos de variações de solubilidade de proteínas mesmo quando fixadas estas condições. Para diferenciar a solubilidade termodinâmica destas variações de concentração observadas na literatura e também neste trabalho, a quantidade máxima de proteína solúvel será chamada de solubilidade aparente.

Já no início do século XX verificou-se, tanto em processos de precipitação quanto de dissolução de proteínas, anomalias na solubilidade aparente em função da quantidade de proteína presente no sistema (MELLANBY, 1904; SØRENSEN, 1930; STEINHARDT, 1939).

Na década de 1990, Shih, Prausnitz e Blanch (1992) classificaram as proteínas quanto a sua solubilidade em soluções salinas em dois tipos: aquelas em que a solubilidade é aproximadamente proporcional a concentração inicial de proteína e aquelas em que a solubilidade é constante. Posteriormente, Shiau e Chen (1997) ampliaram esta classificação acrescentando as proteínas em que a solubilidade aparente diminui com o aumento da

concentração inicial de proteína e proteínas em que a solubilidade aparente aumenta com a concentração inicial até um valor máximo e então decresce.

1.2 Colocação do problema

As alterações de solubilidade de proteínas citadas anteriormente, inicialmente foram explicadas com base na heterogeneidade do sólido formado. Tal heterogeneidade foi atribuída à presença de impurezas (DESREUX; HERRIOTT, 1939; BUTLER, 1940), assim como ao grau de cristalinidade ou de amorfia do sólido (PINHEIRO et al., 2016). Quanto à primeira, já foi mostrado que a presença de impurezas altera o equilíbrio proteína-solvente (STEINHARDT, 1939). Quanto à segunda, quanto maior a supersaturação maior é a taxa de nucleação e sólidos menos cristalinos são formados (BOISTELLE; ASTIER, 1988).

Da mesma forma que as altas taxas de nucleação dificultam a formação de uma estrutura regular de moléculas e, conseqüentemente, dificultam a formação de estruturas cristalinas, pode-se esperar que moléculas relativamente grandes também apresentem a mesma dificuldade de formação de cristais. As macromoléculas têm maior número de pontos de interação e as dimensões maiores poderiam causar maior dificuldade de rearranjo para estruturas mais estáveis. Neste sentido, a massa molecular da proteína poderia explicar, em parte, as anomalias de solubilidade de proteínas descritas anteriormente.

1.3 Objetivo e etapas do trabalho

Com base no exposto, este trabalho visou verificar o efeito da massa molecular da proteína na solubilidade da mesma após precipitação por *salting-out* a diferentes concentrações iniciais de proteína.

Para cada proteína estudada foram feitos estudos de precipitação preliminares para determinar as concentrações de precipitante e de proteína a serem usados nos experimentos posteriores. Então, experimentos de precipitação a diferentes concentrações iniciais de proteína foram realizados até que o equilíbrio de fases fosse estabelecido para que a concentração na fase leve no equilíbrio fosse avaliada quanto à possível dependência com a concentração inicial de proteína.

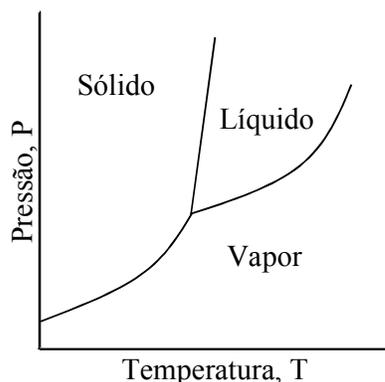
2. Revisão bibliográfica

2.1 Diagrama de fase de precipitação de proteínas

Fase é uma porção do espaço homogênea com propriedades físicas e químicas constantes, ou seja, substâncias puras ou soluções homogêneas de gases, de líquidos ou de sólidos que apresentem propriedades constantes como concentração e densidade (CALLISTER, 2008).

O diagrama de fase é uma representação gráfica de regiões em que as fases de um sistema são estáveis em função de propriedades intensivas. No caso de um sistema de apenas um componente, pressão e temperatura são variáveis sobre as quais o diagrama é construído. Quando há mais de um componente, utiliza-se a composição do sistema como variável através da fração molar ou mássica (ATKINS; PAULA, 2012). Um diagrama de fases de um sistema de um componente (H_2O) é apresentado na Figura 1.

Figura 1. Diagramas de fase de um componente. Fonte: adaptado de Atkins e Paula (2012).



Neste caso, duas variáveis intensivas, pressão e temperatura, determinam o estado de agregação da água. De forma geral, o estado de um sistema é definido por suas propriedades físicas (ATKINS; PAULA, 2012). Para uma única fase presente em um sistema, basta definir duas variáveis intensivas para se determinar o estado sistema. No entanto, quando duas fases estão presentes, a definição de uma única variável intensiva é suficiente para determinar o seu estado. O número de variáveis intensivas que devem ser fixadas para estabelecer o estado do sistema é dado pela regra das fases formulada por J. Willard Gibbs (Equação 1) (NESS; ABBOTT, 2007).

$$F = 2 - \pi + N \quad (1)$$

em que F é o número de graus de liberdade, π é o número de fases e N é o número de componentes.

O número de graus de liberdade também implica no equilíbrio de fases. Na Figura 1, na curva que separa as fases sólida e líquida, por exemplo, há duas fases, um componente e F é igual a 1. Portanto, pressão e temperatura não podem variar independente uma da outra, caso contrário o equilíbrio de fases será perturbado (NESS; ABBOTT, 2007).

Com relação à precipitação de proteínas, nos casos em que se adiciona um agente precipitante, haverá três componentes (proteína, água e precipitante). Se a concentração de proteína estiver abaixo de sua solubilidade, existirá apenas uma fase no sistema e a regra das fases fornecerá F igual a 4. Isto implica que todas as variáveis intensivas, pressão, temperatura, e composição em termos de proteína e precipitante podem variar sem alterar o equilíbrio do sistema. Porém, se temperatura e pressão forem especificados, F reduz-se para 2 e apenas concentração de proteína e de precipitante podem variar sem que o equilíbrio seja alterado (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985).

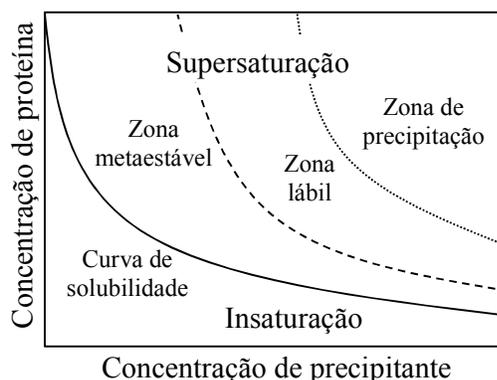
Quando a concentração de proteína se encontra em seu valor máximo em solução a uma dada temperatura e pressão, F será igual a 1 e a concentração de precipitante não pode variar independente da concentração de proteína, podendo levar à precipitação. Conseqüentemente, em um gráfico de concentração de proteína versus concentração de precipitante, haverá uma curva que estabelece a concentração máxima de proteína solúvel em função da concentração de precipitante; esta é a curva de solubilidade. (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985).

O diagrama de fases da precipitação de proteínas é usualmente construído colocando-se a concentração de proteína no eixo vertical enquanto que algum parâmetro importante para o processo é colocado no eixo horizontal como pH, temperatura e concentração de precipitante. No diagrama, a curva de solubilidade é apresentada e sobre a curva diz-se que a solução está saturada enquanto que abaixo e acima da curva, diz-se que está insaturada e supersaturada, respectivamente (MCPHERSON, 1999).

Devido aos fatores que afetam a solubilidade, os diagramas de fase de mais de duas dimensões podem ser empregados, porém a representação em duas dimensões é comumente utilizada. Nos diagramas de duas dimensões, os fatores influentes na solubilidade são mantidos constantes exceto aquele que é colocado no eixo horizontal. Outra característica

deste tipo de digrama é a apresentação de duas regiões acima da curva de solubilidade, a zona metaestável e a zona lábil (Figura 2) (MCPHERSON, 1999).

Figura 2. Diagrama de fase da precipitação de proteínas. Fonte: Adaptado de Asherie (2004).



A zona metaestável corresponde à região do diagrama em que se ultrapassou a solubilidade, mas nenhum sólido é formado. Nesta região, o sistema encontra-se supersaturado, porém a formação de uma nova fase não é espontânea. Para que a precipitação ocorra nesta região do diagrama de fases faz-se necessário a perturbação do sistema, por exemplo, vibração ou a presença de superfícies sólidas como a adição de sementes que geralmente são cristais de proteína. A extensão da zona metaestável depende do soluto, solvente, pressão, temperatura e até mesmo de características de processo como agitação e superfície do reator em que ocorre a precipitação (YU; REUTZEL-EDENS, 2003).

Na zona lábil, a nucleação ocorre espontaneamente. Nesta região, pequenos aglomerados de proteínas se formam e se desfazem até que alguns atingem um tamanho crítico e, a partir daí, cresce o cristal. A nucleação pode ser classificada em primária e secundária, sendo a primária ainda dividida em homogênea e heterogênea. A nucleação é primária quando ocorre na ausência de partículas da proteína a ser precipitada e, se for espontânea, é chamada de nucleação primária homogênea. Porém, se partículas de impureza induzirem a precipitação, a nucleação é dita heterogênea. A nucleação secundária ocorre na presença de partículas da espécie precipitada (MULLIN, 2001).

Para alguns autores ainda se distingue uma terceira zona na região de supersaturação, acima da zona lábil, chamada de zona de precipitação. Esta zona está localizada acima da zona lábil (Figura 2), a supersaturação é elevada e são formadas partículas pequenas e amorfas (ASHERIE, 2004; KRAUSS et al., 2013; SARIDAKIS et al.,

1994). Tal situação é indesejável em muitas ocasiões. Em processos industriais, por exemplo, partículas pequenas dificultam o processo de separação sólido-líquido por filtração e centrifugação (DORAN, 2013), mas há casos em que são desejáveis, como na produção de nanopartículas para fins de produção de medicamentos em que o fármaco é liberado de forma controlada (D'ADDIO; PRUD'HOMME, 2011).

Portanto, a supersaturação é necessária à precipitação de proteínas. As condições de uma solução insaturada são alteradas de forma a reduzir-se a solubilidade da proteína e alcançar-se a supersaturação. Controla-se o grau de supersaturação levando em consideração as diferentes regiões do diagrama de fases de acordo com o produto final que se deseja obter (MCPHERSON, 1999).

Há diversos métodos de se atingir a supersaturação. Em geral faz-se uso de mudanças de pH ou temperatura ou ainda adiciona-se um agente precipitante que trata-se de uma substância química (sal, solvente ou polímero) que reduz a solubilidade de uma espécie no sistema, tornando a solução supersaturada causando a precipitação (DORAN, 2013). Alguns dos métodos de precipitação mais utilizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns meios de se atingir supersaturação.

-
1. Alterar a temperatura
 2. Aumentar a concentração de sal
 3. Aumentar ou diminuir o pH
 4. Adicionar um ligante
 5. Alterar a constante dielétrica do meio
 6. Remover água por evaporação
 7. Adicionar polímero ocasionando exclusão por volume
 8. Remover um agente solubilizante
-

Fonte: adaptado de (MCPHERSON, 1999).

Com relação à utilização de sal, ressalta-se que a precipitação pode ocorrer à baixa e alta concentração de sal dependendo do sal e da proteína. Além disso, em certos casos a precipitação se dá pela remoção de sal (SMATANOVÁ, 2002). A adição de sal para se atingir a supersaturação foi o método empregado neste trabalho e suas particularidades serão abordadas a seguir.

Verifica-se, portanto, que dentre os sais inorgânicos estudados por Hofmeister, o sulfato de amônio é uma das melhores opções para realizar o *salting-out* de proteínas, tanto que é de uso corriqueiro em laboratórios e processos industriais. Entretanto, sais derivados de ácidos orgânicos, como citrato, tartarato, acetato, formato e malonato, também apresentam alta capacidade de *salting-out* com destaque para o malonato de sódio, cuja capacidade é mais do que duas vezes superior ao sulfato de amônio (MCPHERSON, 2001).

Apesar de ser amplamente empregado em precipitações por *salting-out*, o sulfato de amônio é corrosivo, libera amônia em pH elevado e é tóxico devendo ser separado das proteínas purificadas quando estas forem destinadas a uso terapêutico (DORAN, 2013). Como alternativa ao sulfato de amônio em precipitações de proteínas, o cloreto de sódio não é tóxico, além de ter baixo custo e alta solubilidade em água. Apesar de menos efetivo que o sulfato de amônio, o cloreto de sódio ocupa posição intermediária na série de Hofmeister.

A explicação para a precipitação ocasionada pela adição de sal assim como por qualquer outro método passa pela ideia fundamental de que para que ocorra precipitação é necessário que a aglomeração das moléculas de proteína em uma fase sólida seja energeticamente mais favorável que a sua solvatação. A superfície das moléculas de proteína contém cargas positivas, negativas e regiões hidrofóbicas que geram forças atrativas favoráveis à precipitação, porém, sobre a superfície da proteína existem camadas de contra-íons e de hidratação que oferecem resistência à aproximação das moléculas proteicas (DORAN, 2013).

A adição de sal em soluções de não eletrólitos modifica o sistema e muitos estudos já foram realizados no intuito de explicar os efeitos de sua adição. Já se sabe que o efeito de sal nestas soluções é função do tamanho, estrutura, densidade de carga, polarizabilidade e hidratação do eletrólito e do não-eletrólito e constante dielétrica do solvente. As diversas teorias utilizadas para explicar o efeito do sal podem ser agrupadas em: teorias de hidratação, dipolo da água, eletrostáticas, pressão interna e força de Van der Waals (GROVER; RYALL, 2005).

Teorias de hidratação baseiam-se no sequestro de moléculas de solvente pelos íons de sal adicionados. Em solução, as moléculas de solvente formam uma camada de hidratação sobre o soluto e haverá precipitação somente se o solvente for removido da vizinhança do soluto. Quando se adiciona sal à solução, cátion e ânion podem reduzir ou aumentar a hidratação do soluto. Se ocorrer aumento de hidratação, a solubilidade do soluto

aumenta (*salting-in*) e se reduzir a hidratação a solubilidade diminui e o soluto precipita (*salting-out*) (SAMOILOV, 1966).

Teorias de dipolo da água consideram o caso em que um soluto polar gera uma orientação predominante das moléculas de água, por exemplo, oxigênio apontando na direção do soluto, e, quando adicionado sal, íons positivos modificam a orientação preferencial das moléculas de água competindo pelo lado do oxigênio (GROVER; RYALL, 2005). Como íons pequenos possuem alta densidade de carga, eles fortemente modificam a orientação das moléculas de água e, por isso, apresentam maior efeito de *salting-out* quando comparado a íons grandes que tem baixa densidade de carga e afetam menos a orientação das moléculas de água (HRIBAR et al., 2002).

Teorias eletrostáticas consideram que o sal adicionado compete pelas moléculas de solvente. Contudo, esta competição é função da constante dielétrica. Quanto menor a constante dielétrica, menor é a capacidade de solvatação do não-eletrólito e menor é o efeito de *salting-out* observado (BOCKRIS; EGAN, 1948). No caso oposto, para constantes dielétricas altas, as interações entre o solvente e o não-eletrólito são mais fortes. Embora as primeiras teorias eletrostáticas desenvolvidas fossem puramente qualitativas, trabalhos recentes fornecem modelos quantitativos para explicar o efeito de sal em soluções de não-eletrólitos (DAHAL; SCHMIT, 2016; ZHOU, 2005).

Outra abordagem para explicar o *salting-out* considera que, em soluções contendo um não-eletrólito, a adição de sal pode levar a uma compressão ou expansão da solução. Geralmente, quando se mistura água e sal ocorre diminuição do volume da solução, isto pode ser considerado uma compressão do solvente o que aumenta a pressão interna. Se água contém um soluto e a adição de sal leva à compressão, a pressão interna gerada seria a responsável por promover o *salting-out* (MCDEVIT; LONG, 1952).

A modelagem matemática de soluções de água-sal-proteína mostrou que a interação através de forças de Van der Waals entre o íon e a proteína, considerada um macroíon, afeta o potencial de força média e, conseqüentemente, tem efeito sobre o comportamento destas soluções. Com isso, as forças de Van der Waals devem ser mais um fator a ser considerado no intuito de entender o efeito da natureza do sal em soluções de proteínas (TAVARES; BRATKO; PRAUSNITZ, 2004).

A forma mais simples de modelar o efeito de sal de soluções de proteínas é através da equação (2), adaptada da equação empírica originalmente desenvolvida para prever a absorção de gases em soluções salinas (BOCKRIS; EGAN, 1948):

$$\ln(S/S_o) = k_s.C \quad (2)$$

em que S é a solubilidade da proteína, S_o é a solubilidade no solvente puro, C é a concentração de sal e k_s é a constante de *salting-out*. Valores positivos de k_s indicam *salting-in* enquanto que valores negativos de k_s indicam *salting-out* (DESNOYERS; ICHHAPORIA, 1969).

A modelagem específica do *salting-out* foi feita por Cohn e Ferry na década de 1940 (equação 3):

$$\ln S = \beta - k_s(I/2) \quad (3)$$

Os autores, ao invés de relacionar a solubilidade (S) à concentração de sal, a relacionaram à força iônica (I) da solução, além de contabilizar outros fatores. Esta expressão é uma equação de uma reta e β é o intercepto que engloba fatores importantes para a solubilidade como pH, temperatura e pressão (MCPHERSON, 1999).

A equação 3 é útil para modelagem de precipitação de proteínas por *salting-out*, porém tem suas limitações. Ela deve ser empregada quando a força iônica é elevada, a proteína é relativamente pura e quando a solubilidade não varia com a concentração inicial da proteína (DORAN, 2013).

Em uma modelagem mais complexa Melander e Horváth (1977) conseguiram reunir em uma única equação ambos os efeitos de *salting-in* e *salting-out* (equação 4):

$$\ln (S/S_o) = \beta + Am - \Omega\sigma m \quad (4)$$

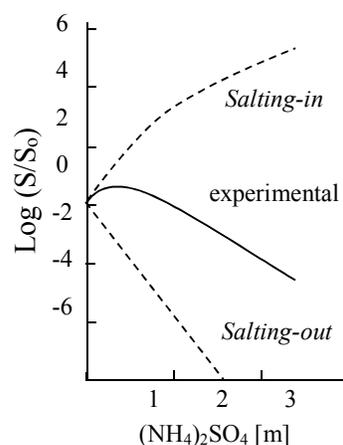
em que S é a solubilidade da proteína em gramas por mil gramas de água, S_o é a solubilidade da proteína em solvente puro, A é função do momento de dipolo da proteína, Ω é função da área superficial da proteína, σ é o incremento de tensão superficial molal do sal e m é a molalidade do sal. Nesta equação, A e $\Omega\sigma$ podem ser consideradas constantes de *salting-in* e de *salting-out*, respectivamente.

Portanto, conforme a concentração aumenta, primeiramente haverá um aumento da solubilidade até alcançar um máximo, a partir do qual o aumento de m resultará em diminuição da solubilidade. A Figura 4 descreve tal comportamento. As curvas de *salting-in* e *salting-out*, obtidas através da equação 4, e a curva de solubilidade da hemoglobina,

determinada experimentalmente, são apresentadas. Verifica-se que a curva de solubilidade é resultado das contribuições de *salting-in* e *salting-out*.

Apesar de muitas teorias e modelos terem sido elaborados para explicar o efeito de sal em diversas soluções ainda não se conhece satisfatoriamente os fenômenos envolvidos. A complexidade dos sistemas requer simplificações ou falham em contemplar fatores importantes, motivo pelo qual as teorias se aplicam a uma determinada situação, mas falham em outras. Em última instância, o *salting-out* tem sido considerado como decorrente de efeito eletrostático (GROVER; RYALL, 2005).

Figura 4. Solubilidade da hemoglobina em função da concentração molal de sulfato de amônio. (—) curva de solubilidade experimental. (- - -) curvas de solubilidade a partir da equação 4.



Fonte: adaptado de Melander e Horváth (1977).

2.3 Proteínas estudadas

Neste trabalho, foram selecionadas proteínas com base em suas massas moleculares. A faixa de massa molecular variou de aproximadamente 6 a 150 kDa no intuito de verificar o efeito da massa molecular na concentração de proteína no equilíbrio após precipitação.

A Tabela 2 apresenta uma lista com todas as proteínas utilizadas neste trabalho com suas respectivas massas moleculares e pontos isoelétricos. O ponto isoelétrico corresponde ao pH em que a carga líquida da molécula é nula, diminuindo a repulsão proteína-proteína e facilitando a precipitação (RABILLOUD, 2002). Por este motivo, algumas proteínas foram precipitadas em pH próximo a seu ponto isoelétrico.

A menor das proteínas estudadas é a insulina bovina. Ela é um hormônio anabólico secretado pelas células beta localizadas nas ilhotas pancreáticas. A insulina tem como função principal regular o nível de glicose no sistema circulatório, o que o faz por captação de glicose nos tecidos, e por redução de sua produção hepática (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

Desde o início do século XX já se produzia insulina para fins comerciais por precipitação. Na década de 1920, extrato pancreáticos oriundos de matadouros eram precipitados com álcool. Com o passar dos anos, zinco e etapas de recristalização foram adicionados ao processo, mas foi com o desenvolvimento de cromatografia em larga escala que insulina de alta pureza passou a estar disponível comercialmente (WALSH, 2005). Atualmente insulina para uso terapêutico também tem sido produzida na forma recombinante (BAESHEN et al., 2014)

Tabela 2. Propriedades das proteínas estudadas.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Referência	Ponto isoeletrico	Referência
Insulina bovina	5,7	(SAMBAMURPHY; KAR, 2006)	5,4	(VOET; VOET; PRATT, 2008)
Lisozima de clara de ovo de galinha	14,7	(NELSON; COX, 2014)	11,0	(VOET; VOET; PRATT, 2008)
Tripsina suína	23,4	(TRAVIS; LIENER, 1965)	10,8	(TRAVIS; LIENER, 1965)
Ovalbumina	42,7	(HALWER; NUTTING; BRICE, 1951)	4,6	(VOET; VOET; PRATT, 2008)
BSA	66,0	(CHUN; STROEVE, 2002)	4,7	(CHUN; STROEVE, 2002)
IgG	150,0	(NELSON; COX, 2014)	6,6	(VOET; VOET; PRATT, 2008)

A insulina é uma proteína pequena de 51 resíduos de aminoácido e contém duas cadeias, A e B, conectadas por pontes de dissulfeto. Ao cristalizar, pode conter estruturas monoméricas, dímeros ou hexâmetros, este último pode se apresentar em três formas diferentes designados T₆, T₃Rf₃ e R₆. Os dímeros de insulina são formados devido à proteína

possuir uma grande área hidrofóbica disponível para que os monômeros se organizem de dois em dois. Já a formação dos hexâmetros requer íons Zn^{2+} . Três dímeros se associam através de ligações com um ou mais íons Zn^{2+} formando os hexâmetros que, no caso do T_6 , tem dimensões de aproximadamente $50 \times 35 \text{ \AA}$ (WEISS; STEINER; PHILIPSON, 2000).

A lisozima utilizada neste trabalho é proveniente da clara de ovo de galinha. Diferentemente da insulina, é constituída por uma única cadeia peptídica enovelada, com 129 aminoácidos e interligada por quatro pontes de dissulfeto. Ela é considerada uma molécula compacta com forma de elipsoide de dimensões $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$ (STRYER, 1996).

A lisozima é uma enzima cuja função é clivar a parede celular de bactérias, o que é obtido através da hidrólise de ligação glicosídica $\beta(1 \rightarrow 4)$ de peptideoglicano da parede celular. Neste caso, a hidrólise catalisada por esta enzima é 10^6 vezes mais rápida que a reação não catalisada (NELSON; COX, 2014).

A estrutura cristalina da lisozima depende diretamente das condições em que ocorreu a cristalização. Quando cristalizada com cloreto de sódio, duas estruturas podem ser obtidas, tetragonal e ortorrômbica, sendo a última obtida em altas temperaturas. No entanto, quando outros sais são usados como agente precipitante, outras formas cristalinas podem ocorrer. Por exemplo, se tiocianato for o agente precipitante, estrutura monoclinica é formada enquanto que, com nitrato de sódio, tanto estrutura monoclinica quanto triclinica são formadas (HEIJNA; ENCKEVORT; VLIEG, 2008)

A tripsina é uma enzima digestiva sintetizada pelo pâncreas. Sua atividade catalítica consiste em clivar ligações peptídicas. Diferencia-se de outras peptidases por ser específica para resíduos carregados positivamente (VOET; VOET; PRATT, 2008). A tripsina nativa é chamada de β -tripsina, contém 223 aminoácidos em uma única cadeia peptídica. Ela sofre autólise na ligação Lys^{131} - Ser^{132} formando duas moléculas de α -tripsina (HERMODSON et al., 1973). A obtenção de tripsina do pâncreas se dá por precipitação com sulfato de amônio que leva a produção de cristais bipiramidais com formato de longas agulhas (TRAVIS; LIENER, 1965).

A albumina de soro é a proteína mais abundante do plasma de mamíferos. É sintetizada no fígado e transportada para o plasma onde contribui para a pressão osmótica e tem função de transporte (MAJOREK et al., 2012). Atualmente tem encontrado aplicação clínica como carreadora de fármacos (KRATZ, 2008). A albumina do soro bovino (BSA) contém 583 aminoácidos e é cristalizada em estrutura monoclinica (BUJACZ, 2012; MAJOREK et al., 2012).

Ovalbumina é a proteína mais abundante em ovos e consiste em uma cadeia polipeptídica de 385 aminoácidos (NISBET; SAUNDRY, 1981). Quando cristalizada, pode apresentar estruturas monoclinicas e triclinicas em função do pH (MILLER; WEINSTEIN; WLODAWER, 1983). É considerada uma proteína com composição de aminoácidos balanceada e, por este motivo, tem tido aplicação em produtos alimentares além de que quando hidrolisada pode produzir peptídeos bioativos (ABEYRATHNE; LEE; AHN, 2013).

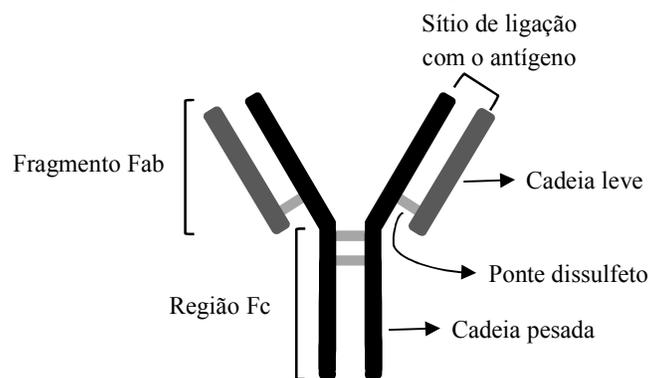
A IgG é uma imunoglobulina, classe de biomoléculas que reconhecem antígenos de bactérias e vírus e se ligam a eles possibilitando que outras moléculas e células destruam o patógeno. As principais vias de invasão do corpo por patógenos são as paredes do trato respiratório, digestivo e geniturinário ou através de lesões da pele. Para os diferentes locais atuam diferentes classes de imunoglobulinas com funções diferentes. Enquanto a IgA atua, principalmente, nas secreções do epitélio dos tratos intestinal e respiratório como um anticorpo neutralizante, a IgG atua no sangue e no líquido extracelular ligando-se ao antígeno e sinalizando para os fagócitos (JANEWAY et al., 2007).

Todas as imunoglobulinas, são formadas por cadeias de polímeros denominadas leves e pesadas. Existem dois tipos de cadeias leves simbolizadas pelas letras gregas κ e λ . As cadeias pesadas são diferentes de acordo com a classe da imunoglobulina existindo cinco classes principais que são IgA, IgD, IgE, IgM e IgG, cujas cadeias pesadas são simbolizadas por α , δ , ϵ , μ e γ , respectivamente (NELSON; COX, 2014).

A IgG é a imunoglobulina mais abundante do soro humano e compreende quatro subclasses que são: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. As diferentes subclasses se diferenciam na porção da molécula que se liga ao antígeno e, portanto, influenciando sobre suas funções no organismo de modo que a ausência de uma dada subclasse pode aumentar a suscetibilidade a classes específicas de patógenos (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014).

A IgG, assim como as outras imunoglobulinas, tem a forma de Y em que uma das extremidades, em forma de V, chamada de região variável, é responsável pela ligação ao antígeno, enquanto que o restante da molécula é constante e denominada região Fc (Figura 5). Os anticorpos são constituídos por quatro cadeias peptídicas, duas leves e duas pesadas. No caso da IgG, a cadeia leve e a pesada têm 25 e 50 kDa, respectivamente, totalizando 150 kDa. As cadeias são ligadas através de pontes dissulfeto (JANEWAY; TRAVERS; WALPORT, 2001) e podem ser cristalizadas em estruturas hexagonais (EDMUNDSON; GUDDAT; ANDERSEN, 1993).

Figura 5. Estrutura básica de um anticorpo. Fonte: adaptado de Afaneh et al. (2012).



3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Proteínas e demais reagentes químicos

A insulina bovina e a tripsina suína foram fornecidas pela Biobrás S/A (Brasil). Albumina do soro bovino (BSA) foi adquirida da Sigma Chemical Co (EUA), lisozima e albumina de clara de ovo de galinha e IgG foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co (EUA). A pureza das proteínas estudadas é apresentada na Tabela 3. Também foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando a metodologia de Laemmli (1970) em que os géis foram revelados com nitrato de prata de acordo com Morrissey (1981) para verificar a presença de impurezas. As imagens dos géis são apresentadas no Apêndice A.

Tabela 3. Proteínas estudadas e suas respectivas purezas

Proteína	Pureza^a
Insulina bovina	> 95%
Lisozima	≥ 90%
Tripsina suína	3101 U/mg (BAEE) ^b 32 U/mg (ATEE) ^c
Ovalbumina	≥ 90%
BSA	≥ 98%
IgG	≈ 80%

^a De acordo com o fabricante

^b BAEE = substrato N-alpha-benzoil-L-arginina etil éster

^c ATEE = substrato L-tirosina etil éster

Na preparação de soluções tampão foram empregados os reagentes tris(hidroximetil)aminometano (Merck, Alemanha), ácido clorídrico (Chemco, Brasil), ácido acético glacial (Êxodo Científica, Brasil) e acetato de sódio (Vetec, Brasil). Para ajuste de pH, além de ácido clorídrico, também foi empregado hidróxido de sódio (LS Chemical, Brasil). Nas precipitações, cloreto de sódio (Merck, Alemanha) foi o agente precipitante.

3.1.2 Preparo de soluções de proteína

A insulina bovina foi preparada em três etapas: dissolução, ajuste de pH e tamponamento. A dissolução foi feita em ácido clorídrico 0,02 mol/L sob agitação com barra magnética por uma hora. Para o ajuste de pH empregou-se NaOH 2,0 mol/L e HCl 1,0 mol/L até se obter pH 7,30. A solução foi então tamponada com tris-HCl 0,10 mol/L pH 7,30 na proporção de nove partes de solução de proteína para uma parte de tampão resultando na concentração final de tampão igual 0,010 mol/L. Tal solução foi congelada a - 18°C.

No dia seguinte ao congelamento foi realizada a precipitação. Primeiramente, descongelou-se a solução de insulina, centrifugou-se a 10.000g por 30 min, separou-se e filtrou-se o sobrenadante em filtro seringa com membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm. Por fim, preparou-se quatro soluções de insulina a partir desta solução concentrada por diluição em tampão tris-HCl 0,010 mol/L pH 7,30.

A solução de BSA foi preparada em água deionizada. Em seguida, foi feita a delipidação da solução de acordo Chen (1967): ajustou-se o pH da solução para 3 com ácido clorídrico, adicionou-se carvão ativado na proporção 0,5 g de carvão para 1 g de proteína e deixou-se a suspensão sob agitação em banho de gelo por 1 h; após este período centrifugou-se a suspensão a 9.000g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado com filtro seringa com membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm, seu pH foi ajustado para 4,02 com NaOH 2,0 mol/L e HCl 1,0 mol/L e acrescentou-se tampão acetato 0,100 mol/L de forma a obter a concentração final de tampão igual a 0,010 mol/L e pH 4,00. A concentração final de cloreto de sódio na solução foi de aproximadamente 16 mmol/L.

A preparação das soluções de lisozima, tripsina, ovalbumina e IgG consistiu na dissolução das proteínas no tampão adequado sob agitação com barra magnética, seguido de ajuste de pH com solução de HCl 1,0 mol/L e NaOH 2,0 mol/L e filtração em filtro seringa com membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm. As soluções tampão empregadas foram: tampão tris-HCl 0,010 mol/L pH 7,30 para lisozima e IgG, tampão acetato 0,01 mol/L pH 4,00 para ovalbumina e tampão glicina-NaOH 0,010 mol/L pH 3,00 para tripsina.

3.1.3 Preparo de soluções de cloreto de sódio concentradas

Três soluções de cloreto de sódio 250 mg/mL foram preparadas para a precipitação das proteínas. A diferença entre as três soluções foi o solvente utilizado na dissolução do NaCl e o pH final da solução salina. Foram empregados os tampões tris-HCl pH 7,30, glicina-NaOH pH 3,00 e acetato pH 4,00, todos na concentração 0,010 mol/L, sendo

o pH das soluções salinas ajustado com NaOH 2,0 mol/L para igualar ao pH do tampão utilizado na dissolução.

A preparação da solução de cloreto de sódio em lisozima, por exemplo, foi realizada em triplicata e as concentrações de NaCl obtidas são apresentadas na Tabela 4. As soluções preparadas em outros tampões resultaram nas mesmas concentrações e densidades.

Tabela 4. Propriedades da solução de NaCl em tampão tris-HCl 0,010 mol/L pH 7,30.

Concentração molar	$4,278 \pm 0,001$ mol/L
Concentração molal	$4,713 \pm 0,004$ mol/kg de solvente
Concentração massa/volume	$250,0 \pm 0,1$ mg/mL
Densidade	$1,158 \pm 0,001$ g/mL

3.2 Equipamentos

Para medição do pH das diferentes soluções utilizou-se pHmetro Ajmicronal AJX-511. A agitação e controle de temperatura das precipitações foram realizados com incubadora com agitação orbital TE-4200 (Tecnal, Brasil) e banho maria agitador com movimento recíproco Dubnoff 304-TPAE (Nova Ética, Brasil). Para separação das fases da precipitação utilizou-se centrífuga refrigerada 5804 R (Eppendorf, Alemanha) e, para a determinação da concentração de proteínas, medidas de absorbância foram obtidas em espectrofotômetro Beckman DU 650 (EUA).

3.3 Estudos preliminares de precipitação de proteínas

O objetivo destes estudos foi determinar a concentração de sal e de proteína a ser utilizada nos experimentos seguintes. Para tanto, realizou-se precipitações em tubos Eppendorf, com volume final de solução de 1 mL, nos quais se variou a concentração de sal. Temperatura e agitação foram controladas nas mesmas condições dos experimentos de precipitação posteriores. O tempo de precipitação foi de 2 a 5 dias, de acordo com a proteína (Tabela 5). Todas as precipitações foram realizadas a $25,0 \pm 0,1$ °C.

3.4 Estudos de precipitação de proteínas

As proteínas lisozima, BSA, tripsina e IgG foram precipitadas por *salting-out* com NaCl em tubos Eppendorf de 2,00 mL. Aos tubos foram adicionadas as soluções concentradas de proteína, de NaCl e solução tampão (a mesma em que se preparou a solução de proteína e

de NaCl), para se completar o volume final de precipitação para 1,00 mL. A solução de NaCl foi a última a ser adicionada.

Tabela 5. Condições dos experimentos preliminares de precipitação.

Proteínas	Concentração de proteína (mg/mL)	Concentração de NaCl (mol/L)	Tempo (dias)
BSA	5,0	0,25-2,00	2
Lisozima	5,0	2,50-3,50	5
	15,0	1,05-1,25	4
	25,0	1,05-1,25	4
Ovalbumina	11,7	0,25-2,50	5
Tripsina	6,5	0,50-3,00	3
IgG	5,0	0,50-3,00	5

A precipitação de insulina e ovalbumina diferiu do procedimento descrito quanto ao estado do sal no ato da mistura com a solução de proteína. No tubo Eppendorf, primeiro foi adicionado cloreto de sódio sólido, seguido da adição de 1,00 mL de solução de proteína; agitou-se os tubos por inversão por 1,5 min para a dissolução do sal. Por fim, os tubos foram incubados a $25,0 \pm 0,1$ °C.

As precipitações duraram de 7 a 20 dias em função da proteína e do tempo necessário para se atingir o equilíbrio de fases, identificado por medições sucessivas da concentração de proteína na fase leve. Tubos foram submetidos à centrifugação em diferentes intervalos de tempo e o sobrenadante, coletado com micropipeta, foi diluído para determinação da concentração de proteína por absorção em 280 nm. A Figura 6 descreve o procedimento utilizado nas precipitações.

As diferentes concentrações iniciais de proteína foram selecionadas de forma que a maior concentração fosse consideravelmente maior que a menor concentração, porém, a faixa de concentrações iniciais foi limitada pelas solubilidades das proteínas. A concentração final de NaCl da precipitação de cada proteína foi escolhida baseando-se nos estudos preliminares. Em resumo, as condições de precipitação são apresentadas na Tabela 6.

Os dados de concentração obtidos foram avaliados através de teste de Tukey a 95% de confiança para verificar a existência de diferenças entre as médias de concentração de

proteína ao longo do tempo e em função da concentração inicial de proteína empregada na precipitação.

Figura 6. Procedimento de precipitação, separação de fases e determinação da concentração de proteína.

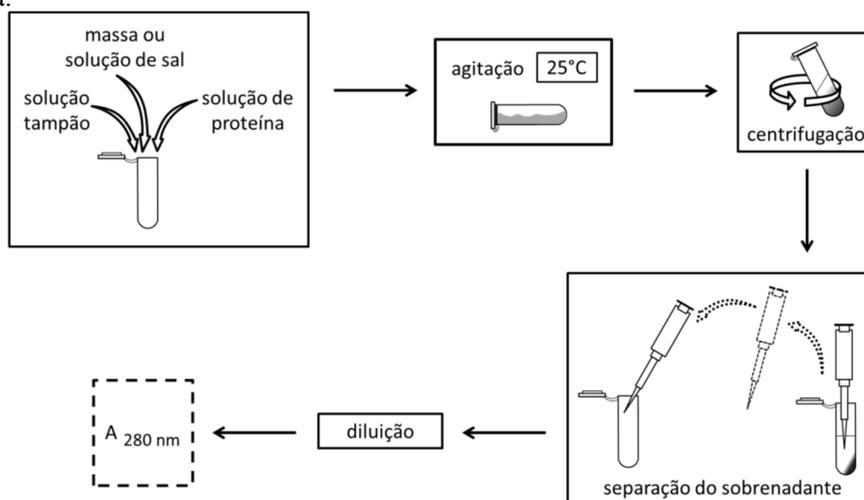


Tabela 6. Condições de precipitação.

Proteína	$C_{\text{proteína}}^a$ (mg/mL)	Tampão 0,010 mol/L	pH	Estado do sal	$C_{f,NaCl}^b$ (mol/L)	Agitação (rpm)
Insulina	5, 8, 10 e 15	Tris-HCl	7,3	Sólido	1,10 ^{c,d}	Orbital 150 rpm
	8, 10, 12 e 14				3,00 ^c	
	6, 8,10, 12 e 14				4,00 ^c	
Lisozima	20, 30, 45 e 75	Tris-HCl	7,3	Solução	1,05	Recíproca 120 rpm
	5, 10,15 e 20				3,50	
Tripsina	5, 10, 15 e 20	Glicina/NaOH	3,0	Solução	2,50	Recíproca 120 rpm
Ovalbumina	5, 9, 13 e 18	Acetado	4,0	Sólido	2,75 ^c	Recíproca 120 rpm
BSA	5, 10, 15 e 20	Acetado	4,0	Solução	0,65	Recíproca 120 rpm
IgG	5, 8, 10 e 13	Tris-HCl	7,3	Solução	1,00	Recíproca 120 rpm
	5, 9, 14 e 18				2,50	

^a C° proteína: concentração de proteína aproximada

^b $C_{f,NaCl}$: concentração final de cloreto de sódio

^c Concentração em mol/kg de solvente

^d Agitação recíproca a 120 rpm

3.5 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteína foi determinada através medidas de absorvância a 280 nm em que se utilizou solução tampão como branco. Para tal, foram feitas curvas de calibração para cada proteína estudada. Soluções de proteínas de concentração conhecida, foram preparadas em tampão de concentração e pH iguais aos utilizados nas precipitações. Gráficos de absorvância em função da concentração foram plotados e o coeficiente angular (α) obtido foi utilizado para determinação da concentração de proteína através da equação 5:

$$y = (f \cdot Abs) / \alpha \quad (5)$$

em que y é a concentração de proteína em miligramas de proteína por mililitro de solução, f é o fator de diluição e Abs é a absorvância da amostra.

No intuito de verificar influência do NaCl nas medidas de absorvância, foram realizadas medidas de absorvância de soluções de insulina bovina a diferentes concentrações de NaCl.

4. Resultados e discussão

Estudos preliminares de precipitação foram realizados para determinar a concentração de NaCl para os experimentos de cinética de precipitação posteriores. Estes por sua vez objetivaram obter concentrações de proteína no equilíbrio de fases para verificação de variações na solubilidade aparente da proteína em função de sua concentração inicial. Por fim, verificou-se possível relação entre os resultados obtidos e a massa molecular da proteína.

Nos estudos de precipitação preliminares procurou-se pela concentração salina que resultasse em uma precipitação significativa, mas com concentração de proteína na fase leve mensurável. Para isso, o tempo das precipitações foram de alguns dias de modo que grande parte das moléculas de proteína precipitáveis nas condições do experimento precipitassem e selecionou-se a concentração de NaCl que resultou em concentrações de proteína na fase leve da ordem de 4 mg/mL. Estes estudos preliminares foram realizados com todas as proteínas, exceto a insulina bovina: esta foi a primeira proteína estudada e foram realizados estudos cinéticos diretamente.

Verificou-se que concentrações de NaCl de até 3,00 mol/kg de solvente não interferem nas medidas de absorvância de soluções de insulina bovina. Todas as determinações de concentração de proteína foram realizadas a concentrações de NaCl consideravelmente inferiores a esta e, portanto, não há influência de sal no método de determinação de concentração proteica.

4.1 Estudo cinético da precipitação de insulina bovina

No primeiro estudo cinético de precipitação de insulina, utilizou-se concentração inicial de proteína de 8,1 mg/mL e de NaCl igual a 4,00 mol/kg de solvente (Figura 7). Verificou-se que em 10 min grande parte da proteína precipitou. Porém, após 2 h houve aumento na concentração na fase sobrenadante de quase 0,5 mg/mL. Nos tempos subsequentes a concentração caiu linearmente.

Novo experimento foi realizado para investigar o aumento de concentração na fase sobrenadante. Desta vez, mais concentrações iniciais de insulina foram utilizadas e as precipitações foram realizadas até 6 h para investigar o comportamento da fase sobrenadante em tempos curtos (Figura 8). Verificou-se o mesmo comportamento de aumento da concentração de proteína na fase sobrenadante seguida de redução na concentração proteica desta fase.

Figura 7. Cinética de precipitação de insulina bovina com NaCl 4,0 mol/kg de solvente. Concentração inicial de proteína igual a 8,1 mg/mL, tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.

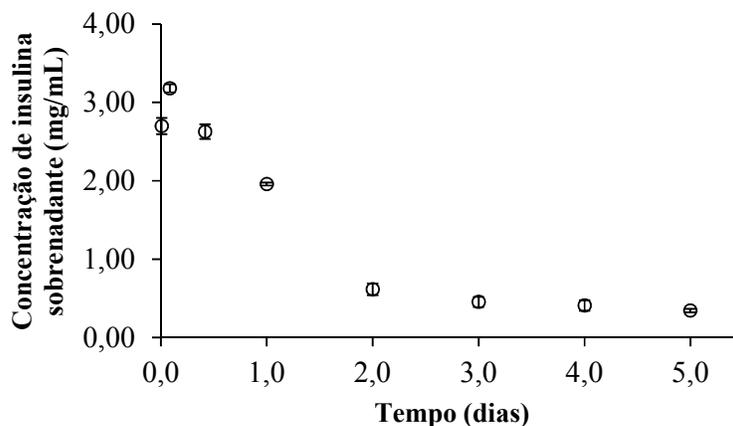
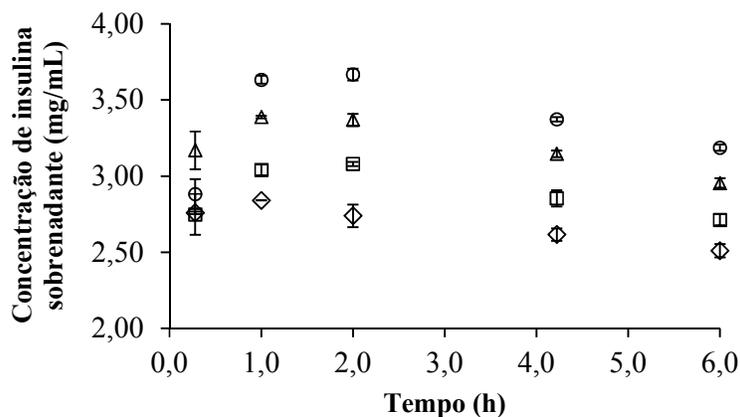


Figura 8. Cinética de precipitação de insulina bovina a tempos curtos de quatro concentrações iniciais de insulina: (\diamond) 7,9 mg/mL; (\square) 9,8 mg/mL; (Δ) 12,1 mg/mL e (\circ) 14,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.



Ng e colaboradores (1996) mostraram que a precipitação de algumas proteínas segue os estágios de maturação de acordo com a regra de Ostwald. Verificaram a formação inicial de pequenos cristais em meio a um precipitado amorfo que, com o passar do tempo, redissolve enquanto que os cristais crescem. Este fenômeno explica o aumento de solubilidade observado a tempos curtos, pois com a redissolução do precipitado amorfo, a concentração de proteína na fase leve aumenta e, com o crescimento dos cristais, redução da concentração de proteína sobrenadante é observada.

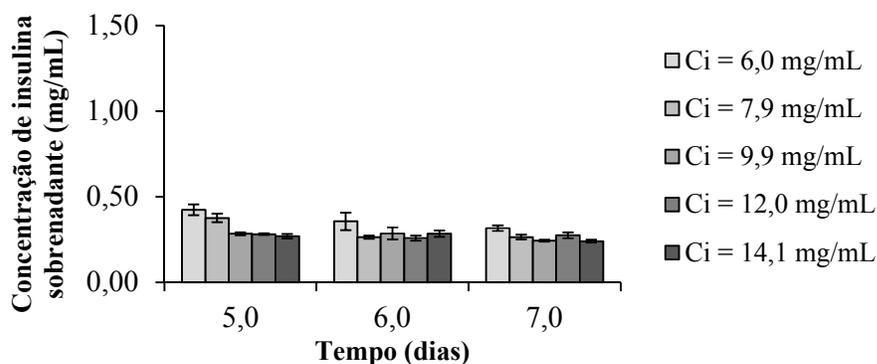
Além disto, encontra-se na literatura relato de comportamento incomum da dissolução de insulina suína com o tempo. Bernardo e co-autores (2005) verificaram que a

dissolução de insulina suína apresenta um aumento da concentração de proteína na fase líquida até um valor máximo que depois diminui com o tempo até um valor de equilíbrio. Tais autores atribuíram este fenômeno ao polimorfismo na dissolução da proteína estudada por difração de raios-X. Ou seja, diferentes graus de amorfia do sólido são responsáveis por tais variações de concentração incomum a tempos curtos.

No estudo cinético apresentado na Figura 7, observou-se que a taxa de diminuição da concentração de proteína na fase sobrenadante reduziu a partir de 2 dias, porém por inspeção da Figura 7 observou-se decréscimo na concentração de proteína até o último dia de experimento. Por este motivo, novo estudo cinético foi realizado de 5 a 7 dias para assegurar que medidas de concentração de proteína fossem realizadas no equilíbrio de fases.

No novo estudo (Figura 9), para os três tempos testados, as concentrações proteicas na fase sobrenadante foram iguais estatisticamente para as concentrações iniciais de proteína de 9,9, 12,0 e 14,1 mg/mL, de acordo com teste de Tukey a 95% de confiança. Para concentração inicial de proteína de 6,0 mg/mL, as concentrações de proteína sobrenadante não são iguais, enquanto que para concentração inicial de 7,9 mg/mL, as concentrações de insulina na fase sobrenadante são iguais somente em 6 e 7 dias. Por este motivo, selecionou-se os resultados de precipitação das concentrações iniciais de proteína de 7,9 a 14,1 mg/mL em 6 e 7 dias para verificação do efeito da concentração inicial de insulina na sua concentração de equilíbrio.

Figura 9. Cinética de precipitação de insulina com NaCl 4,00 mol/kg de solvente. Concentrações iniciais de proteína (Ci) de 6,0 a 14,1 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.



As concentrações de insulina mensuradas estavam ao redor de 0,25 mg/mL e os dados indicam que não houve efeito da concentração inicial de insulina sobre a concentração de insulina no equilíbrio. De acordo com Shih, Prausnitz e Blanch (1992), quando a concentração de proteína no equilíbrio varia com a concentração inicial de proteína, menores concentrações de sal amplificam esta variação. Por tanto, a redução da concentração de NaCl poderia evidenciar a ocorrência de variações de concentração no equilíbrio em função da concentração inicial de proteína. Por este motivo decidiu-se realizar outros dois estudos cinéticos nas concentrações de NaCl iguais a 3,00 e 1,10 mol/kg de solvente para verificar se de fato a concentração inicial de insulina não afeta a sua concentração na fase sobrenadante no equilíbrio.

Os resultados das precipitações nas novas concentrações salinas estão nas Figuras 10 e 11. O teste de Tukey a 95% de confiança realizado para os dados de concentração de proteínas das diferentes concentrações iniciais mostrou que o equilíbrio de fases foi atingido tanto nas precipitações a concentração de NaCl de 3,00 quanto a de 1,10 mol/kg de solvente. No entanto, nos dois casos observou-se dois comportamentos. Os dados de concentração de proteína da Figura 10 são todos iguais estatisticamente independente da concentração inicial de proteína enquanto que os dados da Figura 11 variaram em função da concentração inicial de proteína, comportamento já relatado para outras proteínas na literatura (MELLANBY, 1905; PINHEIRO et al., 2016; SHIH; PRAUSNITZ; BLANCH, 1992).

Figura 10. Cinética de precipitação de insulina bovina com NaCl 3,00 mol/kg de solvente. Concentração inicial de proteína (C_i) de 8,0 a 14,1 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.

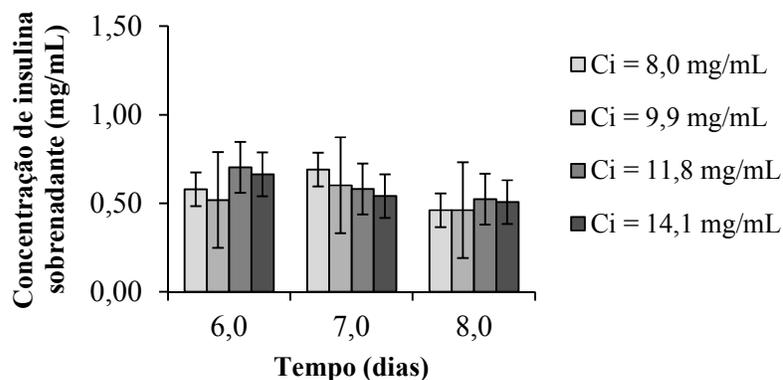
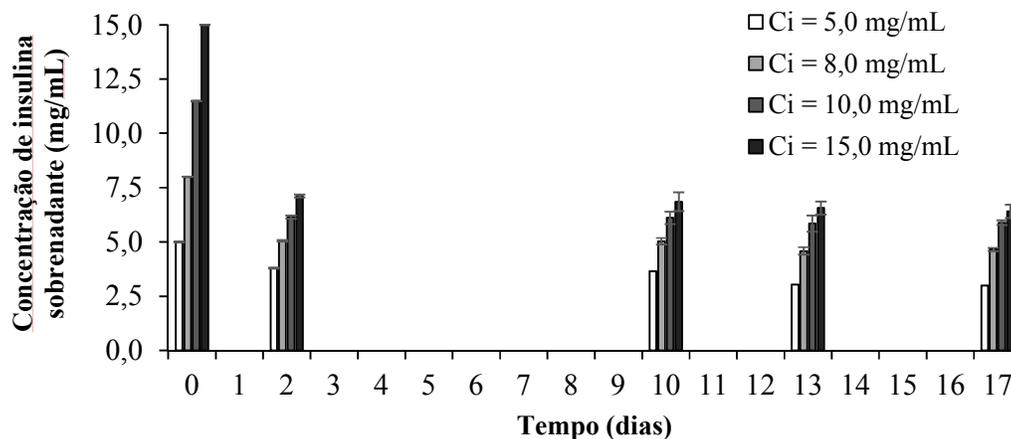


Figura 11. Cinética de precipitação de insulina bovina com NaCl 1,10 mol/kg de solvente. Concentração inicial de proteína (Ci) de 5,0 a 15,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.



4.2 Estudos preliminar e cinético da precipitação de BSA

Os estudos preliminares de precipitação de BSA foram realizados em 58 h (Tabela 7). Na concentração de NaCl de 0,25 mol/L, não foi possível identificar precipitado visualmente e na concentração de 2,00 mol/L aproximadamente 97% da massa inicial de proteína precipitou. A precipitação excessiva pode dificultar a determinação da concentração de proteína no sobrenadante. Por este motivo, decidiu-se selecionar a concentração de NaCl igual a 0,65 mol/L para o estudo cinético. Embora esta concentração não tenha sido utilizada no experimento preliminar, pouco precipitado foi obtido na concentração de NaCl 0,50 mol/L e 65% da proteína precipitou a 1,00 mol/L de sal.

Tabela 7. Estudo preliminar de precipitação de BSA em 2,4 dias. Concentração inicial de BSA igual a 5,0 mg/mL.

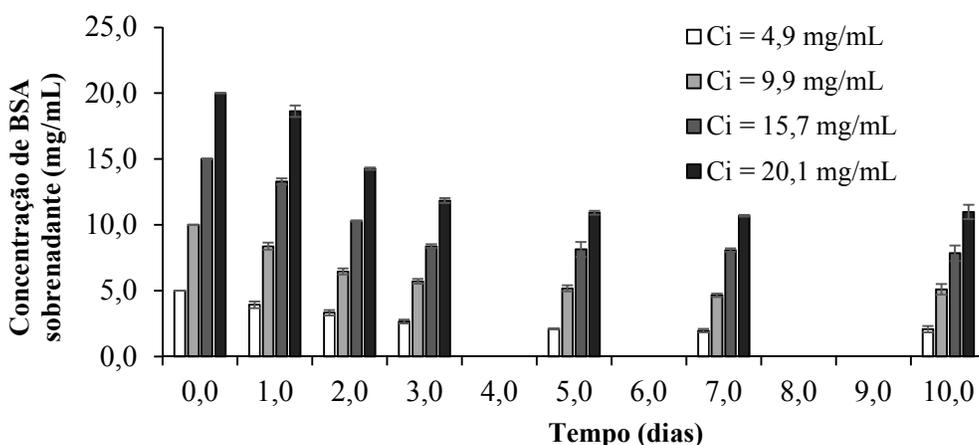
C_{NaCl}^a (mol/L)	C_{BSA}^b (mg/mL)	Recuperação no precipitado (%)
0,25	$4,79 \pm 0,01$	4,2
0,50	$4,10 \pm 0,23$	18,1
1,00	$1,73 \pm 0,07$	65,3
1,50	$0,84 \pm 0,25$	83,2
2,00	$0,16 \pm 0,03$	96,8

^a C_{NaCl} = concentração de cloreto de sódio

^b C_{BSA} = concentração de BSA na fase sobrenadante

O estudo cinético à concentração de NaCl de 0,65 mol/L foi feito coletando-se dados de concentração de proteína ao longo de 10 dias (Figura 12). Diminuição acentuada da concentração de proteína na fase sobrenadante ocorreu até 5 dias. Verificou-se, pelo teste de Tukey que, a partir de 5 dias as concentrações de BSA na fase sobrenadante, para uma dada concentração inicial de BSA, são iguais estatisticamente. Porém, quando se compara concentrações na fase sobrenadante oriundas de diferentes concentrações iniciais de BSA, verifica-se diferença de concentração de acordo com o método estatístico. Portanto, pontos a partir de 5 dias foram tomados para o estudo do efeito da concentração inicial na concentração de equilíbrio.

Figura 12. Cinética de precipitação de BSA com NaCl 0,65 mol/L. Concentração inicial de proteína (C_i) de 4,9 a 20,1 mg/mL. Tampão acetato 0,010 mol/L, pH 4,0 a $25,0 \pm 0,1$ °C.



Shih, Prausnitz e Blanch (1992) precipitaram BSA por *salting-out*, porém utilizando fosfato de sódio como agente precipitante. Tais autores também verificaram que a concentração de BSA da fase leve varia linearmente com a concentração inicial de BSA. Shiau e Chen (1997), precipitaram BSA com sulfato de amônio e verificaram ainda que a concentração de BSA pode aumentar com a concentração inicial de proteína até um valor máximo, a partir do qual concentrações iniciais de BSA maiores resultam em solubilidade aparente decrescente.

4.3 Estudos preliminar e cinético da precipitação de lisozima

O primeiro estudo preliminar para a lisozima durou 5 dias e nele variou-se a concentração de NaCl de 2,50 a 3,50 mol/L (Tabela 8). Na concentração de sal de 3,50 mol/L

precipitou-se 29% da massa inicial de proteína. Nesta concentração de sal a concentração de proteína na fase sobrenadante foi de 3,5 mg/mL, considerada adequada para o estudo cinético.

Tabela 8. Estudo preliminar de precipitação de lisozima em 5 dias. Concentração inicial de lisozima igual a 5,0 mg/mL.

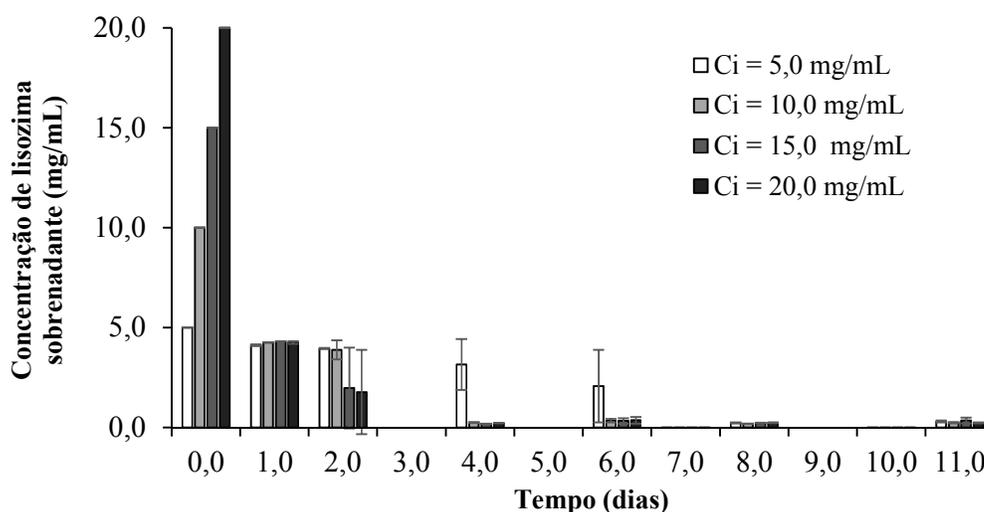
C_{NaCl}^a (mol/L)	C_{lisozima}^b (mg/mL)	Recuperação no precipitado (%)
2,50	4,71 ± 0,01	5,75
3,00	4,32 ± 0,10	13,7
3,50	3,56 ± 0,03	28,9

^a C_{lisozima} = concentração de lisozima na fase sobrenadante

^b C_{NaCl} = concentração de NaCl

Apesar da pouca precipitação ocorrida no estudo preliminar, na cinética de precipitação de lisozima (Figura 13), mais de 95% da massa inicial da proteína foi precipitada até o fim do experimento. A análise estatística mostrou que o equilíbrio em todas as condições só é atingido no oitavo dia. Comparada à precipitação de BSA, verifica-se que a cinética é muito mais lenta, já que sob a mesma concentração inicial de BSA e com uma concentração de NaCl consideravelmente menor, o equilíbrio foi atingido em 5 dias.

Figura 13. Cinética de precipitação de lisozima com NaCl 3,50 mol/L. Concentração inicial de proteína (C_i) de 5,0 a 20,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a 25,0 ± 0,1 °C.



Assim como na precipitação de insulina, realizou-se uma nova precipitação de lisozima com concentração de NaCl menor, a fim de obter concentrações de lisozima no sobrenadante maiores para que, caso haja alterações na concentração de equilíbrio, elas possam ser detectadas. Novos estudos preliminares foram feitos e os resultados mais significativos são apresentados na Tabela 9. A partir destes dados escolheu-se a concentração de NaCl igual 1,05 mol/L para o novo estudo cinético por restar, na fase sobrenadante, pouco menos de 4 mg/mL.

Tabela 9. Estudo preliminar de precipitação de lisozima em 4 dias.

$C^{\circ}_{\text{lisozima}}^a$ (mg/mL)	C_{NaCl}^b (mol/L)	C_{lisozima}^c (mg/mL)	Recuperação no precipitado (%)
15,0	1,05	$3,45 \pm 0,03$	$77,0 \pm 0,22$
	1,15	$3,01 \pm 0,14$	$79,9 \pm 0,95$
	1,25	$2,80 \pm 0,26$	$81,3 \pm 1,75$
25,0	1,05	$3,94 \pm 0,06$	$84,2 \pm 0,25$
	1,15	$3,06 \pm 0,22$	$87,7 \pm 0,86$
	1,25	$3,28 \pm 0,18$	$86,9 \pm 0,72$

^a $C^{\circ}_{\text{lisozima}}$ = concentração inicial de lisozima

^b C_{NaCl} = concentração de NaCl

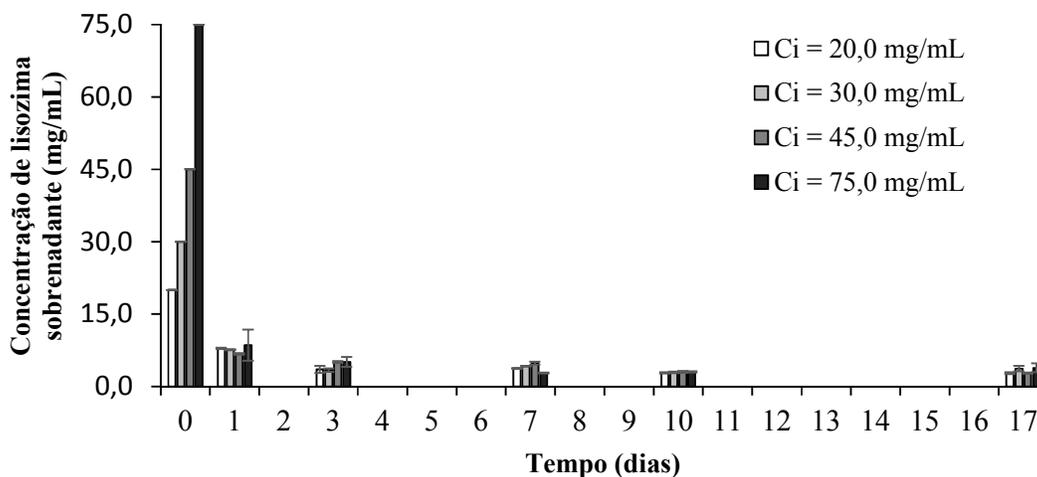
^c C_{lisozima} = concentração de lisozima na fase sobrenadante

No estudo cinético à concentração de sal de 1,05 mol/L (Figura 14), observa-se uma rápida diminuição na concentração de proteína sobrenadante nas primeiras 24 h, porém a partir de 1 dia, pequena redução ocorreu de modo que em 10 dias verificou-se o equilíbrio de fases (teste de Tukey a 95% de confiança). Mesmo à concentração de sal mais baixa, a concentração de proteína na fase sobrenadante permaneceu independente da concentração inicial de lisozima.

Shih, Prausnitz e Blanch (1992) classificaram a lisozima entre as proteínas cuja a solubilidade é constante independente da concentração inicial de proteína empregada na precipitação. Entretanto, Shiau e Chen (1997) verificaram em precipitação com sulfato de amônio que a solubilidade decresce com o aumento da concentração inicial. Pinheiro e colaboradores (2016) observaram aumento da solubilidade aparente com a concentração inicial em que os dados experimentais se ajustaram bem a uma curva exponencial. Portanto, o

método de precipitação aparenta afetar diretamente o comportamento da solubilidade aparente.

Figura 14. Cinética de precipitação de lisozima com NaCl 1,05 mol/L. Concentração inicial de proteína (C_i) de 20,0 a 75,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1$ °C.



4.4 Estudos preliminar e cinético da precipitação de tripsina

Os estudos preliminares de precipitação de tripsina foram realizados variando-se a concentração de NaCl de 0,5 a 3,0 mol/L em precipitação de 3 dias (Tabela 10). No experimento em que foi empregado concentração de NaCl 2,50 mol/L foi medido no sobrenadante concentração de proteína de aproximadamente 4 mg/mL, atendendo ao critério estabelecido e, por este motivo, foi esta a concentração de sal escolhida para o estudo cinético.

Na Figura 15, o estudo cinético da precipitação de tripsina é apresentado. Verifica-se um comportamento similar ao estudo cinético de BSA em que a concentração de proteína na fase sobrenadante varia com a concentração inicial. Não foram encontrados na literatura estudos do efeito da concentração inicial de tripsina na precipitação da mesma, porém, Shih, Prausnitz e Blanch (1992) precipitaram quimotripsina com fosfato de sódio e observaram dependência da concentração na fase leve com a concentração inicial de quimotripsina. Tripsina e quimotripsina têm massas moleculares próximas, possuem cadeias homólogas e mecanismos cinéticos semelhantes (VOET; VOET; PRATT, 2008).

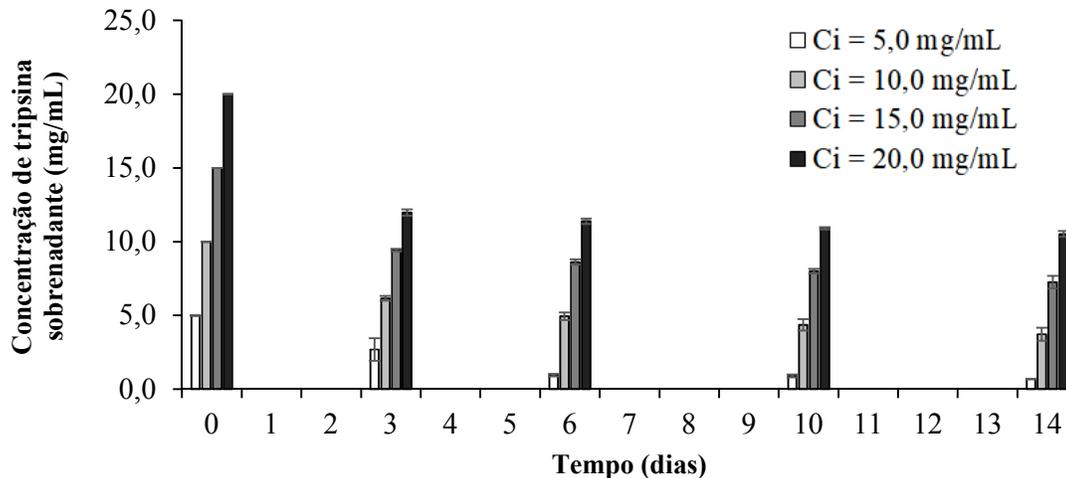
Tabela 10. Estudo preliminar de precipitação de tripsina em 3 dias. Concentração inicial de tripsina igual a 6,5 mg/mL.

$C_{\text{NaCl}}^{\text{a}}$ (mol/L)	$C_{\text{tripsina}}^{\text{b}}$ (mg/mL)	Recuperação, precipitado (%)
0,50	6,24 ± 0,03	4,11 ± 0,52
1,00	5,54 ± 0,03	14,9 ± 0,50
1,50	5,13 ± 0,09	21,1 ± 1,30
2,00	4,45 ± 0,03	31,7 ± 0,44
2,50	4,18 ± 0,07	35,7 ± 1,10
3,00	3,54 ± 0,12	45,6 ± 1,80

^a C_{NaCl} = concentração de NaCl

^b C_{tripsina} = concentração de tripsina na fase sobrenadante

Figura 15. Cinética de precipitação de tripsina com NaCl 2,50 mol/L. Concentração inicial de proteína (C_i) de 5,0 a 20,0 mg/mL. Tampão glicina/NaOH 0,010 mol/L, pH 3,0 a 25,0 ± 0,1°C.



O teste de Tukey mostrou que, para todas as condições iniciais, a média das concentrações de tripsina no sobrenadante em 10 e 14 dias são iguais estatisticamente e, assim, considerou-se que o equilíbrio de fases foi alcançado. Tais concentrações também são iguais as obtidas em 6 dias na concentração inicial de 5,0 e 20,0 mg/mL. Decidiu-se usar os dados do dia 10 e 14 para os estudos seguintes, no entanto, a inspeção visual da Figura 15 causa a impressão de diminuição na concentração de tripsina.

Por ser uma protease, suspeitou-se de possível autólise da tripsina. Para verificar se isto ocorreu, monitorou-se através de um ensaio controle a concentração de tripsina ao longo do tempo, partindo de uma concentração inicial de tripsina igual às utilizadas no experimento cinético, porém sem adição de sal. Monitorou-se também o pH ao longo do tempo para uma batelada de precipitação na condição inicial de 20,0 mg/mL.

Verificou-se uma queda na concentração de proteína do controle ao longo do tempo (Tabela 11). A diminuição foi mais expressiva nas condições de concentração inicial iguais a 15 e 10 mg/mL, equivalentes a 7,3 e 8,8%, respectivamente.

Tabela 11. Controle da precipitação de tripsina.

Tempo (dias)	Concentração de tripsina (mg/mL)			
0	20,0	15,0	10,0	5,00
14	18,9	13,9	9,12	4,82
23	16,6	12,9	8,72	4,55

Quanto ao monitoramento do pH (Tabela 12) não foi verificada grandes variações neste parâmetro, mantendo-se este próximo a 3,0. De acordo com Shukla (2009), a tripsina é estável em pH 2-3 até 40°C e tem tendência de sofrer autólise em pH acima de 5. Porém, Keil (1971) alerta que apesar de estável em pH 3,0 e a baixa temperatura, não se pode excluir a possibilidade de reação bioquímica. Além disso, apesar de pequena a variação, verifica-se uma tendência de crescimento do pH, portanto, autólise pode ser a causa da diminuição da concentração de tripsina apresentado na Tabela 11.

Tabela 12. Monitoramento do pH da solução de tripsina tampão e sal.

Tempo	pH
5 min	2,93
10 dias	3,04
23 dias	3,14

4.5 Estudos preliminar e cinético da precipitação de IgG

No estudo preliminar de precipitação de IgG (Tabela 13), verificou-se que é necessário grande quantidade de NaCl para precipitar esta imunoglobulina. No entanto, decidiu-se escolher a concentração de sal de 1,00 mol/L, pois, no sobrenadante, permanece aproximadamente 4 mg/mL de proteína.

Tabela 13. Estudo preliminar de precipitação de IgG em 5 dias. Concentração inicial de IgG igual a 5,0 mg/mL.

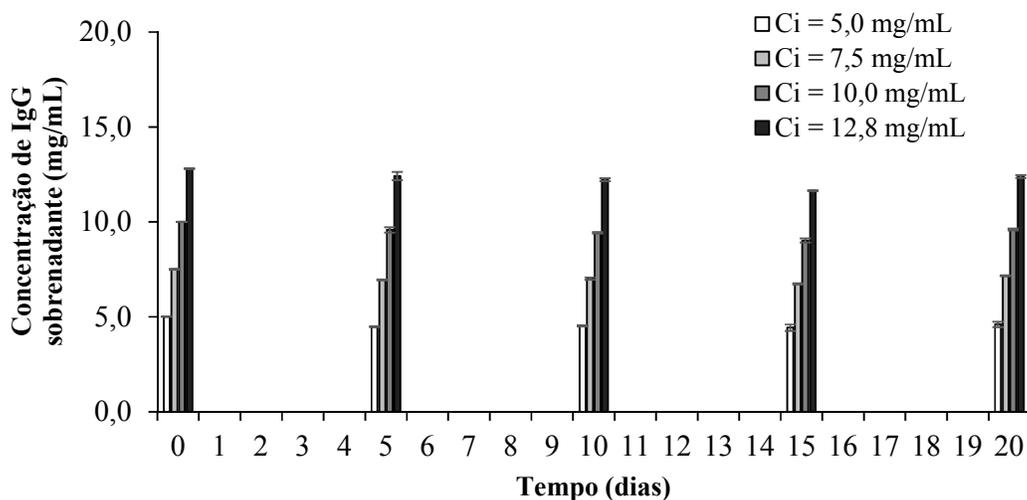
C_{NaCl}^a (mol/L)	C_{IgG}^b (mg/mL)	Recuperação no precipitado (%)
0,50	4,16 ± 0,06	16,8 ± 1,2
0,75	4,15 ± 0,07	17,1 ± 1,4
1,00	4,11 ± 0,07	17,9 ± 1,4
1,50	3,77 ± 0,06	24,6 ± 1,3
2,00	3,17 ± 0,28	36,6 ± 5,6
2,50	2,19 ± 0,44	56,1 ± 8,9
3,00	1,62 ± 0,93	67,6 ± 19,0

^a C_{NaCl} = concentração de cloreto de sódio

^b C_{IgG} = concentração de IgG na fase sobrenadante

A cinética de precipitação de IgG com 1,00 mol/L de NaCl é apresentada na Figura 16. Nota-se que quase não há mudança na concentração de proteína na fase sobrenadante entre o tempo 0 e 20 dias, porém uma pequena quantidade de sólido pôde ser identificada visualmente após a centrifugação. O teste de Tukey mostrou que a partir de 5 dias, as concentrações de proteína na fase sobrenadante são iguais para uma dada condição inicial.

Figura 16. Cinética de precipitação de IgG com NaCl 1,00 mol/L. Concentração inicial de proteína (C_i) de 5,0 a 12,8 mg/mL. Tampão tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



No intuito de eliminar qualquer dúvida em relação à ocorrência de precipitação, analisou-se o sólido contido no tubo quanto ao teor de proteína seguindo a mesma metodologia de análise do sobrenadante. Para isso, o sólido foi dissolvido em 2 mL de tampão tris-HCl 0,010 mol/L pH 7,30.

A Tabela 14 apresenta o balanço de massa da precipitação de IgG. A recuperação de proteína no precipitado alcançou 11,1%, para concentração inicial de IgG de 5,0 mg/mL. Portanto, verifica-se que a precipitação de proteína realmente ocorreu, devido à quantidade de proteína significativa determinada no precipitado, assim como pelo fechamento do balanço de massa que apresentou desvio de menos de 1,5% em relação a 100% de recuperação global.

Tabela 14. Balanço de massa da precipitação de IgG.

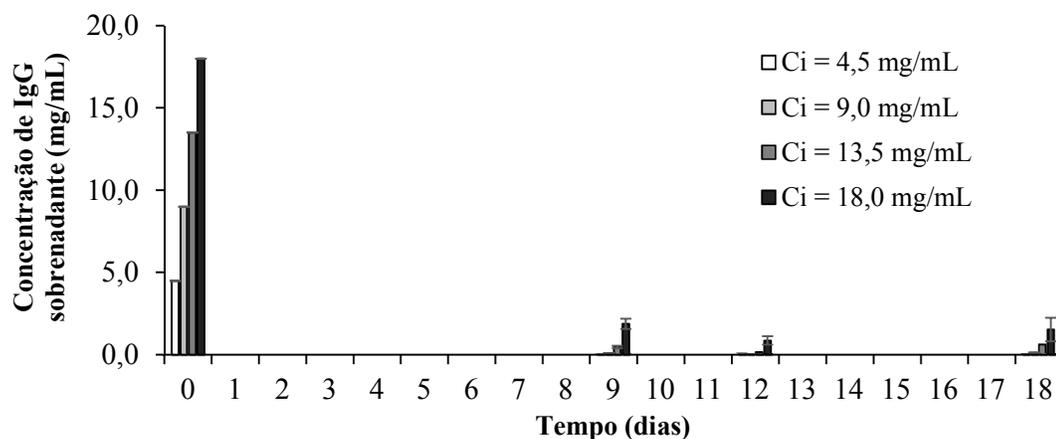
C°_{IgG} (mg/mL)	Recuperação no sobrenadante (%)	Recuperação no precipitado (%)	Recuperação global (%)
12,8	95,1 ± 0,36	3,53 ± 0,86	98,6 ± 1,2
10,0	94,1 ± 0,26	4,28 ± 1,90	98,3 ± 1,4
7,50	92,8 ± 0,17	6,09 ± 1,40	98,9 ± 1,4
5,00	90,1 ± 0,18	11,1 ± 3,70	101 ± 1,3

* C°_{IgG} = concentração inicial de IgG

Contudo, a IgG é a proteína com menor grau de pureza utilizada neste trabalho, cerca de 80%, e devido à baixa quantidade de proteína encontrada no precipitado, não se pode assegurar que se trata de IgG. Por este motivo decidiu-se realizar nova precipitação a concentração de NaCl maior para que uma quantidade maior de proteína precipitasse assegurando que quantidades significativas de IgG se encontrassem no precipitado. De acordo com o estudo preliminar (Tabela 13), a concentração de NaCl de 2,50 mol/L é suficiente para precipitar mais de 50% das proteínas e foi escolhida para o novo estudo cinético.

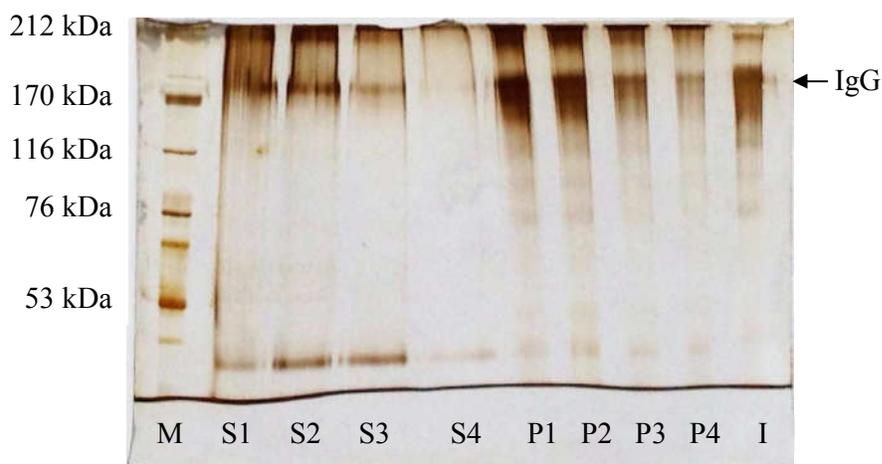
No novo estudo cinético quase toda a proteína foi precipitada e, desta forma, assegurou-se que a IgG precipitou (Figura 17). O teste de Tukey mostrou que a partir de 9 dias, todas as concentrações de proteína na fase sobrenadante obtidas a partir de uma mesma concentração inicial são iguais estatisticamente a 95% de confiança. Por outro lado, a comparação dos dados em um determinado tempo indica que as concentrações de proteína sobrenadante são diferentes estatisticamente para diferentes concentrações iniciais de proteína.

Figura 17. Cinética de precipitação de IgG com NaCl 2,50 mol/L. Concentração inicial de proteína (C_i) de 4,5 a 18,0 mg/mL. Tampão Tris-HCl 0,010 mol/L, pH 7,3 a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.



Uma eletroforese SDS-PAGE da solução empregada na precipitação, do sobrenadante coletado após a precipitação e do precipitado foi realizada a fim de verificar se de fato a IgG estava presente no precipitado (Figura 18). Bandas correspondentes a IgG aparecem claramente em todos os precipitados indicando que quantidade significativa de IgG foi precipitada.

Figura 18. Gel de eletroforese SDS-PAGE. A coluna M é referente aos marcadores de massa molecular. As colunas S de 1 a 4 correspondem aos sobrenadantes das precipitações a concentrações iniciais de IgG iguais a 18,0, 13,5, 9,0 e 4,5 mg/mL. As bandas de P1 a P4 são referentes aos precipitados das precipitações a concentrações iniciais de IgG iguais a 18,0, 13,5, 9,0 e 4,5 mg/mL. Na coluna I está a banda da solução de IgG empregada nas precipitações.



As soluções sobrenadantes empregadas na eletroforese foram diluídas em solução tampão em proporções iguais, conseqüentemente, a intensidade da banda é proporcional a quantidade de proteína sobrenadante após a precipitação. Observa-se na Figura 18 diminuição da intensidade das bandas da pista S1 até S4, ou seja, diminuição da intensidade da banda com a diminuição da concentração inicial de IgG. Tal redução é indicativo de decréscimo da concentração de proteína sobrenadante no equilíbrio e concorda com os dados do estudo cinético da Figura 17.

A IgG é uma globulina do soro sanguíneo e o primeiro relato na literatura de alterações na solubilidade em função da concentração inicial de proteína foi justamente de globulinas do soro de cavalo. Mellanby (1905) relatou que extraiu globulinas do soro de cavalo, em seguida as dissolveu em solução salina de NaCl e verificou que a quantidade de globulinas dissolvida, após saturação do sistema, é diretamente proporcional a quantidade inicial de globulinas.

O estudo realizado por Mellanby (1905) utilizou globulinas e, portanto, a mistura proteica pode ter efeito marcante na variação da concentração de globulinas solúvel em solução salina. A IgG é a proteína com menor grau de pureza utilizada neste trabalho, porém esta deve ter grau de pureza superior a de Mellanby e, ainda assim, neste trabalho observou-se que a concentração de IgG na fase sobrenadante após precipitação é função da concentração inicial de proteína assim como no caso das globulinas de cavalo do trabalho de Mellanby. A pureza da IgG empregada neste trabalho indicada pelo fabricante é de aproximadamente 80%.

4.6 Estudos preliminar e cinético da precipitação de ovalbumina

Realizou-se os estudos preliminares de precipitação de ovalbumina com concentração inicial de proteína igual a 11,7 mg/mL. Os dados de concentração na fase sobrenadante são apresentados na Tabela 15 em que se verifica que apenas na concentração de NaCl igual a 2,50 mol/L obteve-se aproximadamente 4 mg/mL de ovalbumina. Esta concentração de sal foi selecionada para o estudo cinético.

No estudo cinético (Figura 19), as concentrações na fase sobrenadante variaram para diferentes concentrações iniciais de proteína, porém mesmo com 18 dias de experimento não se atingiu o equilíbrio de fases. Além disso, o desvio padrão para a precipitação realizada a 17,8 mg/mL de concentração inicial mostrou-se elevado.

O aspecto visual do precipitado foi diferente dos obtidos a partir das outras proteínas empregadas neste trabalho. Ele não se apresentou como partículas sólidas

depositadas no fundo do tubo, mas com aspecto de gel. A Figura 20 é uma imagem obtida com aumento de 400 vezes em microscópio ótico na qual se pode observar linhas paralelas na estrutura do sólido que lembram fibrilas.

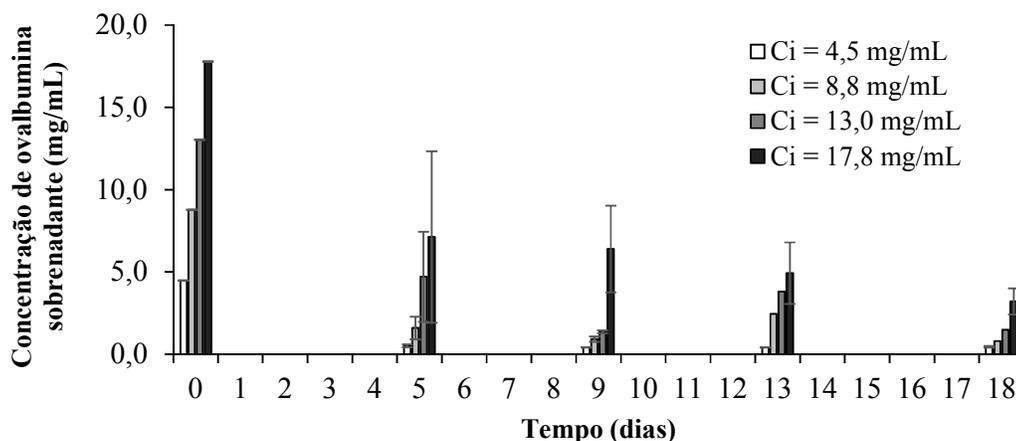
Tabela 15. Estudo preliminar de precipitação de ovalbumina em 5 dias. Concentração inicial de ovalbumina igual a 11,7 mg/mL.

C_{NaCl}^a (mol/L)	$C_{Ovalbumina}^b$ (mg/mL)	Recuperação no precipitado (%)
0,25	9,72	17,0
0,50	9,17	21,7
1,00	8,75	25,3
1,50	8,14	30,5
2,00	8,15	30,3
2,50	4,03	65,6

^a C_{NaCl} = concentração de cloreto de sódio

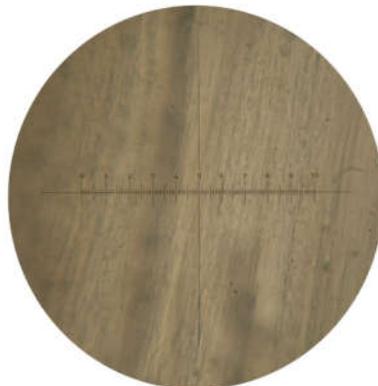
^b C_{IgG} = concentração de IgG na fase sobrenadante

Figura 19. Cinética de precipitação de ovalbumina com NaCl 2,75 mol/kg de solvente. Concentração inicial de proteína (C_i) de 4,5 a 18,0 mg/mL.



Proteínas podem formar diferentes tipos de agregados insolúveis, por exemplo, os amiloides que são estruturas não cristalinas de polímeros ordenados em fibrilas (JARRETT; LANSBURY, 1993). A formação das fibrilas é similar à formação de cristais, pois requer o rompimento de uma barreira energética para a formação de núcleos a partir de associação e dissociação de monômeros que, uma vez formado, cresce (HOSHINO, 2017).

Figura 20. Imagem do precipitado de ovalbumina com aumento de 400 vezes. Condições da precipitação: concentração inicial de proteína igual a 4,5 mg/mL e concentração de NaCl igual a 2,75 mol/kg de solvente.



Sabe-se que ovalbumina forma diferentes tipos de amiloides quando desnaturada por aquecimento e a força iônica tem efeito sobre a formação das fibrilas (LARA et al., 2012; PEARCE; MACKINTOSH; GERRARD, 2007). Não foram encontrados na literatura relatos de formação de amiloides por *salting-out* de soluções de ovalbumina, porém Klemente e colaboradores (2007) realizaram precipitações com diferentes sais de um peptídeo associado ao Alzheimer e verificaram a formação de amiloides.

4.7 Efeito da concentração inicial de proteína na concentração de proteína no equilíbrio

Com os dados de concentração de proteína no sobrenadante no equilíbrio das proteínas estudadas, pode-se determinar se houve efeito da concentração inicial sobre a concentração de proteína no equilíbrio e, em caso positivo, verificar se havia correlação entre o efeito e à massa molecular da proteína.

A Figura 21 apresenta os gráficos de concentração de proteína na fase sobrenadante em função da concentração inicial de proteína para todas as proteínas estudadas. Os dados de concentração plotados são médias de todas as medidas feitas no equilíbrio de acordo com o estudo cinético. Da mesma forma, os desvios padrão foram obtidos a partir destas medidas. Por exemplo, pelo estudo cinético, o equilíbrio de fases da precipitação de BSA foi atingido em 5 dias, portanto, utilizou-se os dados obtidos em 5, 7 e 10 dias. Os apêndices deste trabalho contêm todos os dados usados na Figura 21. Diferenças de concentração de proteína no equilíbrio em função da concentração inicial de proteína foram determinadas estatisticamente através de teste de Tukey a 95% de confiança

Figura 21. Gráficos de concentração de proteína na fase sobrenadante no equilíbrio em função da concentração inicial de proteína. As “proteínas/concentração de NaCl” foram: (a) insulina/4,00 mol/kg de solvente; (b) insulina/3,00 mol/kg de solvente; (c) insulina/1,10 mol/kg de solvente; (d) lisozima/3,50 mol/L; (e) lisozima/1,05 mol/L; (f) BSA/0,65 mol/L; (g) tripsina/2,50 mol/L; (h) IgG/1,00 mol/L e (i) IgG/2,50 mol/L.

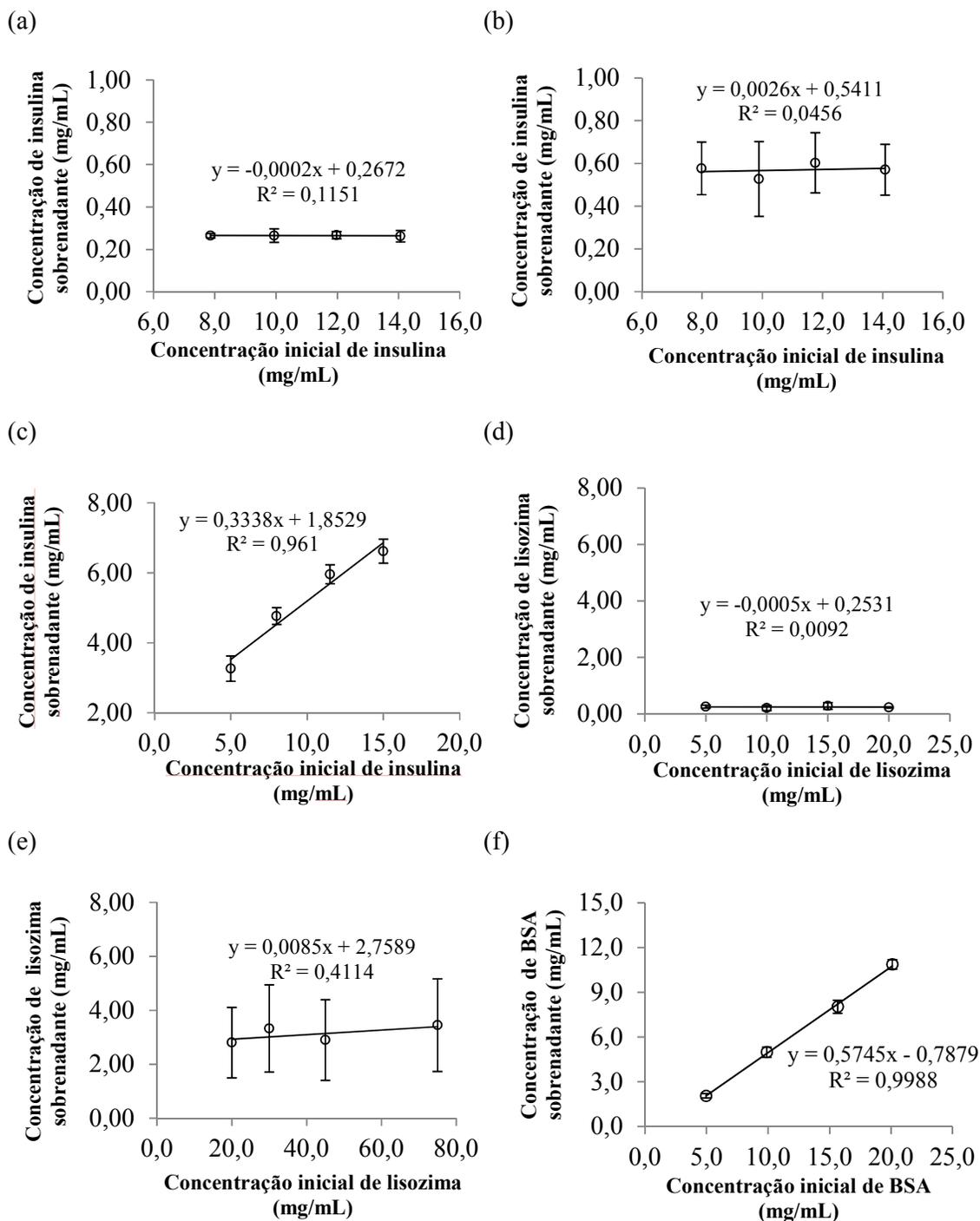
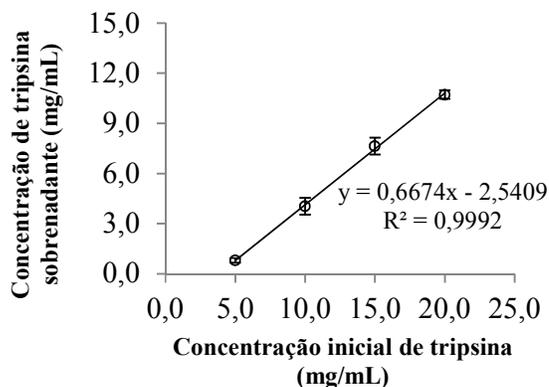
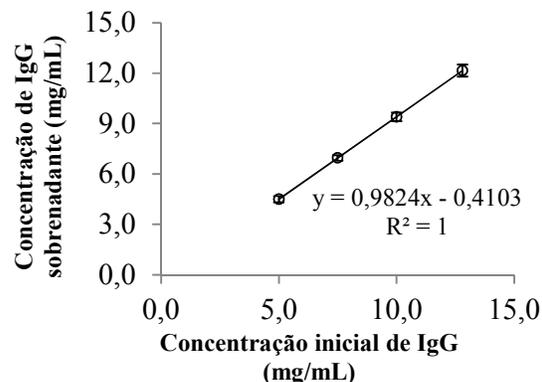


Figura 21 (continuação). Gráficos de concentração de proteína na fase sobrenadante no equilíbrio em função da concentração inicial de proteína. As “proteínas/concentração de NaCl” foram: (a) insulina/4,00 mol/kg de solvente; (b) insulina/3,00 mol/kg de solvente; (c) insulina/1,10 mol/kg de solvente; (d) lisozima/3,50 mol/L; (e) lisozima/1,05 mol/L; (f) BSA/0,65 mol/L; (g) tripsina/2,50 mol/L; (h) IgG/1,00 mol/L e (i) IgG/2,50 mol/L.

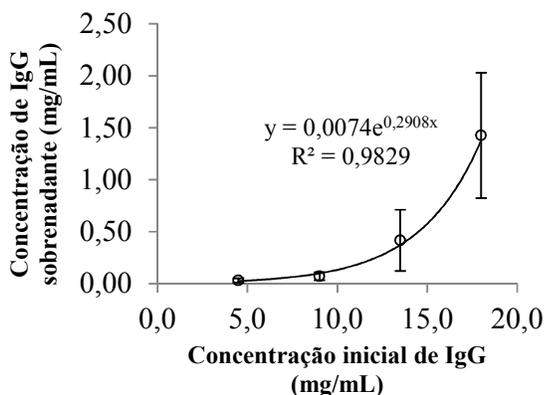
(g)



(h)



(i)



Os dados de precipitação de insulina no equilíbrio (Figura 21a, b, c) mostraram que o efeito da concentração inicial de proteína sobre a concentração de proteína equilíbrio está presente apenas a baixas concentrações de sal. Nas precipitações com concentração de NaCl iguais a 4,00 e 3,00 mol/kg de solvente, o efeito não é observado (Figura 21a, b); porém, a concentração de proteína na fase sobrenadante variou quando se reduziu a concentração de NaCl para 1,10 mol/kg de solvente (Figura 21c).

Diferentemente da insulina, a lisozima não apresentou o efeito mesmo para as concentrações de NaCl de 3,50 e 1,05 mol/L (Figura 21d, e): para ambas as concentrações de

NaCl, a concentração de proteína na fase sobrenadante não varia com a concentração inicial de proteína.

As medidas de concentração na fase sobrenadante no equilíbrio das precipitações de BSA, tripsina e IgG a diferentes concentrações iniciais de proteína são apresentadas na Figura 21, f, g, h e i. Em todos estes casos, a concentração de proteína na fase sobrenadante no equilíbrio variou com a concentração inicial de proteína.

Verifica-se que os dados de todos os gráficos se ajustam bem a uma reta. Shih, Prausnitz e Blanch (1992), em seu trabalho, diferenciaram proteínas cuja concentração na fase sobrenadante é diretamente proporcional à concentração inicial de proteína em precipitações por *salting-out*, daquelas cujas concentrações é independente da concentração inicial. Esta classificação foi baseada em experimentos de precipitação cujos gráficos de concentração na fase sobrenadante versus concentração inicial de proteína resultaram em coeficientes de correlação da ordem de 0,9. O mesmo foi obtido neste trabalho na precipitação de BSA, tripsina, uma das precipitações de insulina e uma das precipitações de IgG.

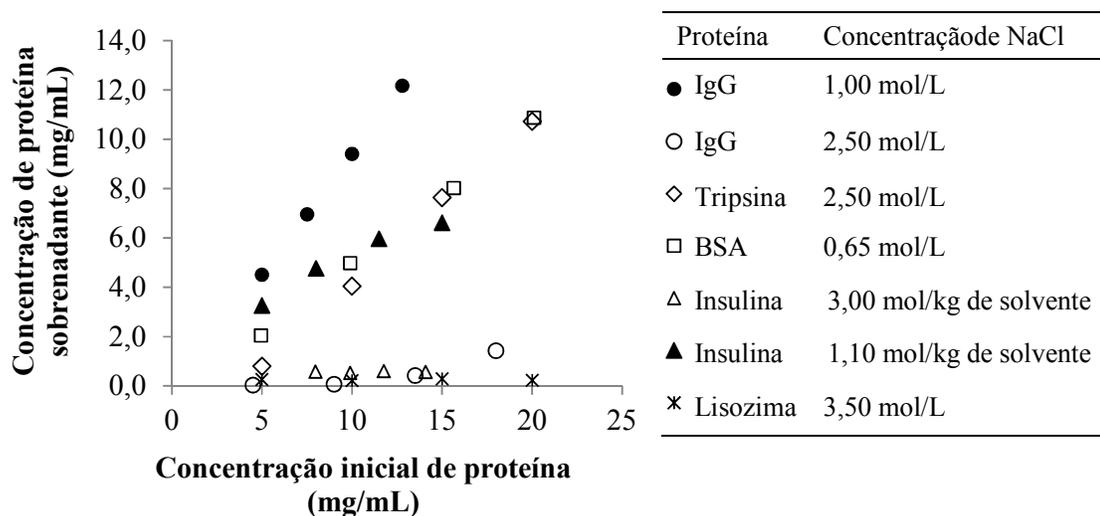
Como mencionado anteriormente, Shih, Prausnitz e Blanch (1992) precipitaram BSA e lisozima por *salting-out* com fosfato de sódio e verificaram o efeito da concentração inicial para a primeira e não observaram o efeito para a segunda. Os resultados deste trabalho corroboram com os resultados obtidos por estes autores, porém, Pinheiro et al. (2016) precipitou lisozima com antisolventes (etanol e acetona) a diferentes concentrações iniciais e observou que a concentração de equilíbrio da lisozima nestas precipitações depende da concentração inicial da mesma. Consequentemente, a dependência da concentração de equilíbrio com a concentração inicial pode ser dependente do método de precipitação.

Shiau e Chen (1997) verificaram dependência da concentração de proteína no equilíbrio com a concentração inicial de proteína em precipitações com sulfato de amônio de BSA e de lisozima. Quando precipitaram lisozima, a variação de solubilidade aparente foi consideravelmente menos pronunciada, porém a concentração de lisozima no equilíbrio decresceu com o aumento da concentração inicial enquanto que a concentração de BSA aumentou até um valor máximo e depois decresceu. Nenhuma destas observações foram verificadas neste trabalho.

A Figura 22 apresenta um gráfico de concentração de proteína sobrenadante no equilíbrio em função da concentração inicial de proteína que inclui todas as proteínas estudadas. Nesta imagem verifica-se variedade de inclinações em que apenas lisozima está paralela ao eixo de concentração inicial de proteína e, portanto, foi a única proteína que não

apresentou efeito da concentração inicial sobre a concentração de proteína na fase leve no equilíbrio, seja a concentração de NaCl baixa ou elevada.

Figura 22. Concentração de proteína na fase sobrenadante em função da concentração inicial de proteína em precipitações a diferentes concentrações de NaCl.

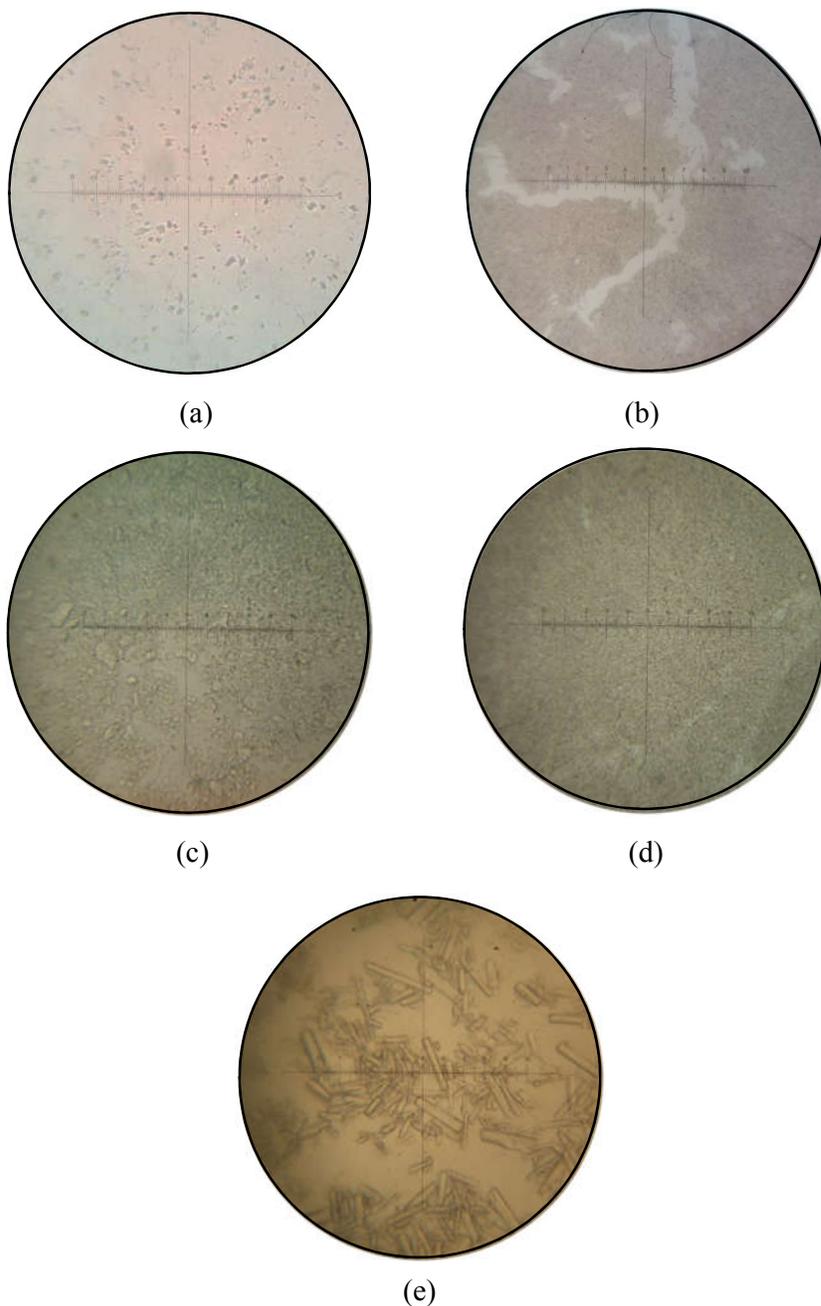


Desreux e Herriott (1939) e Butler (1940) apontaram a presença de impurezas como causa desta variação na solubilidade aparente das proteínas. O grau de impurezas das proteínas estudadas variou bastante e pode ter sido um fator importante no efeito presente na solubilidade aparente da IgG, que tem a menor pureza entre as proteínas estudadas.

No entanto, a proteína com maior grau de pureza deste trabalho, BSA (no máximo 2% de impureza), também apresentou uma solubilidade aparente fortemente dependente da concentração inicial em que o aumento de quatro vezes na concentração de inicial de BSA resultou em um aumento de cinco vezes na concentração de proteína na fase sobrenadante no equilíbrio. Por outro lado, lisozima que pode ter até 10% de impurezas, manteve a concentração no equilíbrio constante. Portanto, este fenômeno deve ser causado por outros fatores além das impurezas.

Outro motivo, apontado na literatura para esta variação na solubilidade aparente são diferenças de cristalinidade ou amorfa na fase precipitado (PINHEIRO et al., 2016). A fase densa obtida nas precipitações foi observada em microscópio com um aumento de 400 vezes. Nos precipitados de insulina, BSA, IgG e tripsina não foi possível identificar cristais, enquanto que cristais são visíveis na fase precipitada de lisozima (Figura 23).

Figura 23. Imagens dos precipitados com aumento de 400 vezes. (a) insulina precipitada a 5,0 mg/mL e NaCl a 1,10 mol/kg de solvente; (b) BSA precipitada a 5,00 mg/mL e NaCl a 0,65 mol/L; (c) IgG precipitada a 5,00 mg/mL e NaCl a 2,50 mol/L; (d) tripsina precipitada a 5,00 mg/mL e NaCl e (e) lisozima precipitada a 20,0 mg/mL e NaCl a 1,05 mol/L .



De acordo com Boistelle e Astier (1988), a taxa de nucleação é função da solubilidade da proteína e do grau de supersaturação. Segundo os autores, quanto maior a concentração de proteína mais próximas as moléculas estarão e mais frequente serão as

colisões que podem levar à formação de núcleos. Também quanto maior o grau de supersaturação, maior é a força motriz da precipitação e maior é a taxa de nucleação. Portanto, para concentrações de proteínas e grau de supersaturação elevados, pode-se esperar uma taxa de nucleação elevada com as moléculas de proteína colidindo nas mais diversas orientações, acarretando na formação de muitos núcleos e sólido amorfo ou pouco cristalino.

Porém, na precipitação de lisozima, apesar das concentrações iniciais de proteína e supersaturação elevadas, observou-se que o precipitado de lisozima não formou um precipitado amorfo, mas apresentou cristais visíveis ao microscópio (Figura 23 e).

Comparando-se os sólidos das precipitações de lisozima e BSA, observou-se um contraste entre a afirmação de Boistelle e Astier (1988) e os dados deste trabalho. Na precipitação de lisozima a 1,05 mol/L de NaCl, a concentração média de lisozima no equilíbrio na fase sobrenadante foi 2,80 mg/mL, ou seja, sete vezes menor que a concentração inicial de 20,0 mg/mL que levou à formação dos cristais da Figura 23e. Já a BSA da Figura 23b é amorfa apesar de ser resultado da precipitação a concentração inicial de BSA de 5,00 mg/mL, ou seja, quatro vezes menor que a concentração inicial da lisozima e 2,4 vezes maior que a concentração de BSA no equilíbrio. Portanto, deve haver outro fator que afete o grau de organização das moléculas em formas mais ou menos amorfas. Neste trabalho, a hipótese é de que outro fator a ser considerado é a massa molecular.

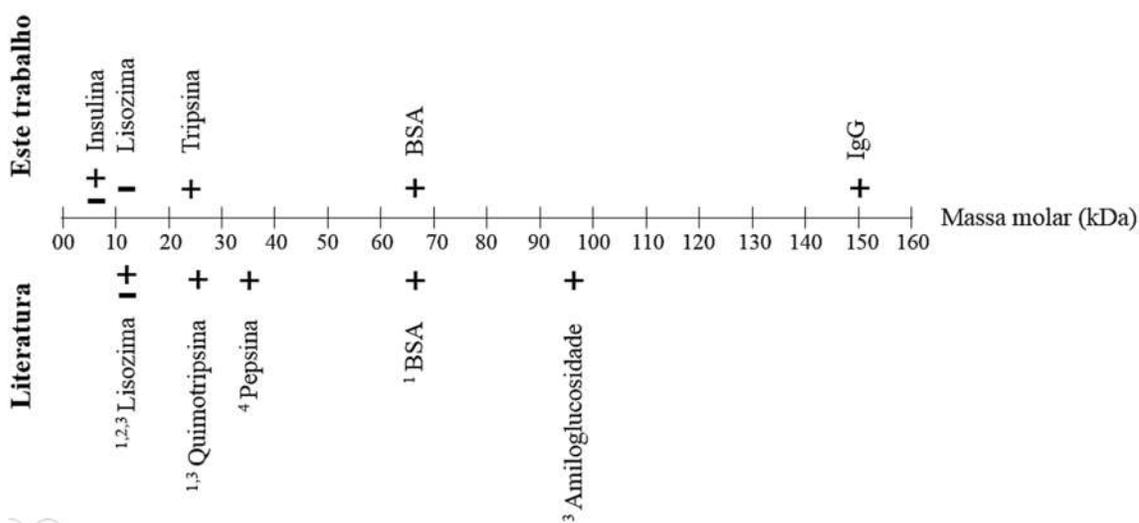
Ao se ordenar as massas moleculares das proteínas utilizadas neste trabalho (Figura 24), verifica-se que apenas a segunda menor proteína, lisozima, não apresenta efeito da concentração inicial de proteína sobre a concentração de proteína no equilíbrio. A menor proteína, insulina, apresenta o efeito à baixa concentração de sal, mas não o apresenta a altas concentrações. As proteínas maiores como tripsina e IgG apresentaram o efeito mesmo a concentrações superiores à menor concentração de sal empregada para precipitar lisozima.

A partir deste conjunto de dados, não é possível inferir que a massa molecular tem efeito sobre o fenômeno estudado, porém a ocorrência do efeito nas proteínas de massa molecular maior indica uma tendência de ocorrência do fenômeno em função da massa molecular, especialmente quando dados da literatura são analisados em conjunto com os dados deste trabalho, como apresentado na Figura 24.

Verificou-se no trabalho de Shih, Prausnitz e Blanch (1992) que das três proteínas estudadas, apenas a menor, lisozima, não apresentou variações de solubilidade aparente com a concentração inicial de proteínas. Outros trabalhos encontrados na literatura em que se discute o efeito da concentração inicial de proteínas na concentração de proteínas

no equilíbrio obtiveram como resultado experimental variações de solubilidade aparente em função da concentração inicial de proteína (MELLANBY, 1905; PINHEIRO et al., 2016; SHIAU; CHEN, 1997; STEINHARDT, 1939).

Figura 24. Proteínas estudadas quanto ao efeito da concentração inicial de proteína na concentração de proteína no equilíbrio: (+) há dados que mostram efeito da concentração inicial sobre a concentração de proteína no equilíbrio; (-) há dados que mostram que não há efeito da concentração inicial da proteína sob a concentração de proteína no equilíbrio.



¹ Shih, Prausnitz e Blanch (1992)

² Pinheiro e colaboradores (2016)

³ Shiau e Chen (1997)

⁴ Steinhardt (1939)

Pesquisas por artigos em que variações de solubilidade aparente não fosse um dos temas principais foram realizadas. A procura por informações de solubilidade de proteínas de diferentes trabalhos e/ou autores que pudessem ser comparadas para fornecer mais informações sobre a presença ou ausência de variações de solubilidade aparente de proteínas mostrou-se difícil. Os dados de solubilidade em diferentes trabalhos são obtidos em condições diferentes por vezes não fornecendo a concentração inicial de proteína empregada.

Com relação à hipótese inicial, já que a diferença de massa molecular das proteínas reflete o tamanho das mesmas, as proteínas de massa molecular maior possuem área superficial maior possibilitando mais pontos de interação proteína-proteína, conseqüentemente, existem mais possibilidades de associações entre as moléculas de proteína sendo que a maioria delas conduzem à formação de estruturas amorfas, ou seja, a

probabilidade de interações que levem a estruturas ordenadas de moléculas é menor. Nesta situação, as altas taxas de nucleação favorecem o prosseguimento das associações mal orientadas, um precipitado amorfo se desenvolve e a concentração de proteína no equilíbrio varia em função do grau de amorfia.

5. Conclusão

Neste trabalho, realizou-se um estudo de equilíbrio de fases de precipitação de proteínas com cloreto de sódio a fim de verificar um possível efeito da massa molecular na concentração de proteína no equilíbrio em função da concentração inicial da proteína, após precipitação, acompanhando-se a concentração de proteína ao longo de dias de forma a se observar o atingimento do equilíbrio. Assim, verificou-se que tripsina suína, BSA e IgG bovina apresentam o fenômeno da dependência da concentração de proteína no equilíbrio em função da concentração inicial de proteína enquanto que lisozima de clara de ovo de galinha não o apresenta. Quanto à insulina bovina, esta apresentou dependência à baixa concentração de sal, mas não apresentou em alta concentração.

Verificou-se uma tendência de aparecimento desta dependência em função da massa molecular, pois apenas proteínas de poucos quilodaltons (5,7 e 14,7 kDa), consideradas pequenas, não apresentaram variação de solubilidade aparente para diferentes concentrações iniciais de proteína. Além disso, a insulina bovina apresentou presença e ausência do fenômeno em função da concentração de sal e a mesma duplicidade verifica-se para lisozima em função do agente precipitante quando se compara este trabalho com a literatura. Logo, cuidado deve ser tomado no desenho de processos de precipitação tendo em vista a possibilidade de dependência da concentração de proteína no equilíbrio com a concentração inicial, especialmente na precipitação de proteínas de alta massa molecular.

Embora não se possa concluir enfaticamente que a massa molecular é fator determinante nas variações de concentração de proteína na fase sobrenadante no equilíbrio em função da concentração inicial de proteína, este trabalho fornece mais dados de equilíbrio de fases de precipitação de proteínas com enfoque em um fenômeno relativamente pouco estudado.

6. Sugestão de trabalhos futuros

Neste trabalho, inicialmente buscou-se precipitar proteínas de diferentes massas moleculares sob condições de precipitação aproximadas, tampão Tris-HCl 0,010 mol/L pH 7,30, concentrações iniciais de proteína iguais a 5, 10 e 15 mg/mL. Porém, as proteínas não só eram diferentes quanto à massa molecular como também em propriedades físicas, por exemplo, pI e solubilidade. Por este motivo, foi necessário realizar as precipitações, sob diferentes condições de acordo com a proteína.

Para realizar as precipitações sob condições de precipitação aproximadas, sugere-se que um polímero de alta massa molecular seja clivado em 3 ou quatro fragmentos de diferentes massas moleculares os quais sejam purificados para posterior precipitação. Que os fragmentos purificados juntamente com o polímero de alta massa molecular sejam precipitados sob as condições tão próximas quanto possível para avaliar o efeito da massa molecular sobre a concentração na fase sobrenadante no equilíbrio após precipitações a diferentes concentrações iniciais de polímero.

Um outro trabalho que corroboraria seria um estudo da forma como as proteínas de diferentes massas moleculares se agregam formando precipitados. A simulação da agregação de proteínas tem sido importante para o entendimento da formação de amiloides associados a doenças neurodegenerativas como Alzheimer (WEI; MOUSSEAU; DERREUMAUX, 2007). Da mesma forma, propõe-se que seja realizado estudos de simulação computacional da agregação de proteínas de diferentes tamanhos, diferentes massas moleculares, no intuito de compreender melhor o modo como as proteínas, em processos de precipitação, formam sólidos com diferentes graus de cristalinidade. Estudos de simulação computacional são importantes devido à dificuldade de se caracterizar a associação de moléculas de proteínas por meio de métodos experimentais.

REFERÊNCIAS

- ABEYRATHNE, E. D. N. S.; LEE, H. Y.; AHN, D. U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents – a review. **Poultry Science**, v. 92, n. July, 2013.
- AFANEH, C. et al. Induction therapy in renal transplant recipients. In: KAPUR, S.; PORTELA, M. B. (Eds.). **Immunosuppression - role in health and diseases**. [s.l.] InTech, 2012.
- 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.
- ATKINS, P.; PAULA, J. DE. **Físico-química - Volume 1**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- BAESHEN, N. A. et al. Cell factories for insulin production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2014.
- BALDYGA, J. Mixing and fluid dynamics effects in particle precipitation processes. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 2016, n. 33, p. 127–149, 2016.
- BERNARDO, A.; CALMANOVICI, C. E.; MIRANDA, E. A. Observance of polymorphic behaviour during dissolution of insulin and lysozyme. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 3, p. 331–339, 2005.
- BIANCHI, A.; BOWMAN-JAMES, K.; GARCÍA-ESPAÑA, E. Aspects of anion coordination from historical perspectives. In: **Anion coordination chemistry**. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. p. 1–73.
- BOCKRIS, J. O.; EGAN, H. The salting-out effect and dielectric constant. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, n. 0, p. 151–159, 1948.
- BOISTELLE, R.; ASTIER, J. P. Crystallization mechanisms in solution. v. 90, p. 14–30, 1988.
- BUJACZ, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 10, p. 1278–1289, 2012.
- BURGESS, R. R. Chapter 20: Protein precipitation techniques. In: **Methods in Enzymology**. 1. ed. Wisconsin-USA: Elsevier Inc., 2009. v. 463p. 331–342.
- BUTLER, J. A. V. The use of solubility as a criterion of purity of proteins. **The Journal of General Physiology**, n. 8, p. 189–202, 1940.
- BUXBAUM, E. Precipitation Methods. In: **Biophysical Chemistry of Proteins: An Introduction to Laboratory Methods**. Boston, MA: Springer US, 2011. p. 143–146.

CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia de materiais - Uma introdução**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2008.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.

CHEN, R. F. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 2, p. 173–181, 1967.

CHUN, K. Y.; STROEVE, P. Protein transport in nanoporous membranes modified with self-assembled monolayers of functionalized thiols. **Langmuir**, v. 18, n. 12, p. 4653–4658, 2002.

D’ADDIO, S. M.; PRUD’HOMME, R. K. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 417–426, 2011.

DAHAL, Y.; SCHMIT, J. **Theory of salt effects on protein solubility**. APS Meeting Abstracts. **Anais...2016** Disponível em:
<<http://adsabs.harvard.edu/abs/2016APS..MARS41007D>>

DESNOYERS, J. E.; ICHHAPORIA, F. M. Salting-in and salting-out of polar nonelectrolytes. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 47, p. 4639–4643, 1969.

DESREUX, V.; HERRIOTT, R. M. Existence of several active components in crude pepsin preparations. **Nature**, v. 144, p. 287–288, 1939.

DORAN, P. M. Unit operations. In: **Bioprocess engineering principles**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2013.

EDMUNDSON, A. B.; GUDDAT, L. W.; ANDERSEN, K. N. Crystal structures of intact IgG antibodies. **Immunomethods**, v. 3, p. 197–210, 1993.

GIESE, G. et al. Purification of antibodies by precipitating impurities using polyethylene glycol to enable a two chromatography step process. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 938, p. 14–21, 2013.

GREENE, D. G. et al. Local crystalline structure in an amorphous protein dense phase. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 8, p. 1716–1723, 2015.

GRONEMEYER, P.; DITZ, R.; STRUBE, J. Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. **Bioengineering**, v. 1, n. 4, p. 188–212, 2014.

GROVER, P. K.; RYALL, R. L. Critical appraisal of salting-out and its implications for chemical and biological sciences. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 1, p. 1–10, 2005.

HALWER, M.; NUTTING, G. C.; BRICE, B. A. Molecular weight of lactoglobulin, ovalbumin, lysozyme and serum albumin by light scattering. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 6, p. 2786–2790, 1951.

HEIJNA, M. C. R.; ENCKEVORT, W. J. P. VAN; VLIEG, E. Growth inhibition of protein

crystals : A study of lysozyme polymorphs. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 094, p. 270–274, 2008.

HERMODSON, M. A. et al. Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator aalysis. **Biochemistry**, v. 12, n. 17, p. 3146–3153, 1973.

HOFMEISTER, F. Zur lehre von der wirkung der salze : zweite mittheilung. **Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin**, 2007.

HOSHINO, M. Fibril formation from the amyloid- β peptide is governed by a dynamic equilibrium involving association and dissociation of the monomer. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 1, p. 9–16, 2017.

HRIBAR, B. et al. How ions affect the structure of water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 41, p. 12302–12311, 16 out. 2002.

JANEWAY, C. A. J. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

JANEWAY, C. A. J.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. The structure of a typical antibody molecule. In: **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 5. ed. Nova York: Garland Science, 2001.

JARRETT, J. T.; LANSBURY, P. T. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? **Cell**, v. 73, n. 6, p. 1055–1058, 1993.

KEIL, B. 8 Trypsin. In: BOYER, P. D. (Ed.). **Hydrolysis: peptide bonds**. The Enzymes. [s.l.] Academic Press, 1971. v. 3p. 249–275.

KLEMENT, K. et al. Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer’s A β (1-40) amyloid fibrils. **Journal of Molecular Biology**, v. 373, n. 5, p. 1321–1333, 2007.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 171–183, 2008.

KRAUSS, I. R. et al. An overview of biological macromolecule crystallization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 11643–11691, 2013.

KREBS, M. R. H.; DEVLIN, G. L.; DONALD, A. M. Protein particulates: another generic form of protein aggregation? **Biophysical Journal**, v. 92, n. 4, p. 1336–1342, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LARA, C. et al. Self-assembly of ovalbumin into amyloid and non-amyloid fibrils. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 12, p. 4213–4221, 2012.

MAJOREK, K. A. et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and

- rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, v. 52, n. 3–4, p. 174–182, 2012.
- MCDEVIT, W. F.; LONG, F. A. The activity coefficient of benzene in aqueous salt solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 7, p. 1773–1777, 1952.
- MCPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- MCPHERSON, A. A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. **Protein Science**, v. 10, n. 2, p. 418–422, 2001.
- MELANDER, W.; HORVÁTH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 183, n. 1, p. 200–215, 1977.
- MELLANBY, J. Globulin. **The Journal of Physiology**, v. 33, n. 4–5, 1905.
- MILLER, M.; WEINSTEIN, J.; WLODAWER, A. Preliminary x-ray analysis of single crystals of ovalbumin and plakalbumin. **J. Biol. Chem.**, v. 10, n. 9, p. 5864–5866, 1983.
- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, p. 307–310, 1981.
- MULLIN, J. W. 5 – Nucleation. In: **Crystallization**. 4. ed. [s.l.] Butterworth Heinemann, 2001. p. 181–215.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NESS, H. C. VAN; ABBOTT, M. M. **Introdução à termodinâmica da engenharia química**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- NG, J. D. et al. The crystallization of biological macromolecules from precipitates: evidence for Ostwald ripening. **Journal of Crystal Growth**, v. 168, n. 1–4, p. 50–62, 1996.
- NISBET, A.; SAUNDRY, R. The complete amino acid sequence of hen ovalbumin. **European Journal of Biochemistry Banner**, v. 345, p. 335–345, 1981.
- OSWALD, R.; PIETZSCH, M.; ULRICH, J. A view inside the nature of protein crystals. **Journal of Crystal Growth**, v. 469, n. September 2016, p. 176–179, 2017.
- PEARCE, F. G.; MACKINTOSH, S. H.; GERRARD, J. A. Formation of amyloid-like fibrils by ovalbumin and related proteins under conditions relevant to food processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 318–322, 2007.
- 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, 2016.
- RABILLOUD, T. Protein solubility in two-dimensional electrophoresis. In: WALKER, J. M.

(Ed.). **The protein protocols handbook**. 2. ed. Totowa, Nova Jersey: Humana Press, 2002.
SAMBAMURPHY, K.; KAR, A. **Pharmaceutical biotechnology**. New Delhi: New Age International, 2006.

SAMOILOV, O. Y. The theory of salting out from aqueous solutions. **Zhurnal Strukturnoi Khimii**, v. 7, n. 1, p. 15–23, 1966.

SARIDAKIS, E. E. G. et al. Phase diagram and dilution experiments in the crystallization of carboxypeptidase G2. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 50, n. 3, p. 293–297, 1994.

SHIAU, K. S.; CHEN, T. L. Initial protein concentration effects on precipitation by salt. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, n. 2, p. 202–206, 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, 1992.

SHUKLA, A. N. **Elements of Enzymology**. [s.l.] Discovery Publishing House, 2009.

SMATANOVÁ, I. K. Crystallization of biological macromolecules. **Materials Structure**, v. 9, n. 1, p. 14–15, 2002.

SØRENSEN, V. S. P. L. Die konstitution der löslichen proteinstoffe als reversibel dissoziabile komponentensysteme. **Kolloid-Zeitschrift**, p. 170–199, 1930.

STEINHARDT, J. The solubility of crystalline pepsin. **J. Biol. Chem.**, 1939.

STRYER, L. Estratégias de catálise. In: **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996. p. 196–197.

TAVARES, F. W.; BRATKO, D.; PRAUSNITZ, J. M. The role of salt-macroion van der Waals interactions in the colloid-colloid potential of mean force. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1–2, p. 9228–9235, 2004.

TRAVIS, J.; LIENER, I. The crystallization and partial characterization porcine trypsin. v. 240, n. 5, p. 1962–1966, 1965.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–17, 2014.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Catálise enzimática. In: **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p. 340.

WALSH, G. Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 2, p. 151–159, 2005.

WEI, G.; MOUSSEAU, N.; DERREUMAUX, P. Computational simulations of the early steps of protein aggregation. **Prion**, v. 1, n. 1, p. 3–8, 2007.

WEISS, M.; STEINER, D. F.; PHILIPSON, L. H. **Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships**. South Dartmouth: MDText.com, Inc.,

2000.

YANG, Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 12–22, 2009.

YU, L.; REUTZEL-EDENS, S. M. CRYSTALLIZATION | Basic Principles. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. [s.l.] Elsevier, 2003. p. 1697–1702.

ZAUNER, R. **Scale-up of precipitation processes**. [s.l.] Universidade de Londres, 1999.

ZHOU, H. X. Interactions of macromolecules with salt ions: an electrostatic theory for the Hofmeister effect. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 61, n. 1, p. 69–78, 2005.

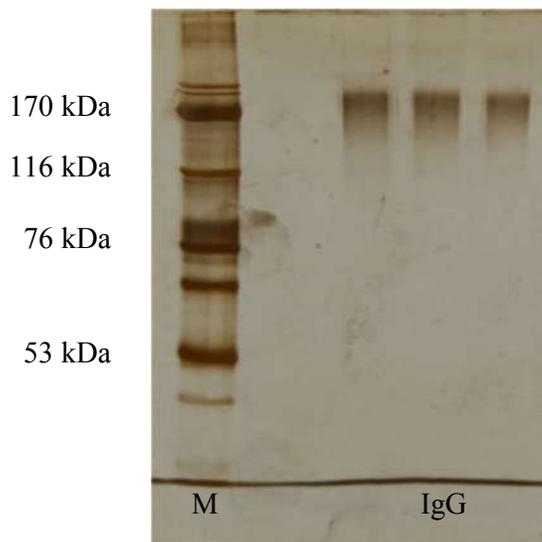
APÊNDICE A: Eletroforese SDS-PAGE das soluções de proteína

Foram realizadas eletroforeses SDS-PAGE das soluções de proteína para verificar de forma qualitativa a presença de impurezas nas mesmas. A Figura A1 apresenta a imagem do gel contendo amostras de todas as soluções de proteína, exceto a IgG que é apresentada na Figura A2.

Figura A1. Gel submetido à eletroforese das proteínas: insulina (I), lisozima (L), tripsina (T), Ovalbumina (O) e BSA (B).



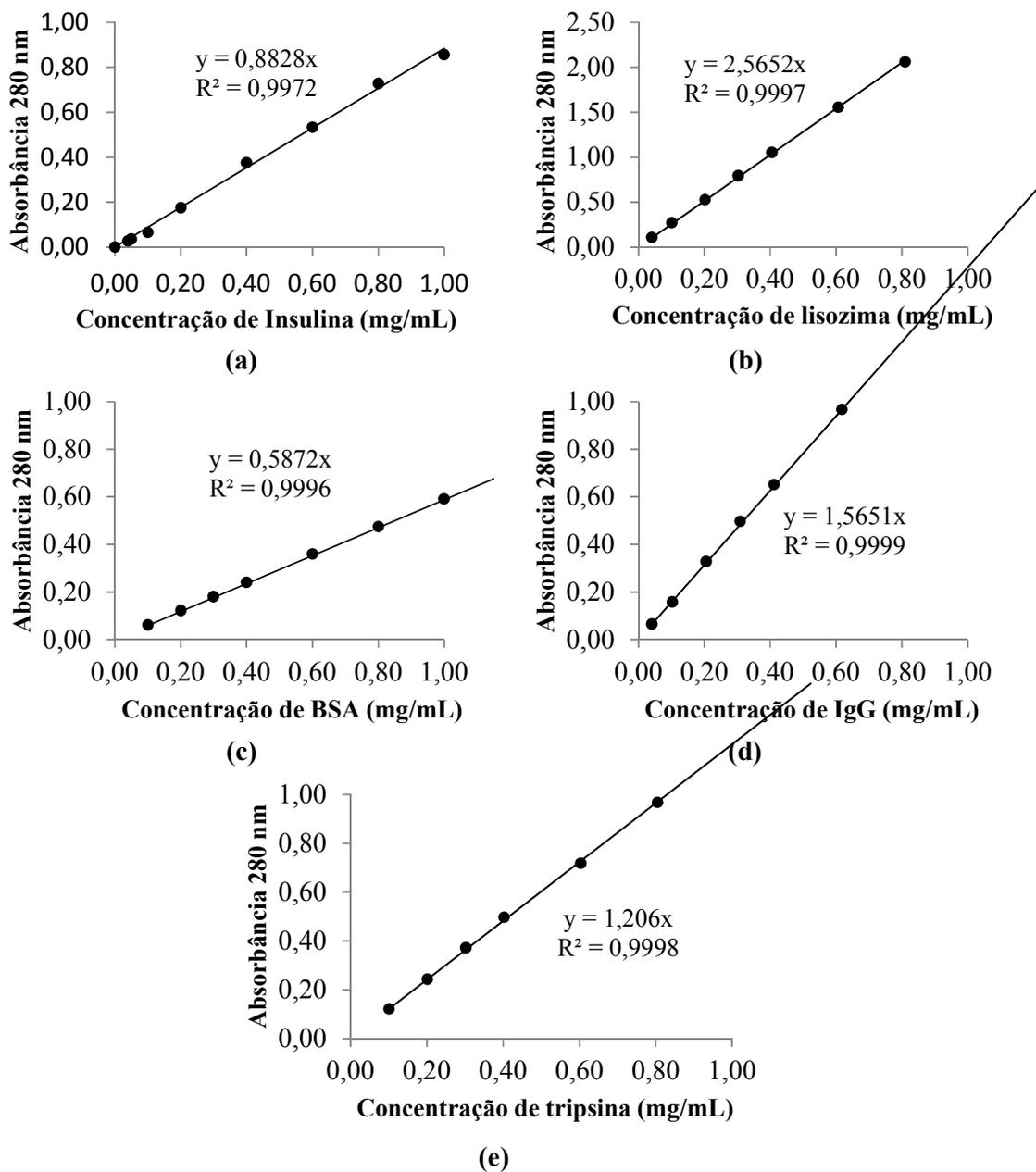
Figura A2. Gel submetido à eletroforese de IgG. A coluna M corresponde aos marcadores de massa molecular.



APÊNDICE B: Curvas padrão para dosagem de proteínas

Curvas padrão para dosagem de proteínas foram determinadas e coeficientes de correlação próximos a um foram obtidos em todas as curvas (Figura 7). Os coeficientes angulares das curvas padrão de insulina bovina, lisozima, BSA, IgG e tripsina foram 0,8828, 2,5652, 0,5872, 1,5651 e 1,206 mL/(mg.cm), respectivamente.

Figura B1. Curvas padrão de (a) insulina, (b) lisozima, (c) BSA, (d) IgG e (e) tripsina.



APÊNDICE C: Concentrações de insulina do estudo cinético de precipitação de insulina

Tabela C1. Concentração de insulina (C_{insulina}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases.

Concentração de NaCl 3,00 mol/Kg de solvente.

C_{insulina} inicial	C_{insulina} (6 dias)	C_{insulina} (7 dias)	C_{insulina} (8 dias)	C_{insulina} média	D.P*
8,0	0,579	0,690	0,461	0,577	0,010
9,9	0,518	0,602	0,461	0,527	0,032
11,8	0,703	0,581	0,523	0,602	0,017
14,1	0,663	0,541	0,507	0,570	0,027

* Desvio padrão feito com base nas triplicatas em tempos de 6 e 7 e 8 dias.

Tabela C2. Concentração de insulina (C_{insulina}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases.

Concentração de NaCl 4,00 mol/Kg de solvente.

C_{insulina} inicial	C_{insulina} (6 dias)	C_{insulina} (7 dias)	C_{insulina} média	D.P*
7,87	0,264	0,265	0,264	0,010
9,94	0,286	0,243	0,265	0,032
12,0	0,259	0,275	0,267	0,017
14,1	0,284	0,240	0,262	0,027

* Desvio padrão feito com base nas triplicatas em tempos de 6 e 7 dias.

Tabela C3. Concentração de insulina (C_{insulina}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases.

Concentração de NaCl 1,10 mol/Kg de solvente.

C_{insulina} inicial	C_{insulina} (10 dias)	C_{insulina} (13 dias)	C_{insulina} (17 dias)	C_{insulina} média	D.P*
5,0	3,65	3,04	3,09	3,26	0,36
8,0	5,03	4,58	4,68	4,76	0,24
11,5	6,10	5,84	5,93	5,96	0,27
15,0	6,85	6,56	6,44	6,62	0,35

* Desvio padrão feito com base nas triplicatas em tempos de 10, 13 e 17 dias.

APÊNDICE D: Concentrações de BSA do estudo cinético de precipitação de BSA

Tabela D1. Concentração de BSA (C_{BSA}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases.

Concentração de NaCl 0,65 mol/L.

C_{BSA} inicial	C_{BSA} (5 dias)	C_{BSA} (7 dias)	C_{BSA} (10 dias)	C_{BSA} média	D.P*
20,1	10,9	10,7	11,0	10,9	0,31
15,7	8,14	8,09	7,85	8,02	0,43
9,89	5,18	4,66	5,10	4,98	0,34
4,94	2,10	1,97	2,07	2,05	0,15

* Desvio padrão feito com base nas triplicatas em tempos de 5, 7 e 10 dias.

APÊNDICE E: Concentrações de lisozima do estudo cinético de precipitação de lisozima

Tabela E1. Concentração de lisozima (C_{lisozima}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases.

Concentração de NaCl 3,50 mol/L.

C_{lisozima} inicial	C_{lisozima} (8 dias)	C_{lisozima} (11 dias)	C_{lisozima} média	D.P*
20,0	0,240	0,222	0,231	0,022
15,0	0,223	0,344	0,284	0,12
10,0	0,185	0,239	0,212	0,095
5,0	0,228	0,297	0,262	0,052

* Desvio padrão feito com base nas triplicatas em tempos de 8 e 11 dias.

Tabela E2. Concentração de lisozima (C_{lisozima}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases.

Concentração de NaCl 1,05 mol/L.

C_{lisozima} inicial	C_{lisozima} (10 dias)	C_{lisozima} (17 dias)	C_{lisozima} média	D.P*
75,0	3,02	3,87	3,45	1,7
45,0	3,02	2,78	2,90	1,5
30,0	2,93	3,72	3,33	1,6
20,0	2,83	2,77	2,80	1,3

* Desvio padrão feito com base nas triplicatas em tempos de 10 e 17 dias.

APÊNDICE F: Concentrações de tripsina do estudo cinético de precipitação de tripsina

Tabela F1. Concentração de tripsina (C_{tripsina}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases. Concentração de NaCl 2,50 mol/L.

C_{tripsina} inicial	C_{tripsina} (10 dias)	C_{tripsina} (14 dias)	C_{tripsina} média	D.P*
20,0	10,9	10,5	10,7	0,25
15,0	8,01	7,97	7,64	0,50
10,0	4,36	4,34	4,04	0,51
5,0	0,91	0,85	0,80	0,14

* Desvio padrão feito com base nas triplicatas em tempos de 10 e 14 dias.

APÊNDICE G: Concentrações de IgG do estudo cinético de precipitação de IgG

Tabela G1. Concentração de IgG (C_{IgG}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases.
Concentração de NaCl 1,00 mol/L.

C_{IgG} inicial	C_{IgG} (5 dias)	C_{IgG} (10 dias)	C_{IgG} (15 dias)	C_{IgG} (20 dias)	C_{IgG} média	D.P*
12,8	12,4	12,2	11,6	12,4	12,2	0,36
10,0	9,57	9,43	9,02	9,60	9,41	0,27
7,50	6,94	7,01	6,73	7,16	6,69	0,18
5,00	4,48	4,52	4,42	4,59	4,50	0,07

* Desvio padrão.

Tabela G2. Concentração de IgG (C_{IgG}) na fase sobrenadante no equilíbrio de fases.
Concentração de NaCl 2,50 mol/L.

C_{IgG} inicial	C_{IgG} (9 dias)	C_{IgG} (12 dias)	C_{IgG} (18 dias)	C_{IgG} média	D.P*
18,0	1,88	0,87	1,53	1,43	0,60
13,5	0,47	0,16	0,63	0,42	0,29
9,00	0,08	0,03	0,11	0,07	0,04
4,50	0,03	0,03	0,04	0,03	0,02

* Desvio padrão.