



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação e caracterização de sistemas
baseados em ponto nuvem visando à
remoção de albumina do plasma sanguíneo**

Marcelo Anselmo Oseas da Silva

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Campinas – SP

Fevereiro de 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Si38a	<p>Silva, Marcelo Anselmo Oseas da Avaliação e caracterização de sistemas baseados em ponto nuvem visando à remoção de albumina do plasma sangüíneo / Marcelo Anselmo Oseas da Silva. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.</p> <p style="text-align: center;">Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. Albumina. 2. Ponto nuvem. 3. Eletroforese em gel. 4. Dicroísmo circular. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Evaluation and characterization of cloud point based systems for albumin removal from blood plasma

Palavras-chaves em inglês: Albumin, Cloud point, Gel electrophoresis, Circular dichroism

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Marco Aurélio Zezzi Arruda (orientador), Lauro Tatsuo Kubota (IQ-UNICAMP), Maria Fernanda Georgina Giné Rosias (CENA-USP)

Data de defesa: 25/02/2008

Dedico esta dissertação a meus pais José Roberto e Miriam e minha irmã Renata pelo apoio e incentivo durante esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP em especial ao Instituto de Química pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de Estudos.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda pela orientação e amizade durante o mestrado e iniciação científica.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica, desde o ensino técnico até a pós-graduação.

Aos funcionários do Instituto de Química que colaboraram de alguma forma para realização deste trabalho.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do Grupo de Espectrometria Preparo de Amostras e Mecanização – GEPAM: Adilson, Alessandra, Aline Lopes, Aline Klassen, Ana Cristi, Araceli, César, Cristiana, Eduardo, Eraldo, Geraldo, Jerusa, Fabiana, Herbert, Gilmare, Luciana, Marcel, Márcia, Nathália, Pedro e Renata.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório: André, Profa. Dra. Anne Hélène Fostier, Danilo, Fabiane, Hugo, Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva, Joselito, Paula e Socorro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para que este trabalho se concretizasse.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Marcelo Anselmo Oseas da Silva
Brasileiro, natural de São Paulo, SP – 28/06/1982.
Endereço eletrônico: oseasmar@gmail.com

Formação Acadêmica

- 02/2006 – 02/2008 **Mestrado em Química – Química Analítica**
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- 03/2006 – 12/2007 **Licenciatura em Química**
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- 03/2002 – 12/2005 **Bacharelado em Química**
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- 07/1999 – 12/2000 **Curso Técnico em Química**
Escola Técnica Estadual “Trajano Camargo”, Limeira, SP, Brasil.

Produção Científica

Artigo Publicado

- Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z.; *Bradford reaction mechanization for the spectrophotometric determination of total protein*, **Anal. Biochem.**, **2006**, 351, 155-157.

Trabalhos apresentados em eventos

- Barbosa, H. S.; **Silva, M. A. O.**; Brandão, A. R.; Sussulini, A.; Gozzo, F. A.; Arruda, M. A. Z.; *Comparative proteome analysis in transgenic and non-transgenic soybeans*. Painel. Evento: 2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, Campinas, SP, 09/11/2007 – 11/11/2007.
- **Silva, M. A. O.**; Arruda, M. A. Z.; *Aplicação da extração em ponto nuvem para remoção de albumina em plasma sanguíneo*. Painel. Evento: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, PB, 07/11/2007 – 11/11/2007.

- Sussulini, A.; Souza, G. H. M. F.; Eberlin, M. N.; Gozzo, F. C.; **Silva, M. A. O.**; Barbosa, H. S. Arruda, M.A.Z.; *Comparative metallomics: a study involving natural and transgenic soybeans*. Painel. Evento: Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV, 2007, Xiamen. Abstract Book of Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV. Xiamen : Xiamen University Press, 2007. p. 79-79.
- **Silva, M. A. O.**; Arruda, M. A. Z.; *Avaliação do comportamento da albumina em sistemas de extração mediados por surfactantes, aplicando a técnica de ponto nuvem*. Painel. Evento: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 31/05/2007 – 03/06/2007, Águas de Lindóia, SP. Livro de resumos, 2007, p. QA 186.
- **Silva, M. A. O.**; Arruda, M. A. Z.; *Mecanização da reação de Bradford para determinação espectrofotométrica de proteínas totais*. Painel. Evento: XIII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 2005, Campinas. Editora da Unicamp, 28/09/2005 – 29/09/2005, v. 13, p. 145-145.
- **Silva, M. A. O.**; Arruda, M. A. Z.; *Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de proteínas totais*. Painel. Evento: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30/05/2005 – 02/06/2005, Poços de Caldas - MG. Livro de Resumos, 2005. p. QA207.
- **Silva, M. A. O.**; Arruda, M. A. Z.; *Desenvolvimento de um sistema de análise em fluxo para determinação de proteínas totais*. Painel. Evento: XII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, 22/09/2004 – 23/09/2004, Campinas. Editora da UNICAMP, 2004. v. 12. p. 127-127.

Prêmio

2007 CSI Excellent Poster Award, Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV. Xiamen, China, Vol. 1, p. 79-79. Melhor painel da área de espectrometria atômica.

Outras produções

07/2003 – 07/2005

Iniciação Científica

Título: Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de proteínas totais. Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Agência financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

RESUMO

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS BASEADOS EM PONTO NUVEM VISANDO À REMOÇÃO DE ALBUMINA EM PLASMA SANGÜÍNEO

Autor: Marcelo Anselmo Oseas da Silva

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda

Nesta dissertação foi estudado o comportamento de partição da albumina, proteína presente em elevada concentração no plasma sangüíneo e que interfere na determinação em diversas técnicas analíticas. No estudo efetuado foram avaliados diferentes sistemas aquosos de duas fases, explorando um fenômeno denominado ponto nuvem. Tais sistemas empregam surfactantes, sob condições experimentais específicas, obtendo-se a formação de duas fases imiscíveis: uma rica e outra pobre em tensoativo. Observou-se que devido às características hidrofílicas da albumina, bem como à dimensão dos agregados formados, sua extração para fase rica em tensoativo apresenta valores de coeficiente de partição que não ultrapassam 0,66, o que representa uma eficiência de extração de *ca.* 40%. A extração da proteína apresentou-se viável mediante a utilização de uma mistura composta por um tensoativo não-iônico (Triton[®] X-114), que possibilita a separação de fases em temperatura biocompatível, na presença de outro tensoativo iônico (dodecil sulfato de sódio – SDS), que atua favorecendo as interações eletrostáticas entre os agregados e as moléculas protéicas, desde que se trabalhe em meio com pH abaixo de 5,0. Análises de dicroísmo circular complementaram o estudo e forneceram evidências de que a aplicação do sistema baseado na mistura composta por Triton[®] X-114 e SDS causava desnaturação parcial da proteína, o que não inviabilizou sua aplicação para extração da mesma em uma amostra real.

A eficiência deste sistema foi, então, avaliada para a remoção de albumina em plasma sangüíneo. Um coeficiente de partição de 1,1 foi obtido, indicando que *ca.* 51% das proteínas encontravam-se na fase rica em tensoativo. As amostras

submetidas ao procedimento de extração também foram avaliadas frente à técnica de eletroforese em gel, sendo que a fase pobre em surfactante apresentou um perfil eletroforético mais detalhado quando comparada a uma amostra que não foi submetida ao procedimento proposto. Já na fase rica em surfactante, foi observada a presença majoritária de albumina e, em menor concentração, outras proteínas de grande abundância no plasma tais como imunoglobulina G e transferrina. Por fim, o método apresentou desempenho semelhante ao de sistemas disponíveis comercialmente para remoção de albumina, tal como o sistema da Millipore[®], apresentado neste trabalho.

ABSTRACT**EVALUATION AND CHARACTERIZATION OF CLOUD POINT BASED SYSTEMS
FOR ALBUMIN REMOVAL FROM BLOOD PLASMA**

Author: Marcelo Anselmo Oseas da Silva

Adviser: Marco Aurélio Zezzi Arruda

In this work the partition behavior of albumin was studied, which is found at high concentrations in blood plasma, which interferes in many analytical techniques determinations. The present study evaluated different aqueous two-phase systems, exploiting a phenomenon called of cloud point. These systems employ surfactants under specific experimental conditions, enabling formation of two immiscible phases: one rich and another poor in surfactant. Due to the hydrophilic characteristics of albumin, as well as its aggregate dimensions, its extraction to the surfactant rich phase presented partition coefficients lower than 0.66, representing an extraction efficiency of *ca.* 40%. Protein extraction was feasible by applying a mixture comprised of a nonionic surfactant (Triton[®] X-114), which allowed the phase separation at biocompatible temperatures, and an ionic one (sodium dodecylsulfate – SDS), which promotes electrostatic interactions between aggregates and protein molecules, since the extraction procedure is carried out at pH 5.0. Circular dichroism analysis complemented the study and it showed that a system based on a Triton[®] X-114 and SDS mixture causes partial protein denaturation, but its application for a real sample is feasible.

The efficiency of this system was evaluated for albumin removal from blood plasma. A partition coefficient of 1.1 was obtained, indicating that *ca.* 51% of proteins were contained in the surfactant rich phase. Albumin depleted samples were submitted to gel electrophoresis and the surfactant poor phase presented a more detailed gel electrophoresis profile, when compared with a crude sample. The surfactant rich phase revealed that albumin is the predominant protein present, but it is possible to find other highly concentrated plasmatic proteins including

immunoglobulin G and transferrin. Finally, the method presented similar performance when compared with commercially available systems for albumin removal, such as the Millipore[®] system, which was also evaluated in this work.

SUMÁRIO

LISTA DE ACRÔNIMOS A ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxvii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. HIPÓTESE E OBJETIVOS	02
2. ASPECTOS TEÓRICOS	03
2.1. Surfactantes	03
2.1.1. Definição	03
2.1.2. Agregação de monômeros - formação de micelas	04
2.1.3. Ponto nuvem – separação de fases	08
2.1.4. Aplicações analíticas de sistemas baseados em ponto nuvem	10
2.1.5. Coeficiente de partição e sua correlação com as dimensões dos agregados micelares e proteínas	13
2.1.6. Características de alguns surfactantes utilizados neste trabalho	14
2.2 Proteínas	16
2.2.1. Albumina	17
2.2.2. Métodos para determinação da concentração de proteínas totais ...	19
2.2.2.1. Reação de Bradford	19
2.2.3. Análises de estruturas secundárias de proteínas via dicroísmo circular	21
2.2.4. Separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida – algumas considerações	25
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1. Preparo de soluções e limpeza dos materiais	26
3.2. Método	27

3.2.1. Avaliação da formação do ponto nuvem para os sistemas estudados	27
3.2.2. Procedimentos de separação de fases	28
3.2.3. Quantificação do teor de proteínas totais	29
3.3. Avaliação do teor protéico presente nas fases	30
3.4. Análises de dicroísmo circular	30
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
3.5.1. Extração de albumina em plasma sanguíneo	32
3.5.2. Preparo dos géis de poliacrilamida	33
3.5.3. Sistema de revelação	33
3.5.4. Tratamento das imagens	34
3.6. Avaliação estatística dos dados	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Sistemas avaliados	35
4.1.1. Sistemas aplicando Triton [®] X-114 e Triton [®] X-100	35
4.1.1.1. Otimização da metodologia para quantificação dos teores protéicos	35
4.1.1.2. Avaliação do sistema utilizando Triton [®] X-114	41
4.1.1.3. Avaliação do sistema utilizando Triton [®] X-100	46
4.1.1.4. Estimativa dos raios das micelas para os sistemas Triton [®] X-114 e Triton [®] X-100, empregando valores de K	53
4.1.2. Avaliação do sistema utilizando Brij [®] 35 e Triton [®] X-114	54
4.1.3. Avaliação do sistema utilizando Tween [®] 80 e Triton [®] X-114	58
4.1.4. Avaliação do sistema produzindo micelas mistas de SDS e Triton [®] X-114	65
4.1.4.1. Influência da temperatura na eficiência de extração do sistema SDS / Triton [®] X-114	73
4.1.5. Avaliação do sistema utilizando CTAB / Triton [®] X-114	75

4.2. Avaliação conformacional da albumina, via dicroísmo circular, após procedimentos de extração	80
4.2.1. Avaliação dos sistemas empregando surfactantes não-iônicos	83
4.2.2. Avaliação dos sistemas empregando surfactantes iônicos	87
4.3. Aplicação do sistema SDS / Triton® X-114 para remoção de albumina em plasma sanguíneo	92
4.3.1. Avaliação das amostras de plasma, após remoção da albumina, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida	94
5. CONCLUSÕES	101
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , do inglês: Análise de variância.
ATPS	<i>Aqueous two phase system</i> , do inglês: Sistema aquoso de duas fases.
<i>b</i>	Variância.
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , do inglês: Albumina do Soro Bovino.
<i>c</i>	Concentração em mol L ⁻¹ .
C ₁₀ E ₄	<i>n</i> -deciltetraoxietileno
C _n TAB	<i>cetyltrimethylammonium bromide</i> , do inglês: Brometo de cetiltrimetilamônio.
<i>ca.</i>	Cerca de.
CBBG	<i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> , do inglês: Azul de Coomassie.
CMC	Concentração Micelar Crítica.
CP	<i>Cloud Point</i> , do inglês: ponto nuvem.
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> , do inglês: brometo de cetiltrimetilamônio.
Da	Dalton (1 Da = 1,661.10 ⁻²⁴ g).
DDTP	<i>O,O – Diethyldithiophosphate</i> , do inglês: O,O – dietilditiofosfato.
ETAAS	<i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i> , do inglês: Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica.
<i>f</i>	Porcentagem de estruturas α -hélice.
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> , do inglês: Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização em Chama
<i>g</i>	Força da gravidade.
<i>h</i>	Número de amostras.
HSA	<i>Human Serum Albumin</i> , do inglês: Albumina do Soro Humano.
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> , do inglês: Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado.
ICP OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> , do inglês: Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente.

K	Coeficiente de Partição.
l	Caminho óptico.
LD	Limite de Detecção.
LQ	Limite de Quantificação.
n	Número de resíduos.
N	Número de réplicas.
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol.
PPII	<i>poly (L-proline)-type conformation</i> , do inglês: Conformação poli (L-prolina).
R	Constante Universal dos Gases
R_0	Raio da micela.
R_p	Raio hidrodinâmico da proteína.
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> , do inglês: dodecil sulfato de sódio.
SELCON	<i>Self Consistent Method</i>
T	Temperatura absoluta, K.
t	Parâmetro estatístico t de Student
\bar{x}	Valor médio.
ΔG	Variação da Energia Livre de Gibbs.
ΔH	Variação de Entalpia.
ΔS	Variação de Entropia.
ϵ	Elipticidade.
ϕ	Volume da fase.
λ	Comprimento de onda
θ	Elipticidade molar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Surfactantes que compunham cada um dos seis sistemas avaliados para extração de proteínas por meio da técnica de ponto nuvem. As concentrações otimizadas dos surfactantes, para cada sistema, serão discutidas posteriormente, ao longo do trabalho	28
Tabela 2.	Concentração protéica obtida na fase pobre, após quantificação da mesma, razão entre as porcentagens relativas aos volumes das fases pobre e rica (ϕ_{FP}/ϕ_{FR}), e massa de albumina obtida após a quantificação, para concentrações de surfactante situadas entre 0,20 e 0,75% (v/v) na presença de 1,250 mg de albumina. N = 6	36
Tabela 3.	Concentração protéica obtida na fase pobre, após quantificação da mesma, razão entre as porcentagens dos volumes das fases pobre e rica (ϕ_{FP}/ϕ_{FR}) e massa de albumina obtida após a quantificação, para concentrações de surfactante situadas entre 0,20 e 0,75% (v/v) na presença de 0,2% (m/v) de NaCl e 1,250 mg de albumina. N = 6	37
Tabela 4.	Branco analítico obtido, após quantificação das fases pobres, por meio do método de Bradford, para soluções de Triton [®] X-114 com concentrações variando entre 0,5 e 6,0% (v/v) em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2, após precipitação utilizando acetona na proporção 3:1 (v/v) ou acetato de amônio em metanol na proporção 5:1 (v/v). N = 10	38
Tabela 5.	Concentrações protéicas resultantes (conc. total = conc. fase pobre + conc. fase rica), obtidas após a quantificação das fases pobre e rica, submetidas ao procedimento de precipitação com acetona (3:1 v/v) ou acetato de amônio 0,1 mol L ⁻¹ em metanol (5:1 v/v), para tubos contendo concentrações de Triton X [®] -114 de 0,5 e 1,0% (v/v) e 125 µg mL ⁻¹ de albumina. N = 6	39
Tabela 6.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação da mesma pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de 125 µg mL ⁻¹ e de surfactante situadas no intervalo entre 0,3 e 1,3% (v/v), todos em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2. N = 6	41
Tabela 7.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação da mesma, e coeficiente de partição para soluções com concentrações de 125 µg mL ⁻¹ e de surfactante situadas no intervalo entre 0,5 e 6,0% (v/v), todos em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2. N = 6	42

Tabela 8.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação da mesma e coeficiente de partição para soluções com concentrações de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Triton [®] X-100 situadas no intervalo entre 3,0 e 7,0% (v/v) e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todas em tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,2. N = 6	50
Tabela 9.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina, 3,0% (v/v) de Triton [®] X-100 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ com pH variando na faixa entre 5,0 e 7,6. N = 6.	51
Tabela 10.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina; 1,0% (v/v) de Triton [®] X-114; 0,5% (v/v) de Brij [®] 35 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ com pH compreendido entre 5,0 e 7,6. N = 6	57
Tabela 11.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido no estudo de tempo de contato para soluções com concentrações de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e 1,0% (v/v) de Triton [®] X-114, 0,5% (m/v) de Brij [®] 35 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todos em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,4. N = 6	57
Tabela 12.	Ponto nuvem para soluções contendo Triton [®] X-114 e Tween [®] 80 em diferentes proporções, mantendo-se fixa a proporção entre os mesmos	60
Tabela 13.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação da mesma pelo método de Bradford, e seus respectivos coeficientes de partição, para soluções com concentrações de 3,0% (v/v) de Triton [®] X-114, 1,5% (v/v) de Tween [®] 80, 10,0% (m/v) de NaCl e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ com pH variando entre 5,0 e 7,6. N = 6	63
Tabela 14.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição, obtidos no estudo de tempo de contato para soluções com concentrações de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de 3,0% (v/v) de Triton [®] X-114, 1,5% (v/v) de Tween [®] 80 e 10,0% (m/v) de NaCl, todos em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2 foram avaliados. N = 6	64
Tabela 15.	Proporções avaliadas para misturas contendo Triton [®] X-114 e SDS na presença de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2	66

Tabela 16.	Concentração protéica média obtida na fase rica em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido no estudo de tempo de contato para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e 4,0% (v/v) de Triton [®] X-114, 0,8% (m/v) de SDS e 1,0% (m/v) de NaCl, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. N = 3	70
Tabela 17.	Concentração protéica média obtida na fase rica em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido em estudo de tempo de contato para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e 1,0% (v/v) de Triton [®] X-114, 0,2% (m/v) de SDS e 1,0% (m/v) de NaCl, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. N = 6	71
Tabela 18.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e 4,0% (v/v) de Triton [®] X-114 e 0,8% (m/v) de SDS, em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, sem adição de NaCl. N = 6	72
Tabela 19.	Concentração protéica média obtida nas fases pobres em surfactante, após quantificação das mesmas pelo método de Bradford, e seus respectivos coeficientes de partição, obtidos para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina, 4,0% (v/v) de Triton [®] X-114, 0,8% (m/v) de SDS em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 a procedimentos de separação de fases conduzidos a 6,0; 25,0 e 30,0 °C. N = 6.	74
Tabela 20.	Composição das misturas de Triton [®] X-114 e CTAB, utilizadas no estudo para avaliação da formação do ponto nuvem em função da concentração da mistura entre estes dois surfactantes. Todos os tubos possuíam em sua composição 8,0% (m/v) de sulfato de amônio e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2	77
Tabela 21.	Valores médios de ponto nuvem para as soluções contendo a mistura Triton [®] X-114 e CTAB com as concentrações apresentadas na Tabela 20, todos na presença de 8,0% (m/v) de sulfato de amônio e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. N = 6	78
Tabela 22.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de 4,0% (v/v) de Triton [®] X-114, 0,8% (m/v) de CTAB e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH variando na faixa entre 5,0 e 7,6. N = 6	79

Tabela 23.	Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição, obtido no estudo de tempo de contato, para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de 4,0% (v/v) de Triton [®] X-114, 0,8% (m/v) de CTAB e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todos em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. N = 6	80
Tabela 24.	Estimativa da porcentagem de cada uma das estruturas secundárias, para a albumina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, após cálculos utilizando 4 diferentes algoritmos	82
Tabela 25.	Estimativa da porcentagem de estruturas α -hélices, para soluções de albumina $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ contida nas fases pobres em surfactante para os sistemas identificados como A, B e C. Quatro diferentes algoritmos foram aplicados para os cálculos	84
Tabela 26.	Estimativa da porcentagem de estruturas α -hélices, para solução de albumina bovina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 na presença de 8,0% (m/v) de sulfato de amônio. Quatro diferentes algoritmos foram aplicados para os cálculos	85
Tabela 27.	Estimativa da porcentagem de α -hélices, para solução contendo $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina contida na fase pobre em surfactante, submetida ao processo de extração utilizando 3,0% (v/v) Tween [®] 80, 1,5% (v/v) Triton [®] X-114, 10,0% (m/v) cloreto de sódio em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. Os cálculos aplicaram 2 diferentes algoritmos	87
Tabela 28.	Estimativa da porcentagem de estruturas α -hélice, para soluções contendo $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina utilizando 4 diferentes algoritmos e seus respectivos valores médios	88
Tabela 29.	Estimativa da porcentagem de cada uma das estruturas secundárias, para solução de albumina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ contida na fase pobre em surfactante, submetida ao processo de extração utilizando 4,0% (v/v) Triton [®] X-114, 0,8% (m/v) CTAB, 8,0% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, após etapa de precipitação com sulfato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol. Quatro diferentes algoritmos foram aplicados para os cálculos	91
Tabela 30.	Quantificação de proteínas totais nas fases rica e pobre, para amostras de plasma sanguíneo, obtidas após precipitação com sulfato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol na proporção 1:5 v/v (amostra:agente precipitante). Concentração total de proteína adicionada = $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. N = 4	92

Tabela 31.	Quantificação de proteínas totais nas fases rica e pobre, para amostras de plasma sangüíneo, obtidas após precipitação com acetona na proporção 1:4 (v/v) ou acetonitrila 1:5 (v/v) (proporção amostra:agente precipitante). Concentração total de proteína adicionada = 150 µg mL ⁻¹ . N = 4	93
Tabela 32.	Massa protéica estimada para cada banda identificada, baseada nos dados de densidade óptica calculados	98
Tabela 33.	Parâmetros otimizados para o sistema composto pela mistura Triton [®] X-114 / SDS	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática de três processos de equilíbrio que ocorrem com moléculas anfifílicas em solução aquosa: (A) disposição dos monômeros em uma interface; (B) adsorção dos monômeros em uma superfície, (C) agregação dos monômeros para formação das estruturas denominadas micelas. O processo (C) ocorre apenas acima da CMC. As esferas laranja representam a porção polar dos monômeros, enquanto a cauda é representada pelos traços em preto	05
Figura 2.	Representação de dois agregados micelares: (A) micela normal, formada em solventes polares; (B) micela reversa, formada em solventes orgânicos. A parte polar é representada pelas esferas laranja e as caudas pelos traços em preto	06
Figura 3.	Representação esquemática da estrutura de uma dupla camada elétrica, baseando-se na teoria de Stern. Esferas pretas representam as cabeças polares dos surfactantes, esferas laranja representam íons com cargas positivas e esferas azuis representam íons com cargas negativas	07
Figura 4.	Representação esquemática para diversas estruturas de agregados micelares: (A) micela esférica; (B) micela cilíndrica; (C) micela hexagonal; (D) bicamada	08
Figura 5.	Estrutura genérica dos surfactantes pertencentes à classe dos Triton [®] . O número de grupo oxietileno é dado pela letra y	15
Figura 6.	Fórmula genérica dos surfactantes da família Brij [®] , onde N representa o número de grupos oxietileno presentes	15
Figura 7.	Fórmula estrutural para o surfactante não-iônico Tween [®] 80, onde a soma de w, x, y e z é igual a 20	16
Figura 8.	Estrutura da albumina do soro humano: o domínio 1 é apresentado em vermelho (resíduos de 1 a 181); o domínio 2 é exibido em azul (resíduos de 188 a 373); o domínio 3 aparece na cor verde (resíduos de 380 a 571). Em amarelo, são destacados os resíduos responsáveis por fixar Zn ²⁺ em sua estrutura	18
Figura 9.	Estrutura do corante Azul de Coomassie, composto que compõe o reagente de Bradford	20
Figura 10.	Principais transições eletrônicas envolvidas na incidência da luz circularmente polarizada em uma proteína. π_b representam orbitais ligantes; π_{nb} orbitais não ligantes; π^* orbitais antiligantes. Os dois pares de elétrons livres do oxigênio são indicados por n e n'	22

- Figura 11.** Gráfico representando o coeficiente de partição em função do pH do meio, variando de 5,0 a 8,0, para soluções contendo $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de Triton[®] X-114 6,0% (v/v). Todas as soluções eram tamponadas com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ 43
- Figura 12.** Gráfico representando a razão de distribuição em função do tempo de contato para soluções contendo $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de Triton[®] X-114 6,0% (v/v), utilizando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. A linha apresentada na figura serve apenas como guia 45
- Figura 13.** Gráfico apresentando o ponto nuvem em função da concentração de diferentes aditivos: $\text{---}\blacksquare\text{---}$ NaCl; $\text{---}\bullet\text{---}$ $\text{CH}_2\text{CO}_2(\text{NH}_4)$; $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $\text{---}\nabla\text{---}$ KCl; $\text{---}\bullet\text{---}$ NaNO_3 ; $\text{---}\blacktriangleleft\text{---}$ sacarose, para soluções contendo $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina, 1,0% (v/v) de Triton[®] X-100, todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 47
- Figura 14.** Gráfico representando o coeficiente de partição em função do tempo de contato para soluções contendo $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de 3,0% (v/v) Triton[®] X-100 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, utilizando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,4. A linha apresentada na figura serve apenas como guia 52
- Figura 15.** Gráfico apresentado o ponto nuvem para a mistura Triton[®] X-114 e Brij[®] 35 em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, na presença de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em função da concentração de Brij[®] 35, mantendo-se fixa em 1,0% (v/v) a concentração de Triton[®] X-114 55
- Figura 16.** Gráfico de ocorrência do ponto nuvem em função da concentração de sulfato de amônio exibindo a redução na temperatura de separação de fases à medida que se eleva a concentração do eletrólito, para o sistema contendo a mistura de 1,0% (v/v) Triton[®] X-114 e 0,5% (m/v) Brij[®] 35 na presença de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 56
- Figura 17.** Gráfico apresentando o ponto nuvem em função da concentração de Tween[®] 80, mantendo fixa para todos os tubos a concentração de Triton[®] X-114 em 1,0% (v/v) na presença de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina, todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 59
- Figura 18.** Gráfico apresentando o ponto nuvem em função da concentração de cloreto de sódio, para soluções contendo Triton[®] X-114 / Tween[®] 80 nas respectivas proporções: $\text{---}\blacksquare\text{---}$ 1,0% (v/v) / 0,5% (v/v); $\text{---}\bullet\text{---}$ 2,0% (v/v) / 1,0% (v/v); $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ 3,0 % (v/v) / 1,5% (v/v); $\text{---}\nabla\text{---}$ 4,0% (v/v) / 2,0% (v/v). Todas as soluções encontram-se na presença de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 61

- Figura 19.** Gráfico apresentando o coeficiente de partição em função da concentração de Triton[®] X-114 para soluções contendo misturas dos tensoativos Triton[®] X-114 e Tween[®] 80, de acordo com as proporções apresentadas na Tabela 12, na presença de 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina, 10,0% (m/v) de cloreto de sódio, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 62
- Figura 20.** Gráfico apresentado o ponto nuvem para a mistura Triton[®] X-114 e SDS em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 na presença de 125 µg mL⁻¹ de albumina em função da concentração de SDS, mantendo-se fixa em 1,0% (v/v) a concentração de Triton[®] X-114 e variando a concentração de SDS no intervalo de 0 a 0,3% (v/v) 65
- Figura 21.** Gráfico exibindo o ponto nuvem em função da concentração da mistura Triton[®] X-114 e SDS para tubos contendo 125 µg mL⁻¹ de albumina, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. A abscissa do gráfico exhibe apenas a concentração de Triton[®] X-114 67
- Figura 22.** Gráfico representando o coeficiente de partição em função da concentração dos surfactantes Triton[®] X-114 e SDS para soluções contendo 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina e 1,0% (m/v) de cloreto de sódio, utilizando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. A abscissa do gráfico exhibe apenas a concentração de Triton[®] X-114 68
- Figura 23.** Gráfico representando o coeficiente de partição em função do pH do meio para soluções contendo 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina na presença de Triton[®] X-114 4,0% (v/v), 0,8% (m/v) de SDS e 1,0% (m/v) de cloreto de sódio. Todas as soluções possuíam tampão fosfato como agente tamponante. N = 6 69
- Figura 24.** Ponto nuvem em função da concentração de sulfato de amônio para soluções contendo 0,2% (m/v) de CTAB e 1,0% de Triton[®] X-114 na presença de 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. N = 3 76
- Figura 25.** Espectro de dicroísmo circular para albumina bovina 1,9 µmol L⁻¹ na presença de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. O eixo da ordenada é expresso em resíduos principais de elipticidade molar, sendo que o valor de branco (solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2) foi previamente subtraído 81
- Figura 26.** Espectro de dicroísmo circular, na região compreendida entre 200 e 250 nm, para 1,9 µmol L⁻¹ de albumina bovina, contida nas fases pobres em surfactante, submetidas aos processos de extração utilizando: — (Sistema A): 6,0% (v/v) de Triton[®] X-114 em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2; — (Sistema B): 3,0% (v/v) de Triton[®] X-100 em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2; — (Sistema C): 0,5% (m/v) BRIJ[®] 35, 1,0% (m/v) Triton[®] X-114 e 8,0% (m/v) sulfato de amônio em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2; — albumina bovina 1,9 µmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. 83

- Figura 27.** Espectro de dicroísmo circular, na região compreendida entre 200 e 250 nm, para: — solução de albumina bovina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 na presença de 8,0% (m/v) de sulfato de amônio; — solução de albumina bovina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 85
- Figura 28.** Espectro de dicroísmo circular, na região compreendida entre 204 e 250 nm, para — albumina bovina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ contida na fase pobre em surfactante, após submetê-la ao processo de extração utilizando 3,0% (v/v) Tween[®] 80, 1,5% (v/v) de Triton[®] X-114 e 10,0% (m/v) de cloreto de sódio em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2; — albumina bovina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 86
- Figura 29.** Espectros de dicroísmo circular, na região compreendida entre 195 e 250 nm, para soluções contendo $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina bovina: — em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0; — em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol, e para — fase rica do sistema 4,0% (v/v) Triton[®] X-114 na presença de 0,8% (m/v) de SDS em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 (Sistema D) após precipitação com acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol 88
- Figura 30.** Espectro de dicroísmo circular, na região compreendida entre 200 e 250 nm, para mistura 4,0% (v/v) Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) CTAB, 8,0% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 90
- Figura 31.** Espectros de dicroísmo circular, na região compreendida entre 200 e 250 nm, para soluções contendo $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina bovina: — em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol, e para — fase pobre do sistema 4,0% (v/v) Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) CTAB, 8,0% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sistema E) com posterior precipitação utilizando sulfato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol 91
- Figura 32.** Perfil eletroforético obtido para amostras de plasma sanguíneo submetidas ao procedimento de extração proposto. (FP) representa a fase pobre em surfactante ($8,1 \mu\text{g}$ de proteína aplicada), (FR) representa a fase rica em surfactante ($4,0 \mu\text{g}$ de proteína aplicada) e (P) representa a canaleta contendo padrão protéico. As setas indicam, de maneira ilustrativa, as bandas identificadas na imagem. 95
- Figura 33.** Perfil eletroforético para amostra de plasma sanguíneo bruta. Foram aplicadas $8,0 \mu\text{g}$ de proteína, após diluição com tampão dissociante 96

- Figura 34.** Gráfico apresentando densidade óptica em função da massa molar das proteínas presentes nas canaletas dos géis apresentados nas Figuras 32 e 33: — amostra de plasma sanguíneo submetido ao processo de extração por ponto nuvem (fase pobre); — amostra bruta. As bandas apresentadas nos géis são representadas no gráfico pelos máximos dos picos. A, B, C e D identificam regiões que apresentam intensidades distintas entre os dois géis 97
- Figura 35.** Perfil eletroforético para amostras de plasma sanguíneo submetidas ao protocolo de extração padrão proposto pela empresa Millipore[®], quando se utiliza 100 µL de plasma sanguíneo para realização do procedimento. (R) refere-se a proteína retida, (NR) a proteína não retida na coluna e (P) representa a canaleta contendo padrão protéico 99
- Figura 36.** Gráfico apresentando densidade óptica em função da massa molar das proteínas presentes nas canaletas dos géis apresentados nas Figuras 32 e 35: — amostra de plasma sanguíneo submetido ao processo de extração por ponto nuvem (fase pobre); — fração da amostra não retida na coluna do sistema da empresa Millipore[®]. As bandas apresentadas nos géis são representadas no gráfico pelos máximos dos picos 100

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de procedimentos analíticos empregando surfactantes visando realizar separações, purificações e concentrações pré-análises vêm sendo, atualmente, explorados de maneira muito ampla em química analítica [1]. Para tanto, faz-se uso de sistemas aquosos de duas fases (ATPS)¹, formados em condições experimentais específicas, por meio da agregação de micelas, em um fenômeno denominado ponto nuvem (CP)² [1, 2].

Tais sistemas apresentam vantagens frente às extrações líquido-líquido, uma vez que utilizam reagentes pouco inflamáveis e atóxicos, em processos de separação que são reversíveis. Além disso, são disponíveis comercialmente de forma ampla e aplicados em baixas concentrações, podendo, inclusive, serem reutilizados, causando redução em custos e menor geração de resíduos [3].

Pode-se notar que tais sistemas apresentam destaque na literatura quando aplicados a biomoléculas, tal como proteínas, uma vez que os surfactantes possibilitam seletividade na separação, baseando-se na hidrofobicidade do material biológico em questão e também em suas interações eletrostáticas com as micelas formadas, gerando, assim, um controle bastante rigoroso dos processos de extração [2, 4].

Neste sentido, surge a possibilidade de aplicação de sistemas aquosos de duas fases para remoção seletiva de albumina em amostras de plasma sanguíneo. Tal procedimento apresenta-se indispensável para estudos que empregam diversas técnicas analíticas. Na área de proteômica, por exemplo, dificulta a identificação e separação das proteínas presentes em menores concentrações no meio quando se faz uso da técnica de eletroforese em gel de poli(acrilamida) [5, 6]. Já no caso de análises eletroanalíticas, tal como a polarografia, pode existir redução do sinal analítico devido a interferências causadas pelo recobrimento do eletrodo com a referida proteína [7].

Diversos reagentes e materiais disponíveis comercialmente possibilitam realizar sua remoção do meio; no entanto, caracterizam-se por apresentarem um

¹ ATPS, do inglês: *Aqueous Two-Phase System*.

² CP, do inglês: *Cloud Point*.

elevado custo. Assim, a extração por ponto nuvem pode se apresentar como uma alternativa interessante, tanto sob o ponto de vista econômico, como pelo fato de possibilitar a remoção da proteína indesejada de maneira rápida e simples.

1.1. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Acredita-se que a aplicação de sistemas baseados em ponto nuvem pode proporcionar a remoção seletiva de albumina em plasma sanguíneo sob condições biocompatíveis, desde que otimizadas algumas variáveis, que incluem pH e força iônica do meio, tempo de contato envolvendo proteínas e tensoativos e temperatura de separação de fases.

Para checar a validade desta hipótese, os seguintes objetivos são propostos:

- Avaliar e compreender com maior clareza o comportamento de partição da albumina frente a vários sistemas aquosos de duas fases compostos por diferentes misturas de tensoativos.
- Avaliar estruturalmente a albumina, mais especificamente as estruturas α -hélice, após aplicação dos diferentes processos de extração propostos.
- Aplicar o sistema que apresentar características mais favoráveis, com relação à eficiência de extração bem como grau de desnaturação protéico, para remoção de albumina em plasma sanguíneo humano.
- Submeter as amostras livres de albumina à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliação do perfil protéico obtido.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

2.1. Surfactantes

2.1.1. Definição

Surfactantes ou tensoativos são moléculas orgânicas anfifílicas que, de modo geral, são compostas por uma região apolar, também conhecida como cauda, contendo, tipicamente, entre 8 e 18 átomos de carbono, assim como uma região hidrofílica, também conhecida como grupo liofóbico ou simplesmente cabeça, composta por um grupo polar provido ou não de carga [8, 9].

Baseando-se no grupo polar destas moléculas, os surfactantes podem ser classificados como: 1) aniônicos, onde a cabeça polar apresenta carga negativa e, conseqüentemente, um contra-íon com carga positiva para obtenção de neutralidade elétrica; 2) catiônicos, que apresentam estrutura geral análoga aos aniônicos, mas com a porção hidrofílica contendo carga positiva; 3) não-iônicos, caracterizados por uma região hidrofílica sem a presença de cargas, mas com grupos altamente polares e que apresentam forte afinidade por moléculas de água e, por fim, 4) anfóteros, que apresentam cargas positiva e negativa na mesma molécula, sendo que as mesmas encontram-se localizadas em átomos que não são vizinhos entre si [9].

Tais moléculas encontram-se presentes, inclusive, em sistemas biológicos, participando, por exemplo, dos processos de digestão, na forma dos ácidos biliares, costumeiramente classificados como biosurfactantes, auxiliando na emulsificação de gorduras [9].

Nos últimos anos, as suas aplicações em química analítica vêm ganhando destaque para diferentes finalidades, devido à capacidade que apresentam de alterar, de maneira pronunciada, diferentes propriedades de soluções, permitindo, por exemplo, solubilizar espécies de baixa solubilidade em um determinado meio, deslocar equilíbrios de reações químicas, bem como alterar suas velocidades [10].

Mais especificamente sobre os surfactantes não-iônicos, que são os reagentes que apresentam maior aplicabilidade para a técnica de extração proposta, estes apresentam custo relativamente baixo, equiparando-se as demais classes de tensoativos disponíveis no mercado, além de possuírem uma série de outras aplicações em potencial, destacando-se a utilização em cosméticos, na fabricação de detergentes, medicamentos, flotação de minérios, prospecção de petróleo, dentre outros [11].

2.1.2. Agregação dos monômeros - formação de micelas

A partir de determinada concentração, observam-se mudanças abruptas em algumas propriedades físico-químicas de soluções aquosas de surfactantes; pressão osmótica e turbidez tendem a sofrer forte redução, já a condutividade molar apresenta um pronunciado aumento, quando da utilização de surfactantes iônicos. Por fim, a tensão superficial, que sofria uma redução gradativa, passa a apresentar-se praticamente constante [12]. A concentração em que todas estas mudanças ocorrem está diretamente ligada com a formação de agregados, sendo denominada concentração micelar crítica (CMC).

A princípio, quando se tem uma solução aquosa de um determinado surfactante, abaixo da CMC, seus monômeros irão apresentar a tendência de organizarem-se na interface ar-água (Figura 1-a) ou outra interface qualquer, tal como a parede de um tubo de vidro (interface vidro-água – Figura 1-b), visto que, estas alternativas apresentam-se como condições de menor energia para o sistema. Como os monômeros de tensoativo apresentam uma porção hidrofóbica tendem a minimizar o contato com a água, distribuindo-se nestas interfaces com a porção hidrofílica voltada para o meio aquoso. Esta disposição dos monômeros justifica a tendência de redução gradativa da tensão superficial antes de se atingir a CMC [12].

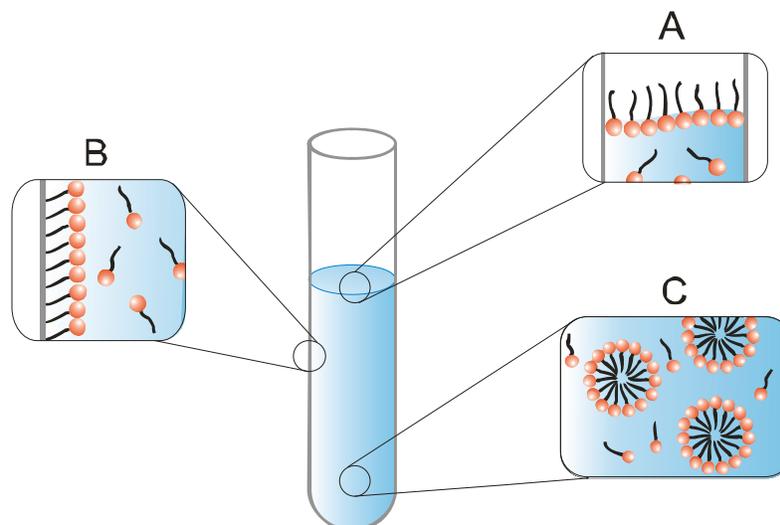


Figura 1. Representação esquemática de três processos de equilíbrio que ocorrem com moléculas anfifílicas em solução aquosa: (A) disposição dos monômeros em uma interface; (B) adsorção dos monômeros em uma superfície, (C) agregação dos monômeros para formação das estruturas denominadas micelas. O processo (C) ocorre apenas acima da CMC. As esferas laranja representam a porção polar dos monômeros, enquanto a cauda é representada pelos traços em preto.

No momento em que estas superfícies apresentam-se saturadas, têm-se duas alternativas: os monômeros podem permanecer livres em solução ou passarem a se agregar espontaneamente formando as estruturas denominadas micelas, como apresentado na Figura 1-C. A segunda possibilidade apresenta-se como a mais viável sob o ponto de vista termodinâmico, visto que, pode-se ter a porção hidrofóbica dos monômeros isolada do solvente, bem como possibilita a ocorrência de interações mais efetivas envolvendo as moléculas de água, facilitando a ocorrência de ligações de hidrogênio [12, 13].

Em meio orgânico o comportamento observado é semelhante aquele descrito anteriormente. No entanto, os agregados micelares formados apresentam a porção hidrofóbica voltada para o exterior, enquanto a região hidrofílica encontra-se voltada para o interior do agregado, ou seja, forma-se o que se chama de micela reversa, minimizando, assim, o contato da porção polar do surfactante com o solvente [14], como pode ser observado na representação da Figura 2.

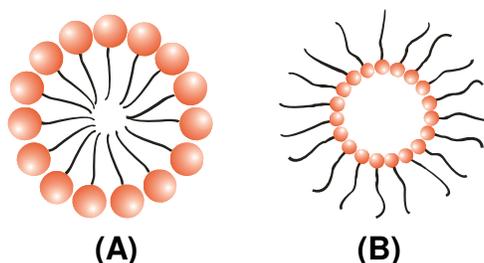


Figura 2. Representação de dois agregados micelares: (A) micela normal, formada em solventes polares; (B) micela reversa, formada em solventes orgânicos. A parte polar é representada pelas esferas laranja e as caudas pelos traços em preto.

Uma vez formados, os agregados não se comportam de maneira estática. As micelas apresentam uma dinâmica bastante característica, sendo que, após a ocorrência da auto-agregação dos monômeros em concentrações superiores a CMC, sempre haverá um equilíbrio envolvendo os agregados formados e monômeros que permanecem dispersos em solução [9].

Com relação ao modelo mais aceito para formação das micelas esféricas, que são as estruturas mais simples formadas após dissolução de surfactantes em um determinado solvente, ele foi proposto sob o ponto de vista entrópico por Reich [15] no ano de 1956.

Para surfactantes iônicos, tais agregados formam-se de acordo com um balanço de forças envolvendo atração das cadeias de hidrocarbonetos e repulsão das cabeças iônicas, sendo que se tem uma grande quantidade de contra-íons permanentemente associados à micela, levando a formação do que se chama de *Camada de Stern* [9], ou seja, uma região com concentração de íons com carga oposta à da micela, que estarão temporariamente ligados à sua superfície por meio de forças eletrostáticas ou de Van der Waals, como pode ser visualizado na Figura 3.

A *Camada de Stern* apresentará, de modo geral, as dimensões dos raios hidratados dos íons envolvidos. Assim, à medida que se distância da superfície micelar tem-se a formação da chamada *Camada difusa*, que consiste em uma região com excesso de cargas contrárias à da micela, e que não estão ligadas ao agregado, até que se atinge a neutralidade elétrica. A partir do *Plano de Stern*

(Figura 3) assume-se que uma isoterma de Langmüir descreve o equilíbrio dos íons adsorvidos na camada [12].

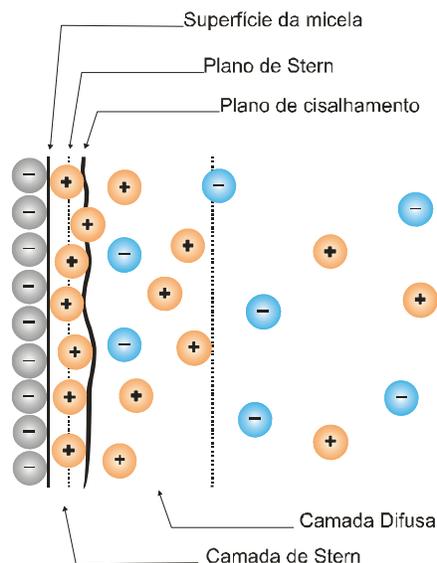


Figura 3. Representação esquemática da estrutura de uma dupla camada elétrica, baseando-se na teoria de Stern. Esferas cinzas representam as cabeças polares dos surfactantes, esferas laranja representam íons com cargas positivas e esferas azuis representam íons com cargas negativas.

No caso de surfactantes não-iônicos, as estruturas dos agregados formados irão depender de questões relacionadas com o grau de hidratação dos monômeros, bem como impedimentos estéricos, que irão atuar de maneira contrária à formação dos agregados [9, 12].

Desta forma, pode-se dizer que as micelas formadas serão altamente dependentes do tipo de surfactante com o qual se está trabalhando, com a concentração do tensoativo, bem como pH e força iônica do meio. Assim, para um tensoativo iônico, por exemplo, as estruturas formadas serão altamente dependentes da concentração de eletrólitos no meio; à medida que esta se eleva, reduz-se a repulsão entre as cadeias dos monômeros, levando à mudanças estruturais nos agregados. Deixa-se de ter micelas esféricas e passa-se a obter estruturas mais complexas, primeiramente cilíndricas, depois hexagonais e finalmente lamelares [9, 12], como pode ser observado na Figura 4.

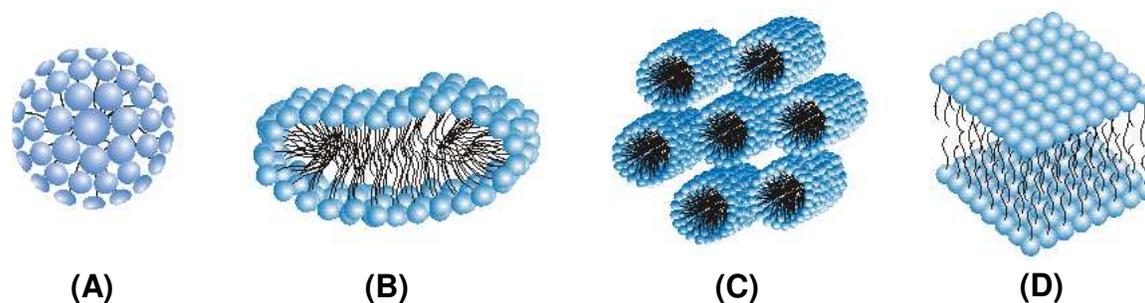


Figura 4. Representação esquemática para diversas estruturas de agregados micelares: (A) micela esférica; (B) micela cilíndrica; (C) micela hexagonal; (D) bicamada.

Para surfactantes não-iônicos esta alteração estrutural apresenta-se menos gradual, ou seja, as micelas esféricas podem se reorganizar diretamente para estruturas lamelares [9].

Outra característica particular apresentada pelos surfactantes relaciona-se com um fenômeno reversível denominado de ponto nuvem [16], também conhecido, por muitos, como ponto de turvação ou ponto de névoa. A seguir, tal fenômeno será descrito com maiores detalhes.

2.1.3. Ponto nuvem – Separação de fases

Os surfactantes, geralmente, formam soluções isotrópicas acima da CMC. No entanto, elevando-se a temperatura da solução, atinge-se o que se chama de ponto nuvem, ou seja, passa-se a obter uma solução anisotrópica, com posterior separação de fases, em um processo conhecido como coacervação [13, 14, 17].

A coacervação consiste em um fenômeno no qual soluções aquosas de macromoléculas são separadas em duas fases líquidas imiscíveis, permanecendo em equilíbrio. Geralmente a fase mais densa, chamada de coacervato, apresenta concentração de surfactante relativamente mais alta frente à de menor densidade [17].

Para surfactantes não-iônicos em meio aquoso, tais como os pertencentes à família dos Triton[®] ou Brij[®], a separação de fases pode ser explicada em termos da desidratação dos grupamentos oxietileno que constituem a região de maior polaridade das cadeias destes tensoativos, resultando na separação de fases

devido à redução da solubilidade da molécula. Como consequência deste processo, observa-se, inicialmente, a turvação da solução em função da maior agregação dos monômeros de surfactante, sendo que, posteriormente, acontece a separação de fases [18].

Além do aumento da temperatura, a adição de eletrólitos à solução também pode conduzir a um sistema de duas fases. A adição de íons faz com que os grupamentos oxietileno sejam desidratados em função da necessidade eminente de solvatação dos cátions e ânions presentes no meio [19]. Tais íons são solvatados preferencialmente, pois podem ser considerados, de maneira bastante simplificada, como cargas pontuais em solução, ou seja, cargas que se encontram altamente localizadas [20].

Inúmeros trabalhos descrevem o estudo e a utilização de eletrólitos com a finalidade de redução do ponto nuvem [21-25]. A eficiência de cada sal para alterá-lo irá depender da capacidade que cada íon apresenta para hidratar-se quando em solução.

Quando um íon tem alta capacidade de hidratação diz-se que apresenta o caráter cosmotrópico. Tais íons promovem a redução de ligações de hidrogênio envolvendo a rede de moléculas de água, com consequente desidratação dos grupos oxietileno, reduzindo a solubilidade dos monômeros do surfactante e promovendo, consequentemente, a separação de fases [23]. Tal fenômeno é reportado na literatura como efeito *salting-out*.

Íons com baixa capacidade de hidratação são denominados caotrópicos e podem resultar no aumento da temperatura de ponto nuvem pelo fato de promoverem a formação de uma estrutura mais coesa das moléculas de água, acarretando em uma melhor solvatação dos monômeros de surfactante [23]. Neste caso, o fenômeno observado recebe o nome de efeito *salting-in*.

Já no caso de surfactantes iônicos, a formação de sistemas aquosos de duas fases também é possível, embora consista em uma tarefa mais complexa. Tais surfactantes apresentam maior solubilidade, quando comparados aos não-iônicos, visto que suas porções polares apresentam carga e são solvatadas de maneira bastante eficiente, gerando micelas que apresentam carga em sua

superfície. Para que a separação de fases ocorra, neste caso, faz-se necessário obter um equilíbrio entre as cargas positivas e negativas dos íons que compõem a *Camada de Stern*, a fim de que a neutralidade elétrica obtida resulte na redução da solubilidade dos monômeros que compõem as micelas.

2.1.4. Aplicações analíticas de sistemas baseados em ponto nuvem

A literatura apresenta o trabalho de Watanabe *et al.* [26] como o primeiro a aplicar a extração por ponto nuvem como alternativa analítica, para realizar a concentração pré-análise de Zn (II), após complexação do metal utilizando o agente complexante 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) para possibilitar a permanência dos íons no interior hidrofóbico das micelas.

Posteriormente, inúmeros sistemas foram desenvolvidos possibilitando realizar a concentração pré-análise de diversos metais, tais como vanádio [27], cobre [28], cromo [29], platina [30], cobalto [31] dentre outros, com posterior quantificação por meio de diversas técnicas analíticas, que incluem a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS³), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS⁴), espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES⁵), espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS⁶) [32].

Como exemplo, pode-se citar o trabalho desenvolvido por Nascentes e Arruda [33], no qual os autores utilizaram a extração por ponto nuvem para realizar a concentração pré-análise de cobalto com posterior quantificação pela técnica de FAAS. Para tanto, fizeram uso de uma mistura envolvendo os surfactantes Triton[®] X-100 e SDS. Experimentalmente, realizava-se a complexação dos íons Co(II) com compostos da classe dos piridilazos, sendo que a separação de fases ocorria à temperatura ambiente, induzida por meio da adição de NaCl ou HCl. A fase rica em surfactante era, então, coletada e diluída

³ Do inglês, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*.

⁴ Do inglês, *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*.

⁵ Do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*.

⁶ Do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*.

para obtenção de uma solução com viscosidade adequada para quantificação. A aplicação da técnica de ponto nuvem proporcionou elevar o poder de detecção da técnica de FAAS, possibilitando determinar cobalto em soluções contendo $\mu\text{g L}^{-1}$ do metal.

Em outro trabalho, Borges *et al.* [34] desenvolveram uma metodologia para determinação de cádmio, chumbo e paládio, em amostras de sangue, após complexação com DDTP⁷ em meio ácido, sendo aplicado o surfactante Triton[®] X-114. O procedimento apresentou-se eficiente para realizar a concentração pré-análise das amostras, que, posteriormente, teriam a concentração dos íons metálicos determinada pela técnica de ETAAS. Como resultado, obteve valores de enriquecimento que variaram numa faixa situada entre 71 e 100%, dependendo da espécie em questão.

De acordo com a literatura, além dos metais, tais sistemas também são aplicados para separação e extração de biomoléculas pertencentes a diferentes classes de compostos, tais como vitaminas lipofílicas [35], hormônios [36] e compostos orgânicos em geral [37], incluindo fármacos [38] e proteínas [4, 39-41]. Como exemplo, Lopes *et al.* [42] demonstraram ser possível realizar o fracionamento de proteínas de leite, isolando as caseínas, que se encontravam na fase rica em tensoativo, das α -lactalbuminas e β -lactoglobulinas, presentes na fase pobre. Para tanto, os autores empregaram uma solução de Triton[®] X-114 na presença de cloreto de sódio em um procedimento que não demanda mais que 15 minutos.

A separação de enzimas também se apresenta como uma alternativa viável. Yagui *et al.* [43] realizaram um estudo envolvendo o surfactante não-iônico *n*-deciltetraoxietileno (C_{10}E_4) na presença de diferentes surfactantes catiônicos pertencentes à série dos brometos de alquiltrimetilamônio, com a cadeia alquílica variando entre 8 e 12 carbonos (C_nTAB)⁸. No trabalho, os autores puderam avaliar a influência da presença de carga no processo de extração. Como resultados, obtiveram valores que atingiram 71% de enzima extraída para a fase rica em

⁷ Do inglês: *O,O* – *Diethyldithiophosphate*.

⁸ Do inglês, *Cetyltrimethylammonium Bromide*.

surfactante quando se aplicou um sistema contendo $C_{10}E_4$ na presença de $C_{10}TAB$, valor *ca.* 2,5 vezes maior quando comparado a uma solução que utilizava apenas surfactante não-iônico.

A literatura também apresenta, mas em menor número, aplicações analíticas para sistemas aquosos de duas fases que utilizam, exclusivamente, surfactantes iônicos. Como exemplo, pode-se citar a utilização de dodecil sulfato de sódio (SDS⁹) para realizar a concentração pré-análise de metais [44, 45]. Nestes casos, para possibilitar a separação de fases, torna-se necessária à adição de ácidos inorgânicos em grandes proporções com a finalidade de neutralizar parcialmente as cargas das cabeças polares dos surfactantes, o que reduz sua solubilidade no meio.

Infelizmente, tais sistemas acabam apresentando sérias restrições para extração de moléculas biológicas, uma vez que se faz necessário empregar soluções com pH incompatíveis com tais amostras. Mesmo assim, encontram-se trabalhos na literatura onde podem ser aplicados: Yu *et al.* [46] realizaram a extração de uma hepatotoxina produzida por cianobactérias, denominada nodularina-R, possibilitando seu isolamento e posterior quantificação. A determinação da referida toxina é de interesse, pois está relacionada com a geração de tumores. Para tanto, os autores utilizaram um surfactante catiônico (Aliquat[®]-336), sendo que, neste caso, a separação de fases era induzida por meio da adição de sulfato de sódio. Alguns parâmetros, tais como tempo de contato, pH do meio e a presença de matéria orgânica foram estudados buscando, desta forma, avaliar o comportamento do sistema sob cada uma das condições. A grande vantagem apresentada com a aplicação da metodologia proposta está relacionada com os altos fatores de concentração obtidos (*ca.* 700 vezes).

⁹ Do inglês, *sodium dodecyl sulfate*.

2.1.5. Coeficiente de partição e sua correlação com as dimensões dos agregados micelares

De maneira geral, costuma-se determinar a eficiência de extração em processos que aplicam sistemas aquosos de duas fases por meio da razão envolvendo as concentrações protéicas na fase rica e pobre em surfactante, de acordo com a equação (i).

$$K = \frac{C_{rica}}{C_{pobre}} \quad (i)$$

onde C_{rica} representa a concentração protéica presente na fase rica em surfactante e C_{pobre} a concentração protéica na fase pobre. O parâmetro K indica o coeficiente de partição do sistema, que apresentará altos valores para processos de extração que se apresentam eficientes [47].

Tal parâmetro pode ser aplicado em modelos teóricos que buscam elucidar os mecanismos pelos quais ocorrem os processos de partição de proteínas mediante sistemas micelares aquosos de duas fases. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Nikas *et al.* [48], onde os autores propuseram um modelo teórico para partição de proteínas globulares hidrofílicas baseando-se na existência de efeitos de volume de exclusão envolvendo biomoléculas e micelas, bem como, considerando que estes efeitos seriam os mais relevantes num processo de extração baseado em sistemas aquosos de duas fases que aplicam, exclusivamente, surfactantes não-iônicos.

Neste modelo, duas relações matemáticas distintas correlacionam o coeficiente de partição com os raios dos agregados micelares e da proteína envolvida no processo de partição; na equação (ii) tem-se o modelo proposto para um sistema composto por micelas cilíndricas, enquanto a relação (iii) consiste no modelo proposto para sistemas contendo micelas esféricas.

$$K(cil) = \exp\left(-(\phi_t - \phi_b)(1 + R_p/R_0)^2\right) \quad (ii)$$

$$K(esf) = \exp\left(-(\phi_t - \phi_b)(1 + R_p/R_0)^3\right) \quad (iii)$$

Nas equações apresentadas, os parâmetros ϕ_t e ϕ_b relacionam-se com os volumes das fases pobre e rica em surfactante, respectivamente, parâmetros estes diretamente ligados ao grau de hidratação dos monômeros do tensoativo em solução; R_p representa o raio hidrodinâmico da proteína em estudo e R_0 relaciona-se com raio das micelas.

Deve-se salientar que o desenvolvimento deste modelo levou em consideração a utilização de soluções com concentrações protéicas de, no máximo, 0,5 g L⁻¹, em solvente θ , e que a presença de proteínas na concentração máxima não implica em alterações na forma, tamanho e distribuição de tamanho das micelas, assim como possibilita desconsiderar a existência de interações entre as moléculas protéicas.

Por fim, o coeficiente de partição também pode ser utilizado para determinação de parâmetros termodinâmicos [49-51], fazendo-se uso, por exemplo, da equação de van't Hoff (iv), na busca de uma melhor compreensão da interação envolvendo surfactantes e biomoléculas.

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H^0}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (iv)$$

2.1.6. Características de alguns surfactantes utilizados neste trabalho

Dentre os surfactantes não-iônicos utilizados neste trabalho, pode-se citar a classe dos éteres *t*-octilfenoxipoli(oxietileno), mais comumente conhecidos como Triton[®] [37]. A estrutura genérica desta classe de compostos é apresentada na Figura 5.

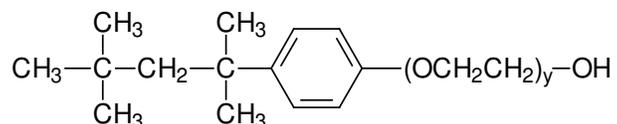


Figura 5. Fórmula genérica dos surfactantes pertencentes à classe dos Triton[®]. O número de grupo oxietileno é dado pela letra y.

Tais surfactantes são comercializados na forma de uma mistura. No caso do Triton[®] X-114, tem-se o reagente composto por uma mistura de cadeias contendo 7 e 8 grupos oxietileno, apresentando sua CMC quando se atinge concentrações na ordem de 10^{-4} mol L⁻¹ [37] e ponto nuvem que pode variar de 21 a 25 °C para soluções com concentrações na faixa de 0,1 a 5,0% (m/v) [37].

Já no caso do Triton[®] X-100, tem-se uma mistura de monômeros contendo 9 e 10 grupos oxietileno. Apresenta número de agregação variando entre 100 e 140 monômeros [52], temperatura de turvação de 67 °C (solução aquosa 1,0% m/v) [21] e densidade de 1,07 g mL⁻¹.

Outra classe de surfactantes não-iônicos é a classe dos polioxietileno glicol monoéteres, conhecidos comercialmente como Brij[®], cuja fórmula geral é apresentada na Figura 6.



Figura 6. Fórmula genérica dos surfactantes da família Brij[®], onde n representa o número de grupos oxietileno presentes.

Especificamente neste trabalho, focou-se na utilização de um surfactante desta classe, denominado Brij[®] 35, que apresenta CMC variando entre 0,06 e 0,1 mmol L⁻¹ [37] e ponto nuvem maior que 100 °C [37].

De maneira diferente dos surfactantes da família Triton[®], os tensoativos da classe Brij[®] não apresentam absorvância significativa na região do ultravioleta, e por isso podem ser aplicados em técnicas de separação que utilizam sistemas de detecção nesta região [53].

Já os surfactantes da família Tween[®] englobam os monooleatos de sorbitol polietoxilados, sendo que a Figura 7 apresenta o tensoativo desta classe utilizado

neste trabalho, o Tween[®] 80. Este surfactante apresenta o ponto nuvem de 95,1°C, para solução aquosa 0,1 mmol L⁻¹ [54]. Conhecido como “green surfactant” tem aplicação em indústrias farmacêuticas e de alimentos, pelo fato de ser biodegradável e atóxico, além de apresentar aplicações para extração de proteínas de membrana [55].

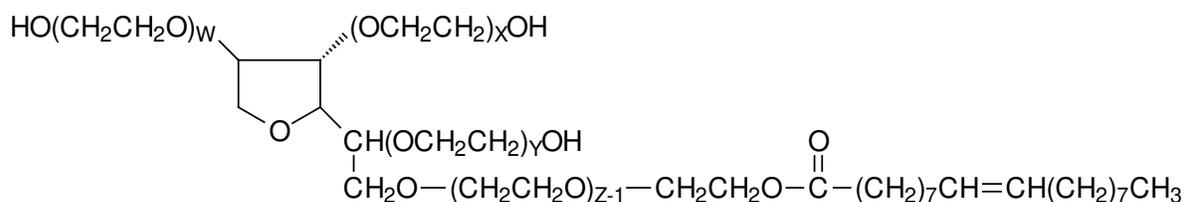


Figura 7. Fórmula estrutural para o surfactante não-iônico Tween[®] 80, onde a soma de w, x, y e z é igual a 20.

2.2. Proteínas

As proteínas são a mais complexa e variada classe de moléculas encontradas nos organismos vivos. Todas elas são compostas pelos elementos carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio. Grande parte contém enxofre, e algumas, fósforo, além de outros elementos em menor proporção, tais como ferro, zinco ou cobre. Apresentam, de modo geral, massa molar variando na faixa de 12000 a 1 milhão Da ou mais, resultando em moléculas que apresentam propriedades coloidais. A importância biológica das proteínas resulta das inúmeras funções que estas possuem nos organismos, atuando no sistema de defesa (anticorpos), regulando a atividade de glândulas (hormônios), catalisando reações (no caso de enzimas), atuando como as principais fontes de nitrogênio e enxofre no organismo, dentre outras [56, 57].

Devido a grande diversidade, podem ser classificadas sob diversos pontos de vista. Inicialmente, pode-se dividi-las em duas classes principais: a das proteínas simples, que produzem apenas aminoácidos quando hidrolisadas e as proteínas conjugadas, que além dos aminoácidos também geram outros produtos

orgânicos ou inorgânicos, denominados de grupos prostéticos, quando submetidas à hidrólise [56].

Uma segunda classificação baseia-se em características físicas das moléculas protéicas, podendo-se classificá-las em proteínas globulares ou fibrosas. As proteínas globulares são solúveis em água, muito frágeis e sensíveis à desnaturação. Tais proteínas possuem ação enzimática ou atuam no transporte de outras substâncias no organismo. Já as proteínas fibrosas apresentam como principais características à baixa solubilidade em água e elevada resistência estrutural, atuando de maneira bastante efetiva em funções relacionadas com a proteção do organismo [56].

2.2.1. Albumina

As albuminas do soro são as proteínas mais abundantes encontradas no plasma sangüíneo, contribuindo de maneira significativa em diversos processos de transporte e regulação nos organismos, sendo, portanto, amplamente estudadas. São proteínas globulares com peso molecular em torno de 65 kDa [58] e possuem um grande número de regiões com conformação helicoidal (ca. 67%). Caracterizam-se por apresentar uma pequena quantidade de triptofano e metionina em sua estrutura. Por outro lado, possuem diversas cisteínas (17 ligações dissulfeto) e aminoácidos que apresentam carga em pH fisiológico, incluindo ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina [59].

A albumina do soro humano (HSA)¹⁰ é composta por 585 aminoácidos e apresenta peso molecular de 66,5 kDa. Sua concentração no plasma situa-se em torno de 0,6 mmol L⁻¹. Além disso, apresenta três domínios estruturalmente homólogos [60, 61], que podem ser observados na Figura 8.

¹⁰ Do inglês: *Human Serum Albumin*.

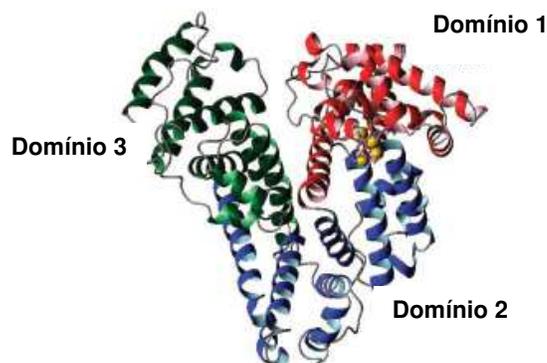


Figura 8. Estrutura da albumina do soro humano: o domínio 1 é apresentado em vermelho (resíduos de 1 a 181); o domínio 2 é exibido em azul (resíduos de 188 a 373); o domínio 3 aparece na cor verde (resíduos de 380 a 571). Em amarelo, são destacados os resíduos responsáveis por fixar Zn^{2+} em sua estrutura [adaptado de 60].

Para a albumina do soro bovino (BSA)¹¹, que possui cerca de 80% de homologia com a albumina humana, tem-se uma seqüência de 581 aminoácidos, resultando em uma proteína com 66,1 kDa e ponto isoelétrico igual a 5,0. Tal proteína compõe *ca.* 50 a 55% da concentração total das proteínas do sangue [61, 62].

As albuminas possuem a capacidade de se ligarem com uma grande variedade de substratos, que incluem metais, tais como cálcio, cobre, zinco e cádmio, além de ácidos orgânicos, aminoácidos, hormônios e uma ampla gama de fármacos, desempenhando, desta forma, um importante papel no que se refere ao transporte destas substâncias [59, 60].

No entanto, como consequência da alta solubilidade em água, sua interação com moléculas lipofílicas é bastante reduzida. Mesmo assim, ela ocorre devido às altas concentrações desta proteína nos organismos. Para ilustrar este fato, pode-se utilizar a solubilidade dos ácidos graxos, que na ausência de albumina situa-se em torno de 10^{-6} mol L⁻¹, passando a *ca.* 2 mmol L⁻¹ quando complexados a esta proteína [59, 63]

¹¹ Do inglês: *Bovine Serum Albumin*.

Níveis reduzidos de albumina no organismo causam uma doença rara chamada de analbuminemia. No entanto, indivíduos que apresentam esta característica não possuem sintomas aparentes, sendo que a função da albumina pode ser substituída por outras proteínas [63].

2.2.2. Métodos para determinação da concentração de proteínas totais

As metodologias mais empregadas para determinação da concentração de proteínas totais consistem nas reações espectrofotométricas no ultravioleta e visível (UV-Vis). No entanto, não existe uma reação considerada de uso universal para realização de tais determinações [64].

Os métodos mais amplamente empregados são os de Lowry *et al.* [65] e Bradford [66]. O método de Lowry destaca-se pela sua alta sensibilidade, podendo ser aplicado para determinação de proteínas totais em plasma sanguíneo e produtos alimentícios. No entanto, apresenta problemas pelo fato de possuir um grande número de interferentes, bem como uma pequena faixa linear [64, 67]. O método de Bradford é mais rápido e sensível quando comparado com o de Lowry, além de possuir um menor número de interferentes, sendo geralmente aplicado para amostras de tecidos vegetais, leite e plasma [64].

2.2.2.1. Reação de Bradford

O método de Bradford [66] para determinação de proteínas totais baseia-se em interações eletrostáticas envolvendo os grupamentos sulfônicos do corante Azul de Coomassie G-250 (CBBG)¹², vide na Figura 9, e as proteínas, sendo que a reação envolvida, explora o equilíbrio químico das formas catiônica, neutra e aniônica deste corante.

¹² Do inglês *Coomassie Brilliant Blue G – 250*.

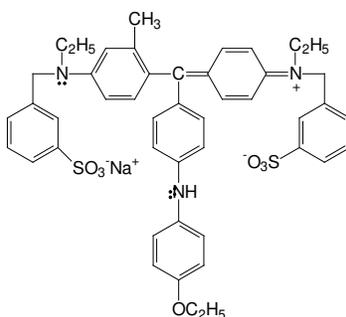


Figura 9. Estrutura do corante Azul de Coomassie, composto que compõe o reagente de Bradford [68].

Na ausência de proteínas, o reagente apresenta duas bandas de absorção: uma em 465 nm e outra em 645 nm. Neste caso, a molécula de CBBG apresenta-se em sua forma catiônica, tendo os dois nitrogênios de sua estrutura protonados [69].

No entanto, quando o corante entra em contato com proteínas, principalmente aquelas que apresentam aminoácidos com resíduos laterais básicos ou aromáticos expostos em suas superfícies, tal como a arginina, [68], ocorre o deslocamento do equilíbrio químico mencionado anteriormente, levando a molécula de CBBG, a princípio, para sua forma neutra e, posteriormente, para a forma aniônica. Conseqüentemente, tem-se a supressão da absorção nos comprimentos de onda de 465 e 645 nm e passa-se a formar um complexo azul bastante intenso que absorve fortemente em 595 nm, comprimento de onda onde é realizada a leitura espectrofotométrica [68, 69].

Estudos realizados com a reação em questão [68, 70, 71] mostram que existe um grande compromisso envolvendo os reagentes que a compõe (CBBG, ácido fosfórico e etanol), sendo que algumas variáveis devem ser controladas rigorosamente para garantir a qualidade das análises. Baixas concentrações do corante podem provocar variação na resposta para diferentes proteínas. No entanto, para concentrações elevadas pode ocorrer o problema de se obter curvas analíticas com pequenas faixas lineares. A presença de ácido faz-se necessária por dois motivos: auxiliar na solubilização do corante e atuar no equilíbrio entre as formas catiônica, neutra e aniônica do corante, permitindo controlar a formação do complexo proteína-CBBG. Já o etanol possui a função de auxiliar na solubilização

do corante, eliminando a possibilidade de ocorrência de turbidez devido à precipitação de sólidos [68, 70, 71].

Deve-se ressaltar limitações na reação em questão, tais como: diferença em sensibilidade para diferentes proteínas [70], problema que pode ser solucionado por meio da utilização de padrões com composição semelhante ao da amostra de interesse. Outra limitação é o fato do corante CBBG não interagir com aminoácidos ou proteínas com massa molar inferior a 5 kDa [72]. Por fim, surfactantes também provocam falso positivo, pois complexam-se com a molécula de CBBG. Desta forma, devem ser removidos de maneira adequada antes de se proceder as análises [64, 66].

2.2.3. Análises de estruturas secundárias de proteínas via dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular pode ser empregada para estudos de moléculas que apresentam centros quirais, bem como para avaliar unidades opticamente ativas quando se trabalha com macromoléculas, como, por exemplo, no caso de proteínas, carboidratos ou dendrímeros. Mais especificamente para proteínas, a técnica permite avaliar o enovelamento das mesmas, suas estruturas, interações com outras moléculas protéicas, bem como estabilidade conformacional sob diferentes meios [73-75].

A técnica baseia-se em detectar a absorção diferencial da luz circularmente polarizada, à esquerda ou à direita, à medida que esta incide sob grupamentos cromóforos. A absorção desta radiação, em determinados comprimentos de onda, irá resultar em transições eletrônicas específicas, que serão responsáveis pelas bandas características apresentadas nos espectros de dicroísmo circular [76].

Para a determinação de estruturas secundárias de proteínas, utiliza-se radiação com comprimento de onda situado na faixa entre 150 e 250 nm. Neste intervalo, o cromóforo responsável pela absorção diferencial da luz circularmente polarizada consiste nos grupamentos amida das ligações peptídicas, pelo fato dos mesmos apresentarem centro opticamente ativo [76].

Nesta região, as transições de maior relevância são evidenciadas pela presença de bandas em cerca de 220 e 208 nm, bem como, outra com máximo em 193 nm, que são originárias de duas transições eletrônicas apresentadas na Figura 10. As bandas em 208 e 193 nm referem-se a transições do tipo π não ligante π^* , ou seja, transições permitidas envolvendo orbitais π não ligantes e orbitais π^* antiligantes. A banda presente em 220 nm caracteriza-se por uma combinação envolvendo a transição magneticamente permitida entre orbitais não ligantes (representados pelo par de elétrons livres do oxigênio que compõe os grupamentos amina das proteínas) para orbitais π^* , bem como a interação envolvendo as combinações das transições eletrônica e magneticamente permitidas do cromóforo com o campo eletrostático do restante da molécula [73, 76].

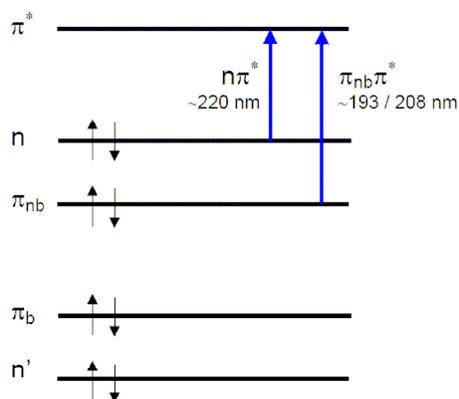


Figura 10. Principais transições eletrônicas envolvidas na incidência da luz circularmente polarizada em uma proteína. π_b representam orbitais ligantes; π_{nb} orbitais não ligantes; π^* orbitais antiligantes. Os dois pares de elétrons livres do oxigênio são indicados por n e n'.

Desta forma, a técnica possibilita avaliar se uma determinada proteína continua apresentando enovelamento, mas não permite dizer se este enovelamento corresponde à proteína em sua forma nativa.

A técnica também pode ser aplicada como uma alternativa para determinação de estruturas terciárias de proteínas. Neste caso, deve-se proceder às análises na faixa de comprimento de onda situado entre 250 e 300 nm, sendo que, neste caso, têm-se como cromóforos resíduos laterais de aminoácidos contendo grupamentos aromáticos [76].

O primeiro trabalho que buscou desenvolver um modelo matemático focado especificamente para determinação de estruturas secundárias de proteínas via dicroísmo circular foi proposto por Chen, *et al.* [74]. Neste trabalho, os modelos desenvolvidos, e aplicados a oito proteínas distintas, apresentaram-se mais eficientes quando comparados aos modelos até então existentes, baseados em polipeptídios sintéticos.

De modo bastante simplificado, para desenvolvimento de um modelo matemático visando à determinação da porcentagem de α -hélices, folhas β e estruturas randômicas devem-se basear num conjunto de proteínas ou peptídeos, cujas estruturas sejam amplamente conhecidas. Assim, em um determinado comprimento de onda fixo (λ), pode-se escrever uma equação matemática cujo formato segue aquele apresentado na equação (v).

$$\chi(\lambda) = f_H \varepsilon_H(\lambda) + f_\beta \varepsilon_\beta(\lambda) + f_R \varepsilon_R(\lambda) \quad (v)$$

Os termos f_H , f_β e f_R representam os valores conhecidos para a porcentagem de α -hélices, folhas β e estruturas randômicas das proteínas padrão, enquanto os termos ε_H , ε_β e ε_R relacionam-se com os dados de elipticidade, obtidos quando se submete as amostras à luz circularmente polarizada. Neste caso, a somatória dos termos é justificada pelo fato da atividade óptica apresentar-se como uma propriedade aditiva. Assim, pode-se propor modelos matemáticos que possibilitem determinar os valores de f_x para proteínas, cuja estrutura secundária não é conhecida [74].

A técnica gera resultados altamente confiáveis para determinação de α -hélices. Já no caso das folhas β , a incerteza nos valores obtidos é maior em função da banda positiva em 193 nm apresentar, na maioria das vezes, menor intensidade [73, 74].

Existem diversos artigos científicos que apresentam algoritmos capazes de determinar a porcentagem de estruturas secundárias presentes em proteínas. Dentre eles, pode-se citar os trabalhos que utilizam o algoritmo de regressão de

mínimos quadrados [74, 77-80]. O diferencial que existe entre os modelos matemáticos resultantes, em cada um destes trabalhos, consiste nas biomoléculas que serão utilizadas para elaboração do algoritmo; o método de Fasman [77], por exemplo, utiliza polipeptídios para este fim, enquanto que os métodos de Chen [74], Bolotina [78] e Yang [80] utilizam proteínas distintas para realização dos cálculos.

Outro método, desenvolvido por Sreerama *et al.* [81], é denominado de SELCON 2¹³, e seu aperfeiçoamento de SELCON 3. Tal método utiliza o espectro de dicroísmo circular para obtenção de um valor inicial que é inserido em uma matriz e processado, obtendo-se uma resposta. O processo se repete por diversas vezes até a obtenção de um valor considerado consistente, que representará a porcentagem de cada uma das estruturas secundárias das proteínas.

O algoritmo CONTIN [82, 83] considera o espectro obtido experimentalmente como uma combinação linear de diversos espectros que apresentam suas estruturas secundárias conhecidas, possibilitando, assim, correlacionar os dados experimentais com valores esperados para as estruturas secundárias da proteína em estudo.

Já o programa K2D [84] utiliza o conceito de redes neurais. Seu algoritmo baseou-se em padrões de proteínas que apresentavam estruturas conhecidas, sendo que, para cada uma, obteve-se valores de respostas ponderados. Tais valores são, então, utilizados para comparação frente à macromolécula de interesse.

Experimentalmente, após as análises, os equipamentos fornecem valores de elipticidade $[\theta]$. No entanto, realiza-se, comumente, a conversão para uma unidade mais apropriada, baseada na concentração de proteína presente no meio, principalmente, se o objetivo consiste em estimar as estruturas que as compõem. Pode-se, então, fazer uso da elipticidade molar, por meio da aplicação da relação (vi):

$$[\theta] = 3298 \Delta \epsilon \quad (\text{vi})$$

¹³ Do inglês, *Self Consistent Method*.

onde $[\theta]$ representa a resposta expressa em elipticidade molar e $\Delta\epsilon$ representa a elipticidade, obtida experimentalmente por meio da absorção da luz circularmente polarizada, de acordo com a relação (vii):

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda) \quad (\text{vii})$$

onde $\epsilon_L(\lambda)$ e $\epsilon_R(\lambda)$ representam a rotação da luz polarizada à esquerda e à direita, respectivamente [76].

Outra unidade, e mais comumente aplicada em artigos científicos, consiste nos resíduos principais de elipticidade molar $[\phi]$, expressa em graus $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, que é definida pela relação (viii):

$$[\phi] = \frac{0,01[\theta]}{lcn} \quad (\text{viii})$$

onde l representa o caminho óptico da cela utilizada para realizar as medidas, em cm, c representa a concentração da solução protéica, em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e n representa o número de resíduos de aminoácidos da proteína em questão.

2.2.4. Separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida – algumas considerações

A eletroforese baseia-se na migração de qualquer íon ou grupo funcional contendo carga na presença de um campo elétrico. Considerando que as proteínas apresentam carga líquida em qualquer pH, à exceção de seus pontos isoelétricos, pode-se fazer uso da técnica para realizar a separação destas biomoléculas [85].

Assim, quase quatro décadas após seu desenvolvimento, por Laemmli [86], o método de SDS-PAGE apresenta-se como um dos mais populares e

amplamente aplicados para separação de proteínas e misturas protéicas [87]. Ainda, nos dias atuais, as separações em uma dimensão constituem a forma mais difundida da técnica, pois oferecem, como vantagens, resolução adequada para a maioria das situações, além de possibilitarem a análise das amostras de maneira simultânea e com aplicação de procedimentos simples, para fins comparativos. Neste caso, a separação se dá de acordo com a massa molar das proteínas, que migram por uma matriz de poliacrilamida após aplicação de um campo elétrico [85].

Em teoria, a técnica consiste numa ferramenta de separação apropriada para a grande maioria das moléculas protéicas, desde que o preparo das amostras ocorra sob condições apropriadas, que incluem utilização de meio aquoso contendo concentrações adequadas de detergentes, e sem que haja perda significativa da atividade das moléculas [88].

Os protocolos básicos para preparação e aplicação dos géis em uma dimensão têm sofrido alterações pouco significativas nos últimos anos. Mesmo assim, a técnica ainda contribui com consideráveis avanços nas análises de proteínas, sendo aplicada em pesquisas científicas para diversas finalidades [85, 89], incluindo estudos relacionados com proteômica [90].

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Preparo de soluções e limpeza dos materiais

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico, bem como água deionizada ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), que foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore[®], Bedford, EUA). Para a pesagem de reagentes utilizou-se uma balança analítica (Sartorius AG Göttingen, BL 2108). Para homogeneização das soluções fez-se uso de um misturador do tipo vórtex (Thermolyne[®], 37600 Mixer, Dubuque, Iowa, EUA).

Em todos os ensaios, foram usados padrões de albumina bovina fração V (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) em tampão fosfato, preparado a partir de KH_2PO_4 . Hidróxido de sódio foi empregado para corrigir o pH das soluções com auxílio de um potenciômetro (Digimed[®] DM 20, São Paulo, Brasil), de acordo com as necessidades do estudo.

Após o uso, todos os materiais eram lavados com água, detergente e etanol e colocados em banho de ácido nítrico 10% (v/v), sendo mantidos nesta solução por, no mínimo, 8 horas. Posteriormente, eram lavados utilizando água deionizada e secos em estufa, à exceção dos materiais volumétricos que eram secos à temperatura ambiente.

3.2. Método

3.2.1. Avaliação da formação do ponto nuvem para os sistemas estudados

Para todos os sistemas avaliados, a obtenção do ponto nuvem foi realizada após inserção de tubos de ensaio contendo 10 mL de solução com a seguinte composição: $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina na presença dos tensoativos apresentados na Tabela 1, que apresentavam concentrações variáveis de acordo com o estudo proposto, em um banho termostatizado (Amersham Biosciences, Multi Temp III, Alemanha) com faixa de trabalho variando de 5 a 65 °C, visando obter a separação de fases com temperatura biocompatível.

Dentre os sais e co-surfactantes avaliados para adequação da temperatura de ponto nuvem encontram-se: cloreto de sódio (Synth, São Paulo, Brasil), cloreto de potássio (Mallinkrodt, México), sulfato de amônio (J. T. Baker, Phillipsburg, USA, México), acetato de amônio (Mallinkrodt, México), nitrato de sódio (Nuclear, Brasil), sacarose (J. T. Baker, Phillipsburg, USA), uréia (Bioagency, São Paulo, Brasil), cloreto de cálcio (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), acetato de bário (J. T. Baker, México) e nitrato de alumínio (Ecibra, São Paulo, Brasil).

O ponto nuvem foi obtido por meio de uma rampa crescente de temperatura, (0,5 °C a cada 30 segundos). Ela foi realizada visualmente, observando-se a turvação do tubo, até se obter uma solução anisotrópica persistente, mesmo após a remoção do tubo do banho termostaticado.

Tabela 1. Surfactantes que compunham cada um dos seis sistemas avaliados para extração de proteínas por meio da técnica de ponto nuvem. As concentrações otimizadas dos surfactantes, para cada sistema, serão discutidas posteriormente, ao longo do trabalho.

Sistema	Composição
A	Triton [®] X-114 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha)
B	Triton [®] X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha)
C	Brij [®] 35 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) na presença de Triton [®] X-114
D	Triton [®] X-114 na presença de SDS (USB, Cleveland, EUA)
E	Tween [®] 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na presença de Triton [®] X-114
F	CTAB (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) na presença de Triton [®] X-114

3.2.2. Procedimentos para separação de fases

O procedimento para realizar a separação de fases foi o seguinte:

Etapas 1: Primeiramente, realizaram-se estudos buscando obter temperaturas de separação de fases biocompatíveis, conforme procedimento descrito anteriormente, no item 3.2.1, preparando os tubos da seguinte maneira: adicionava-se o surfactante concentrado, seguido de tampão fosfato para diluição, e, posteriormente, um volume adequado de uma solução estoque de albumina 500 µg mL⁻¹ a fim de se obter uma concentração final de 125 µg mL⁻¹ desta proteína em cada tubo. Por fim, quando necessário, realizava-se a adição de eletrólitos para adequação do ponto nuvem. Os sistemas eram, então, homogeneizados.

Etapa 2: Os sistemas foram mantidos em temperatura abaixo do ponto nuvem (solução isotrópica).

Etapa 3: Elevou-se a temperatura do banho a fim de se obter a separação de fases. Nesta etapa, os tubos foram mantidos no banho durante 10 min. Nos estudos de tempo de contato este tempo poderia variar entre 10 e 50 min.

Etapa 4: As soluções foram centrifugadas (centrífuga Nova Técnica, NT 811 – Piracicaba, Brasil) a 2500 rpm (1780 g) por 5 min. Para os sistemas B e C a etapa de centrifugação consistiu em submeter os tubos a 13000 rpm (ca. 16000 g) por 5 min utilizando uma ultracentrífuga (BioAgency – Bio-Spin-R, Alemanha).

Etapa 5: Coletou-se a fase pobre com auxílio de uma micropipeta, para posterior quantificação.

3.2.3. Quantificação do teor de proteínas totais

Para quantificação do teor protéico nas fases, realizou-se um procedimento prévio de precipitação das proteínas, como será discutido no item 4.1.1.1. Optou-se por trabalhar com o agente precipitante acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ (Mallinkrodt, México) em metanol (J. T. Baker, México).

Posteriormente à adição do agente precipitante, os tubos foram mantidos refrigerados por 3 horas, sob temperatura < -10°C, garantindo, assim, uma precipitação quantitativa. Após este período, o sobrenadante de cada tubo foi removido e os precipitados ressolubilizados, utilizando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2.

Para determinação do teor protéico utilizou-se o método de Bradford [66]. O reagente de Bradford foi preparado em laboratório momentos antes de se realizar a quantificação, evitando, desta forma, a degradação do mesmo. O seu preparo consistia em uma solução contendo 0,01% (m/v) do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (J. T. Baker, Phillipsburg, EUA), 5,0% (v/v) de etanol anidro (J. T.

Baker, México) e 10,0% (v/v) de ácido fosfórico 85% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha), adicionados a um balão volumétrico, respectivamente nesta ordem, completando-se, posteriormente, o volume com água deionizada. Em seguida, esta solução foi mantida sob agitação, por um período de 15 minutos, para garantir a solubilização adequada do corante CBBG, sendo, então, filtrada e estocada ao abrigo da luz.

A curvas analíticas foram construídas para cada determinação, utilizando soluções de albumina bovina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 como padrão.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas a 595 nm, utilizando um espectrofotômetro Micronal modelo B 582 (São Paulo, Brasil). Cubetas de plástico foram empregadas para evitar problemas relacionados com adsorção do reagente em suas paredes [91].

3.3. Avaliação do teor protéico presente nas fases

Com a metodologia desenvolvida para quantificação do teor protéico, foi possível realizar a quantificação de uma das fases e posterior estimativa da concentração protéica presente na outra, para que, assim, fosse calculado o coeficiente de partição. De maneira geral, buscou-se sempre quantificar a fase pobre em surfactante devido a menor concentração de tensoativo, que é um potencial interferente para o método.

3.4 Análises de dicroísmo circular

Para as análises de dicroísmo circular, utilizaram-se as soluções que apresentaram concentrações de surfactantes dadas como ótimas ao longo do trabalho (para a maioria dos sistemas essas concentrações ótimas foram obtidas na condição em que a maior fração da albumina permanecia em uma das fases formadas).

Após a determinação da concentração protéica, diluía-se a amostra com solução tampão adequada (utilizava-se o mesmo agente tamponante aplicado no processo de extração) para se obter uma solução com concentração final de albumina situada entre 1 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esta faixa de concentração era ideal para análises por dicroísmo circular. Considerou-se a massa da albumina igual a 66 kDa.

Como brancos analíticos, utilizaram-se soluções contendo concentrações de surfactantes e eletrólitos idênticas às das amostras, que foram submetidas ao mesmo procedimento de separação de fases e posterior diluição.

Cerca de 300 μL de amostra foram aplicados a uma cela de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm de um espectropolarímetro marca JASCO modelo J-720 (Tóquio, Japão).

Alguns parâmetros para realização das análises foram fixados, dentre eles: temperatura no compartimento da cela de 20 °C, detectabilidade de 100 mdeg., e resolução de 1 nm. A acumulação de espectros era variável em função dos resultados obtidos.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras de plasma sangüíneo humano, submetidas ao procedimento de extração utilizando o sistema composto por 4,0% (v/v) Triton[®] X-114 na presença de 0,8% (m/v) SDS em pH 5,0, tiveram o perfil eletroforético comparado com o de amostras de plasma que não foram submetidas a nenhum procedimento de remoção de albumina, bem como, frente a um sistema comercial (Montage Albumin Depletion Kit, Millipore[®], Bedford, EUA) para remoção desta proteína. A seguir, apresentam-se os procedimentos utilizados para preparo das amostras e géis.

3.5.1. Extração de albumina em plasma sangüíneo

As amostras de plasma (fase pobre e fase rica) submetidas ao procedimento de extração utilizando o sistema 4,0% (v/v) Triton[®] X-114 na presença de 0,8% (m/v) SDS em pH 5,0 foram precipitadas utilizando acetona na proporção 1:4 v/v (amostra:solvente).

Para ressolubilização das mesmas utilizou-se um tampão apropriado para eletroforese em gel em uma dimensão (SDS-PAGE), denominado tampão dissociante. A composição deste tampão consistia em uma mistura de Tris (hidroximetil) aminometano 60 mmol L⁻¹ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), com pH ajustado a 6,8 utilizando HCl concentrado (J. T. Baker, Xalostoc, México); 10% (m/v) de glicerol (Amersham Biosciences, Uppsala Suécia), 20% (v/v) de SDS; 5% (v/v) de β-mercaptoetanol (J. T. Baker, Philipsburg, EUA) e 0,001% (m/v) de azul de bromofenol (Bioagency, São Paulo, Brasil). A utilização deste tampão possibilita realizar a desnaturação das proteínas, em função da presença de β-mercaptoetanol e SDS, bem como faz com que a carga líquida de todas as proteínas seja a mesma em função da presença de SDS (surfactante iônico). A desnaturação e necessidade de igualar a carga líquida das proteínas decorre do fato da separação ocorrer apenas em função da massa molar das proteínas. Já a adição de glicerol facilita a aplicação da amostra no gel pelo fato de elevar a densidade e viscosidade da solução.

Como padrão protéico, utilizou-se uma mistura disponível comercialmente (Fermentas, Glen Burnie, EUA) composta de 7 proteínas purificadas: β-galactose de *E. Coli* (116,0 kDa); albumina bovina (66,2 kDa); ovalbumina (45,0 kDa); lactato desidrogenase (35,0 kDa); enzima de restrição endonuclease Bsp98I de *E. Coli* (25,0 kDa); β-lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Para aplicação no gel, o padrão foi submetido a aquecimento em banho com água a 95 °C por 5 min para promover a desnaturação das proteínas. Para as amostras, não houve necessidade de realizar nenhum tipo de aquecimento visto que as proteínas já se encontravam parcialmente desnaturadas.

3.5.2. Preparo dos géis de poliacrilamida

Os co-polímeros utilizados para separação de proteínas consistiam em um gel concentrador de 3,0 cm com concentração de 3,5% (m/m) de acrilamida e tampão Tris-HCl a 1,0 mol L⁻¹ pH 6,8 e outro gel separador a 10,0% (m/m) de acrilamida e tampão Tris-HCl a 1,5 mol L⁻¹ (pH 8,8).

Após polimerização completa, as amostras foram, aplicadas na região superior do gel concentrador e imediatamente iniciava-se a separação das proteínas. Para proporcionar a passagem de corrente elétrica, utilizava-se, nos reservatórios da cuba eletroforética, uma solução tampão denominada de tampão de corrida, o qual era composto por 0,025 mol L⁻¹ de Tris-base, 0,02 mol L⁻¹ de glicina (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) e 0,1% (m/v) de SDS, resultando em uma solução com pH 8,3. Para cada gel, aplicou-se uma voltagem de 200 V; corrente de 30 mA e potência de 6 W, fornecidos por uma fonte de alimentação (Pharmacia Biotech, modelo EPS 1001).

Para marcação da frente de corrida, adicionou-se, no reservatório superior, algumas gotas de solução 0,05% (m/v) de azul de bromofenol.

3.5.3. Sistema de revelação

Para revelação das proteínas, após a corrida eletroforética, mantiveram-se, a princípio, os géis sob agitação por 1 h em uma solução denominada fixadora, composta por 10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de etanol. Posteriormente, os géis foram mantidos em água deionizada por 30 min, sendo realizada a troca da água a cada 10 min. Por fim, foram imersos em uma solução denominada Coomassie Coloidal composta por 8% (m/v) de sulfato de amônio, 1,6% (v/v) de ácido fosfórico 85% (v/v), 25% (v/v) de metanol e 0,08% (v/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250.

3.5.4. Tratamento de imagens

Após a conclusão da revelação das bandas, os géis foram digitalizados utilizando um digitalizador de imagens (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) e as bandas obtidas analisadas pelo software Gel-Pro Analyser 3.0 (Media Cybernetics, EUA) para estimativa da massa molar de cada banda, bem como obtenção de resultados complementares.

3.6. Avaliação estatística dos dados

Aplicou-se a análise estatística de variância em grupo, comumente denominada ANOVA¹⁴ para análise estatística dos dados. Este teste apresentou-se interessante, pois possibilita avaliar, entre duas ou mais medidas sob diferentes condições, diferenças estatísticas significativas dentro de um determinado intervalo de confiança [92].

Para sua aplicação, deve-se primeiramente determinar a variância (b) de cada amostra, por meio da equação (ix):

$$b = \sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (N - 1) \quad (\text{ix})$$

onde N representa o número de replicas de cada amostra.

Posteriormente, relaciona-se a variância de cada amostra por meio da equação (x):

$$\sigma_0 = \sqrt{\sum_j (b/h)} \quad (\text{x})$$

onde h representa o número de amostras.

Após encontrar a variância do conjunto de dados, σ_0 , pode-se determinar a máxima diferença significativa entre as amostras avaliadas, por meio da equação (xi):

¹⁴ Do inglês: *Analysis of variance*.

$$\sigma_0 \sqrt{(2/N)} \times t_{h(N-1)} \quad (\text{xi})$$

onde $t_{h(N-1)}$ representa o valor t de Student para uma amostra com $N - 1$ graus de liberdade em um dado intervalo de confiança.

Neste trabalho, todas as avaliações estatísticas realizadas utilizaram um intervalo de confiança de 95% ($P = 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sistemas avaliados

4.1.1. Sistemas aplicando Triton[®] X-114 e Triton[®] X-100

4.1.1.1. Otimização da metodologia para quantificação dos teores protéicos

Optou-se por iniciar os estudos utilizando um sistema com baixa complexidade, contendo o surfactante Triton[®] X-114 como agente responsável pela formação do sistema aquoso de duas fases. Dentre as características que podem ser destacadas citam-se a formação de soluções anisotrópicas a 21 °C [93], bem como a ênfase dada pela literatura com relação à ampla aplicabilidade deste tensoativo em diversos sistemas para separação de biomoléculas [37].

Deu-se início aos trabalhos utilizando-se concentrações de surfactante ligeiramente acima do valor de sua CMC, que é de $2,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ou ca. 0,015% (v/v) [93] (para efeito de cálculos considerou-se que o reagente apresenta massa molar média de 536 g mol⁻¹, que corresponde a uma cadeia média contendo 7,5 grupos oxietileno, bem como, densidade de 1,05 g L⁻¹). Desta forma, avaliaram-se tubos com concentrações de surfactante variando entre 0,20

e 0,75% (v/v). As concentrações inferiores não foram adequadas devido ao volume muito reduzido da fase rica (menor que 100 μL). Os resultados obtidos, após quantificação do teor protéico contido na fase pobre, bem como a razão entre as porcentagens dos volumes de fase pobre e de fase rica, podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração protéica obtida na fase pobre, após quantificação da mesma, razão entre as porcentagens relativas aos volumes das fases pobre e rica ($\phi_{\text{FP}}/\phi_{\text{FR}}$), e massa de albumina obtida após a quantificação, para concentrações de surfactante situadas entre 0,20 e 0,75% (v/v) na presença de 1,250 mg de albumina. N = 6.

Triton[®] X-114 % (v/v)	Concentração protéica média obtida na fase pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$\phi_{\text{FP}}/\phi_{\text{FR}}$	Massa de albumina (mg)
0,20	139 \pm 1	24,0	1,334
0,30	143 \pm 4	19,0	1,358
0,50	147 \pm 3	13,3	1,367
0,75	148 \pm 14	11,5	1,361

A partir dos resultados obtidos, após a quantificação da fase pobre por meio da reação de Bradford, realizou-se um balanço de massas, utilizando, para efeito de cálculos, a concentração protéica obtida nesta fase, bem como a relação entre os seus volumes. Pôde-se notar que as concentrações protéicas obtidas, e apresentadas na Tabela 2, forneceram resultados superestimados para todos os tubos avaliados, mesmo considerando que a eficiência de extração para a fase rica fosse de 0%. Tal fato indicava a existência de interferentes durante a quantificação.

A primeira hipótese levantada para justificar a interferência apresentada relaciona-se com uma possível separação incompleta das fases, o que deixaria a fase pobre com uma concentração de surfactante muito superior a CMC. Desta forma, estaria ocorrendo interferência do surfactante durante a quantificação por meio da reação de Bradford [64, 72].

Uma forma de avaliar esta hipótese consistiu na adição de 0,2% (m/v) de NaCl em cada um dos tubos. Assim, a separação de fases se daria de maneira mais efetiva, e no caso de uma provável separação incompleta das fases a adição de sal resolveria o problema. Quantificou-se novamente a fase pobre de todos os tubos, sendo que os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração protéica obtida na fase pobre, após quantificação da mesma, razão entre as porcentagens dos volumes das fases pobre e rica (ϕ_{FP}/ϕ_{FR}) e massa de albumina obtida após a quantificação, para concentrações de surfactante situadas entre 0,20 e 0,75% (v/v) na presença de 0,2% (m/v) de NaCl e 1,250 mg de albumina. N = 6.

Triton® X-114 % (v/v)	Concentração protéica		Massa de albumina (mg)
	média obtida na fase pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ϕ_{FP}/ϕ_{FR}	
0,20	129 \pm 3	24,0	1,238
0,30	170 \pm 3	19,0	1,615
0,50	156 \pm 15	13,3	1,451
0,75	152 \pm 1	11,5	1,398

Avaliando os resultados, pode-se observar que mesmo após a adição de NaCl aos tubos obtinha-se valores superestimados para as concentrações protéicas na fase pobre em surfactante. Desta forma, descarta-se a possibilidade de que a separação de fases não estivesse ocorrendo de maneira efetiva.

A segunda possibilidade para a ocorrência de interferência relaciona-se com o fato do surfactante estar interferindo na reação de Bradford mesmo estando presente em concentrações próximas a CMC. Geralmente, em uma amostra real, utiliza-se tampões desnaturantes que possuem surfactantes em sua composição. No entanto, interferências destas moléculas são eliminadas por diluição da amostra. Para efeito de comparação, uma amostra de plasma sangüíneo humano apresenta uma concentração protéica de *ca.* 45 g L⁻¹ [94], que é muito superior àquela das amostras sintéticas preparadas em laboratório, que possuíam concentração em torno de 0,125 g L⁻¹.

Desta forma, buscou-se otimizar uma metodologia para precipitação e posterior quantificação das frações de cada uma das fases. Avaliaram-se dois agentes precipitantes que são comumente utilizados quando se trabalha com proteínas: acetona [95, 96], na proporção de 3 partes de solvente para 1 parte de amostra (3:1 v/v) e acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol [97], na proporção de 5 partes do agente precipitante para 1 parte de amostra (5:1 v/v).

No entanto, a adição de solventes orgânicos ao meio resultava em um problema; além da precipitação da albumina também ocorria a precipitação de uma fração do surfactante. Primeiramente, buscou-se avaliar se a fração de surfactante precipitado, juntamente com a albumina, continuaria causando interferência durante as determinações. Para tanto, prepararam-se alguns tubos de ensaio contendo apenas tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e Triton[®] X-114 em diversas concentrações, soluções estas, que seriam utilizadas como branco analítico. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Brancos analíticos obtidos, após quantificação das fases pobres, por meio do método de Bradford, para soluções de Triton[®] X-114 com concentrações variando entre 0,5 e 6,0% (v/v) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2, após precipitação utilizando acetona na proporção 3:1 (v/v) ou acetato de amônio em metanol na proporção 5:1 (v/v). N = 10.

Triton [®] X-114 (% - v/v)	Concentração protéica (µg mL ⁻¹)	
	Acetona	Acetato de amônio em metanol
0,5	3 ± 2	5 ± 5
1,0	2 ± 2	0 ± 3
2,0	5 ± 5	0 ± 5
4,0	5 ± 4	10 ± 7
5,0	1 ± 3	18 ± 5
6,0	0 ± 1	8 ± 4

LD – 3,4 µg mL⁻¹; LQ – 11,4 µg mL⁻¹.

Avaliando os dados apresentados na Tabela 4, pôde-se concluir que a concentração de surfactante presente no meio, após a realização da etapa de precipitação, não iria interferir nas determinações. Para alguns tubos, a interferência gerada pelo surfactante resultou em respostas muito próximas aos limites de detecção e quantificação para o método empregado, que são de $3,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $11,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

É amplamente conhecido da literatura [68] que pequenas concentrações de surfactante não causam interferência durante a quantificação pelo método de Bradford, visto que o equilíbrio envolvido na formação do complexo entre as moléculas do corante CBBG e o surfactante não é favorecido. Com a precipitação, atinge-se, então, uma concentração baixa o suficiente para que não ocorra a formação do complexo surfactante-CBBG. Desta forma, as moléculas de tensoativo ficarão apenas dispersas no meio, o que não causará problemas nas análises.

Desta maneira, após garantir que a fração de surfactante precipitada não geraria interferência para as análises, partiu-se para quantificação das fases rica e pobre que foram submetidas aos procedimentos de precipitação propostos. Neste estudo, avaliaram-se tubos contendo concentrações de Triton[®] X-114 de 0,5% (v/v) e 1,0% (v/v). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações protéicas resultantes (conc. total = conc. fase pobre + conc. fase rica), obtidas após a quantificação das fases pobre e rica, submetidas ao procedimento de precipitação com acetona (3:1 v/v) ou acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol (5:1 v/v), para concentrações de Triton X[®]-114 de 0,5 e 1,0% (v/v) e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina. N = 6.

Agente precipitante	Triton[®] X-114 % (v/v)	Concentração protéica total ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
Acetona	0,5	40 ± 5	33
	1,0	27 ± 1	22
Acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol	0,5	123 ± 2	99
	1,0	125 ± 2	101

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5 pode-se notar que a precipitação utilizando a solução de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol proporcionou a precipitação quantitativa das proteínas presentes em ambas às fases, enquanto a utilização de acetona forneceu resultados de recuperação que não ultrapassaram 33%.

Desta forma, optou-se por fazer uso da solução de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol como agente precipitante. Neste caso, além da utilização de um solvente orgânico para induzir a precipitação das proteínas, faz-se uso de um sal para auxiliar neste processo, por meio do fenômeno conhecido como *efeito salting-out*.

Este fenômeno pode ser explicado utilizando a teoria *DLVO* (*Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek*) [98]: quando as proteínas se apresentam em soluções contendo baixas concentrações salinas, interagem por meio de um balanço de forças, que compreendem repulsões Coulombicas e forças atrativas de curto alcance, tais como interações dipolo-dipolo e carga-dipolo, mesmo que estas moléculas protéicas estejam no pH referente ao seu ponto isoelétrico. No entanto, quando se tem um meio com elevadas concentrações salinas, alguns efeitos são observados, podendo-se citar a diminuição do volume livre das proteínas em solução, a redução na solvatação das macromoléculas no meio, em função da coordenação preferencial do solvente (neste caso a água) com os íons do agente precipitante, bem como a neutralização de resíduos laterais das proteínas em função da presença dos íons amônio e acetato. Como resultado da redução das interações proteína-solvente, minimizam-se as repulsões Coulombicas, gerando a atração das moléculas protéicas, o que leva a precipitação das mesmas, num processo auxiliado pelo solvente orgânico, como forma de se manter a maior estabilidade termodinâmica para todo o conjunto [98, 99].

4.1.1.2. Avaliação do sistema utilizando Triton[®] X-114

Tendo otimizado as condições para precipitação e posterior quantificação das proteínas, repetiu-se o estudo de concentração com o surfactante Triton[®] X-114 em tampão fosfato pH 7,2. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação da mesma pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de surfactante situadas no intervalo entre 0,3 e 1,3% (v/v), todos em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,2. N = 6.

Triton [®] X- 114 % (v/v)	Concentração protéica na fase pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
0,3	76 \pm 2	0,61 \pm 0,04
0,5	84 \pm 8	0,45 \pm 0,14
0,7	81 \pm 2	0,50 \pm 0,03
1,0	91 \pm 4	0,34 \pm 0,06
1,3	80 \pm 2	0,53 \pm 0,05

Avaliando as concentrações protéicas contidas na fase pobre em surfactante, pode-se notar que os resultados obtidos variam ao redor de um valor médio de (82 \pm 6) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Não se observou nenhuma tendência significativa relacionada com uma melhora ou piora na eficiência de extração. Desta maneira, optou-se por elevar a concentração de surfactante no meio, para, assim, avaliar a possibilidade de alterar o coeficiente de partição de forma mais significativa.

Realizou-se um novo estudo, onde as concentrações de Triton[®] X-114 variaram entre 0,5 e 6,0% (v/v). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação da mesma, e coeficiente de partição para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de surfactante situadas no intervalo entre 0,5 e 6,0% (v/v), todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. N = 6.

Triton[®] X- 114	Concentração protéica na fase	K
% (v/v)	pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
0,5	78 ± 1	$0,56 \pm 0,01$
1,0	87 ± 5	$0,40 \pm 0,09$
2,0	93 ± 2	$0,31 \pm 0,03$
4,0	101 ± 1	$0,21 \pm 0,01$
6,0	117 ± 2	$0,07 \pm 0,02$

Comparando os dados da Tabela 7 com aqueles apresentados anteriormente na Tabela 6, nota-se que o intervalo de concentrações estudados no início (entre 0,3 e 1,3% v/v) apresentava-se pouco abrangente. Sendo assim, a ampliação da faixa de concentração estudada revelou que o aumento da concentração de Triton[®] X-114 reduz a eficiência de extração de albumina para a fase rica em surfactante. Isto enfatiza o caráter hidrofílico apresentado por esta proteína frente ao meio rico em surfactante, ou seja, elevando a concentração de Triton[®] X-114 no meio, reduz-se a tendência de que a proteína migre para a fase rica em tensoativo.

Sabe-se da literatura [100] que a albumina apresenta tanto domínios hidrofílicos quanto hidrofóbicos. Estes últimos, presentes em menor número, consistem nos principais responsáveis pela interação da proteína com as moléculas de surfactante. No entanto, de acordo com a natureza da molécula de tensoativo utilizado, bem como da concentração, tais regiões podem apresentar maior ou menor disponibilidade para que ocorra a interação proteína-surfactante, resultando em diferentes valores de constantes de associação. A presença de sítios de ligação na porção apolar do tensoativo, bem como a disposição espacial entre as moléculas, podem, por exemplo, resultar em limitações relacionadas com impedimento estérico.

Assim, pode-se concluir, a partir dos dados obtidos, que as interações envolvendo as regiões dos resíduos hidrofóbicos da albumina e o surfactante Triton[®] X-114 não são efetivas o suficiente para proporcionar a interação da proteína com as micelas formadas, justificando a redução de K conforme se aumenta a concentração do agente tensoativo. Como consequência, a albumina permanece na fase pobre em surfactante.

Desta forma, para dar prosseguimento à avaliação dos demais parâmetros analíticos envolvidos neste sistema de extração, optou-se por estudar a condição que utiliza 6,0% (v/v) de surfactante. Com essa condição, garante-se que a totalidade da albumina estará presente em uma única fase (neste caso, a pobre), e numa provável aplicação deste sistema para eliminação da interferência causada pela albumina, a fase rica estaria livre do interferente.

Realizou-se a avaliação do pH do meio, na faixa compreendida entre 6,8 e 8,0. Além disso, o pH 5,0 também foi estudado pelo fato da albumina apresentar ponto isoelétrico próximo a este valor [59]. Os resultados obtidos para este estudo estão apresentados na Figura 11.

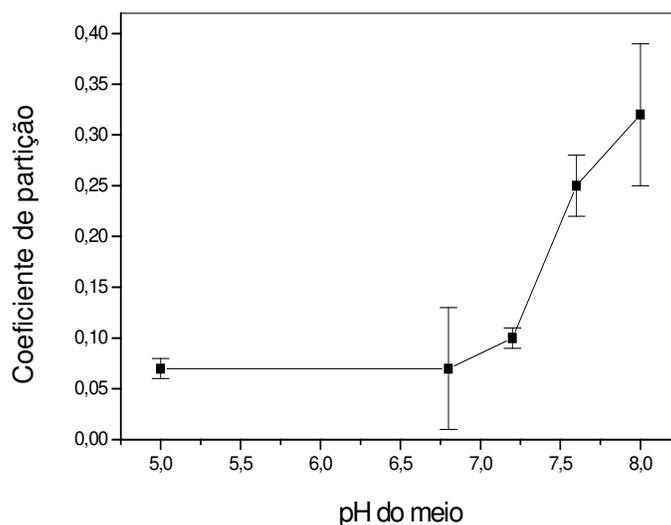


Figura 11. Gráfico representando o coeficiente de partição em função do pH do meio, variando de 5,0 a 8,0, para soluções contendo $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de Triton[®] X-114 6,0% (v/v). Todas as soluções eram tamponadas com tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Avaliando os resultados apresentados no gráfico da Figura 11, pode-se notar uma tendência de aumento na eficiência de extração da albumina para a fase rica em surfactante em função da elevação do pH do meio. De pH 5,0 até o pH 7,2, K não ultrapassa o valor de 0,10, o que corresponde a uma eficiência de extração que se situa em torno de 10%. No entanto, a partir de pH 7,6, pode-se notar um aumento neste valor, onde se obteve um coeficiente de partição máximo de 0,32 para o pH 8,0, representando uma eficiência de extração de ca. 25%.

Como resultado deste estudo, pode-se notar o fato de que a eficiência de remoção da albumina para a fase rica em surfactante não apresenta aumento próximo ao ponto isoelétrico da albumina (em pH próximo de 5,0). Esperava-se que próximo deste pH a solubilidade da molécula protéica fosse reduzida, em função de sua carga líquida ser igual a zero. Como conseqüência, seriam geradas condições que favoreceriam a migração das moléculas protéicas para o interior hidrofóbico das micelas. Isto se apresenta como indicativo de que os agregados micelares formados não apresentavam dimensões mínimas para possibilitar o englobamento da albumina em seus interiores hidrofóbicos.

Por outro lado, a elevação da eficiência de extração para valores de pH maiores que 7,2 pode ser justificada em termos da presença de interações eletrostáticas, do tipo íon-dipolo, envolvendo as moléculas de proteína, que nestas condições apresentam excesso de carga negativa, e os grupamentos oxietileno do surfactante. Sabe-se, da literatura [101, 102], que a extração de proteínas utilizando polímeros e co-polímeros contendo grupamentos oxietileno em sua estrutura, bem como outros grupos funcionais, pode ser modulada alterando-se o tamanho da cadeia polimérica, bem como por meio da alteração do pH do meio, fatores que evidenciam a existência de tais interações e podem ser aplicados ao sistema em questão.

Também não se pode deixar de mencionar uma possível mudança conformacional da proteína em pH próximo a 8,0, que resultaria na exposição de seus resíduos para o exterior, facilitando a interação com o surfactante.

Avaliou-se, também, a questão do tempo de contato entre proteína e surfactante utilizando o sistema com as seguintes características: 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de

albumina e 6,0% (v/v) de Triton[®] X-114, todos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. O intervalo avaliado situou-se entre 10 e 50 minutos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 12.

Nota-se, após aplicação do teste estatístico ANOVA, que não há diferença estatística significativa para os valores de K obtidos. No entanto, não se pode deixar de comentar o perfil apresentado pela curva da Figura 12, onde se observa um decréscimo na eficiência de extração para a fase rica e posteriormente uma elevação neste valor.

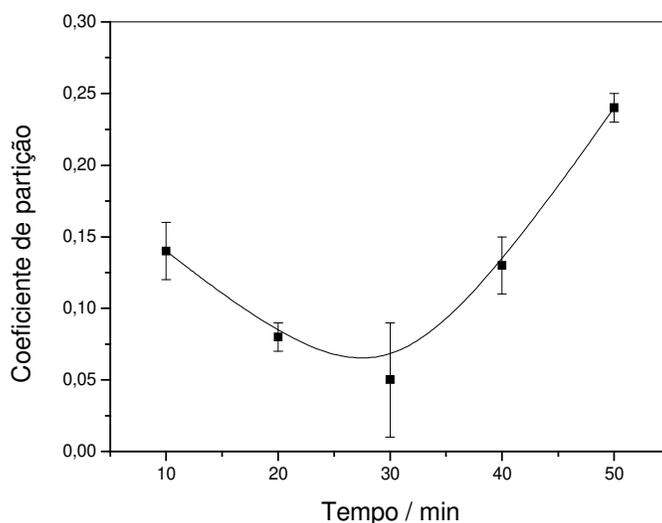


Figura 12. Gráfico representando a razão de distribuição em função do tempo de contato para soluções contendo 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de Triton[®] X-114 6,0% (v/v), utilizando tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. A linha apresentada na figura serve apenas como guia.

Uma possível justificativa para este comportamento pode estar relacionada com a dinâmica do sistema ao longo do tempo e, para tanto, algumas considerações serão realizadas.

A literatura apresenta dados [103, 104] que relacionam a adsorção de proteínas em superfícies onde se realizou a imobilização controlada de cadeias contendo grupamentos oxietileno. Pode-se observar nestes trabalhos que o aumento da densidade destas cadeias, em um determinado volume, leva à redução na adsorção de proteínas devido a dois fatores principais: o primeiro deles está relacionado com a repulsão estérica, que aumenta em virtude do maior

empacotamento das cadeias, enquanto o segundo está relacionado com a ausência de interações efetivas, tais como as interações eletrostáticas, envolvendo as proteínas e os grupos oxietileno [105].

Utilizando estas informações, pode-se pensar no sistema em questão. Quando se mantêm os tubos termostatizados, na temperatura de formação do ponto nuvem, ocorre a separação de fases de forma bastante lenta e gradual. Como conseqüência, os agregados apresentarão a tendência de se reorganizarem no meio: em virtude da desidratação dos grupos oxietileno ocorrerá uma contração da porção hidrofóbica do surfactante, que levará a um maior empacotamento das cadeias de tensoativo, conduzindo a uma maior densidade destas cadeias à medida que a fase rica em surfactante vai sendo formada (as micelas vão se agrupando). Conseqüentemente, tem-se prejudicada a interação envolvendo albumina e Triton[®] X-114, fazendo com que a proteína seja deslocada para a fase pobre em surfactante.

No entanto, posteriormente, observa-se um aumento gradual na eficiência de extração (obtêm-se valores maiores para as razões de distribuição). Neste caso, poderia estar ocorrendo a migração da albumina para a fase pobre em surfactante ao longo do tempo, ou uma maior concentração da proteína na interface entre as duas fases recém formadas. Sabe-se que as proteínas tendem a se organizar na interface entre dois líquidos, formando uma camada que tende a separar estes dois filmes [106], com comportamento que apresenta uma dinâmica totalmente particular e se assemelha bastante ao de um surfactante, conduzindo a alterações nas propriedades reológicas do sistema ao longo do tempo [107, 108].

4.1.1.3. Avaliação do sistema utilizando Triton[®] X-100

A avaliação do sistema utilizando Triton[®] X-100 só se fez possível por meio da utilização de agentes responsáveis pela redução do ponto nuvem, uma vez que a separação de fases não se dá próximo à temperatura ambiente. Um aspecto relevante que vale a pena ser citado relaciona-se com a temperatura de turvação para soluções de Triton[®] X-100 que não receberam a adição do sal: como as

amostras eram preparadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, podia-se observar a redução do ponto nuvem, para soluções contendo 1,0% (v/v) do surfactante, de $67 \text{ }^\circ\text{C}$ [21] para $60 \text{ }^\circ\text{C}$, devido à presença de íons como K^+ e HPO_4^{2-} .

Desta forma, avaliou-se o comportamento de diversos eletrólitos e co-surfactantes frente a soluções contendo $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina e 1,0% (v/v) de Triton[®] X-100 em tampão fosfato pH 7,2.

Dentre os aditivos analisados, aqueles que apresentaram reduções nas temperaturas de ponto nuvem, mesmo que pouco significativas, são apresentados na Figura 13.

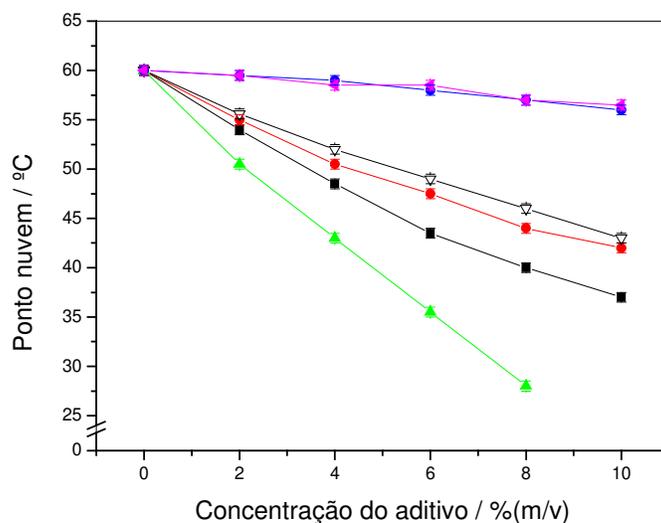


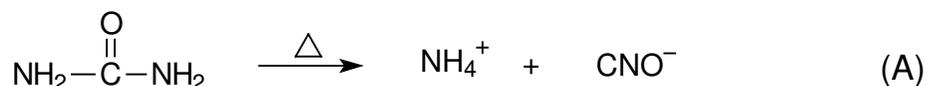
Figura 13. Gráfico apresentando o ponto nuvem em função da concentração de diferentes aditivos: \blacksquare NaCl; \bullet $\text{CH}_2\text{CO}_2(\text{NH}_4)$; \blacktriangle $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; ∇ KCl; \bullet NaNO_3 ; \blacklozenge sacarose, para soluções contendo $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina, 1,0% (v/v) de Triton[®] X-100, todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2.

Além dos sais apresentados na Figura 13, outros compostos também foram avaliados, mas não se obteve sucesso na redução do ponto nuvem. Dentre estes compostos encontram-se o cloreto de cálcio e acetato de bário. Pôde-se observar a presença de sólido nos tubos após a adição destes sais, o que evidencia a precipitação do surfactante, uma vez que a literatura apresenta dados que indicam que tais compostos são solúveis em água nas concentrações avaliadas (no caso do cloreto de cálcio a solubilidade é de $45,3 \text{ g}$ de sal para 100 g de água a $25 \text{ }^\circ\text{C}$

[109] e para o acetato de bário é de 78,1 g de sal para 100 g de água a 24,1°C [109]).

Outro eletrólito avaliado foi o nitrato de alumínio. Neste caso, pode-se observar que este sal apresenta um efeito contrário ao desejado, ou seja, eleva o ponto nuvem da solução. Devido a limitações no equipamento utilizado, os tubos contendo este sal não foram submetidos a temperaturas superiores a 66 °C. No entanto, pôde-se notar que, as soluções contendo entre 1,0 e 10,0% (m/v) do referido sal não proporcionaram a formação de solução anisotrópica. Neste caso, observa-se o fenômeno reportado na literatura como “efeito salting-in” [22]: o ânion utilizado (nitrato) apresenta-se como uma base mole. Como consequência, tem baixa eletronegatividade e alta polarizabilidade, o que favorece o rompimento das ligações de hidrogênio que são responsáveis pela auto-associação das moléculas de água numa espécie de rede. Como consequência, as moléculas de água se encontram “livres” para que possam interagir com os grupamentos oxietileno do surfactante, tendo a possibilidade de hidratá-los de maneira mais efetiva, resultando no aumento do ponto nuvem.

Outro reagente utilizado foi a uréia, que, neste caso, atuaria como co-surfactante. No entanto, só poderia ser aplicada caso não fosse necessário realizar o aquecimento intenso da amostra, uma vez que este composto sofre decomposição a altas temperaturas, num processo onde ocorre a formação de íons cianato [110], de acordo com a equação química A.



Dentre os compostos apresentados na Figura 13, a sacarose apresentou-se pouco efetiva para a redução do ponto nuvem, havendo uma redução de ca. 3,5 °C para soluções contendo 10,0% (m/v) do referido açúcar como consequência da desidratação dos grupos oxietileno em função da introdução de hexoses e pentoses ao meio. Tais moléculas apresentam hidroxilas, que necessitam de hidratação e deixam as moléculas de água menos disponíveis para interação com a região hidrofílica do surfactante.

Com relação aos sais avaliados, observa-se que o sulfato de amônio foi aquele que apresentou os melhores resultados. Com a concentração de 8,0% (m/v), obteve-se o ponto nuvem a 28 °C. Este e feito pode ser justificado devido à característica cosmotrópica dos íons sulfato, ou seja, este é um íon fortemente hidratável.

Para avaliar esta questão de maneira qualitativa, pode-se comparar o comportamento dos íons sulfato frente a outro ânion, tal como o íon acetato. Com os dados da Figura 13, observa-se que mantendo fixo o cátion (íon amônio) e alterando o ânion (passando de sulfato para acetato), têm uma perda na eficiência para que ocorra a redução no ponto nuvem, o que demonstra o caráter altamente cosmotrópico dos íons sulfato.

O grande problema para aplicação, em uma amostra real, do sistema que apresenta alta concentração de SO_4^{2-} , relaciona-se com o fato deste ânion poder causar a precipitação indesejada das proteínas, o que impossibilitaria a separação. Esta hipótese não pode ser descartada, visto que, em alguns casos, o sulfato de amônio é aplicado como agente precipitante de proteínas [111]. Além disso, concentrações superiores a 8,0% (m/v) resultavam na precipitação do tensoativo, inviabilizando a sua aplicação.

Outra informação que pode ser extraída dos dados apresentados na Figura 13 relaciona-se com o fato dos cátions influenciarem de maneira menos significativa no ponto nuvem. Diversos trabalhos da literatura [22, 23] mostram esta tendência. Isto pode ser observado quando se avalia cloreto de sódio ou cloreto de potássio como agente que irá promover a redução do ponto nuvem. Observa-se que quando se utiliza o sódio, a eficiência na redução do ponto nuvem é mais efetiva frente ao potássio (cerca de 5 °C para soluções 10,0% v/v). O caráter cosmotrópico mais acentuado deste íon [112] justifica-se por meio da razão massa/carga de cada um dos elementos, característica refletida em seus raios hidratados.

Por fim, pode-se observar o comportamento do nitrato de sódio. Nota-se que a eficiência para redução da temperatura de ponto nuvem utilizando este sal é

bastante reduzida. Neste caso, a redução pode ser creditada aos íons sódio, uma vez que íons nitrato também apresentam caráter ligeiramente caotrópico [22].

Desta forma, optou-se por continuar avaliando sistemas que utilizavam 8,0% (m/v) de sulfato de amônio como eletrólito para promover a redução do ponto nuvem, pois possibilitou a separação de fases à temperatura inferior a 30 °C.

Um aspecto que pode ser mencionado relaciona-se com a etapa final do processo de extração. Neste caso, o coacervato não era a fase rica em surfactante, mas sim a fase pobre. Esta inversão, comparada ao sistema que utiliza Triton[®] X-114, é justificada pelo fato da adição de eletrólitos elevar a densidade da água, fazendo com que a fase pobre apresente densidade ligeiramente superior à da fase rica (ca. 1,07 g mL⁻¹). Este fato também justifica a dificuldade para que a separação de fases ocorra: após a adição de eletrólitos, a densidade resultante da fase pobre em surfactante apresentava-se muito próxima da densidade da fase rica. Desta forma, necessita-se utilizar uma ultracentrífuga para que o processo de coacervação se de por completo.

Passou-se a estudar a questão da concentração de surfactante no meio. No caso do Triton[®] X-100, avaliou-se o intervalo de concentrações compreendido entre 3,0 e 7,0% (v/v). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8

Tabela 8. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação da mesma e coeficiente de partição para soluções com concentrações de 125 µg mL⁻¹, Triton[®] X-100 situadas no intervalo entre 3,0 e 7,0% (v/v) e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todas em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 7,2. N = 6.

Triton[®] X- 100	Concentração protéica na fase	K
% (v/v)	pobre (µg mL⁻¹)	
3,0	103 ± 1	0,18 ± 0,01
4,0	112 ± 1	0,09 ± 0,01
5,0	105 ± 3	0,16 ± 0,03
6,0	120 ± 5	0,02 ± 0,04
7,0	111 ± 3	0,10 ± 0,03

De maneira distinta ao sistema que utiliza Triton[®] X-114, quando se avaliam os dados da Tabela 8 para Triton[®] X-100, não se observa nenhuma tendência ou variação estatística significativa para o coeficiente de partição, à medida que se varia a concentração do surfactante. Observa-se que os teores protéicos quantificados na fase pobre situam-se em torno de um valor médio de $(110 \pm 7) \mu\text{g mL}^{-1}$.

É difícil realizar uma correlação entre os dois sistemas compostos por surfactante da classe dos Triton[®], uma vez que os mesmos apresentam composições distintas. No entanto, pode-se dizer que o aumento do número de grupos oxietileno em duas unidades é ineficiente para aumentar a extração de albumina para a fase rica em tensoativo.

Após observar a pequena influência da concentração do surfactante Triton[®] X-100 no processo, optou-se por prosseguir os trabalhos utilizando sua concentração em 3,0% (v/v).

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos com a realização de um experimento para avaliar a influência do pH do meio na extração.

Tabela 9. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina, 3,0% (v/v) de Triton[®] X-100 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH variando na faixa entre 5,0 e 7,6. N = 6.

pH do meio	Concentração protéica na fase	
	pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
5,0	117 ± 5	$0,04 \pm 0,04$
6,4	116 ± 10	$0,05 \pm 0,19$
6,8	123 ± 10	$0,00 \pm 0,08$
7,2	130 ± 7	ca. 0,00
7,6	126 ± 4	ca. 0,00

Novamente, observando os dados apresentados na Tabela 9, pode-se constatar que praticamente não existe influência do pH na extração de albumina.

Assim como foi observado com o Triton[®] X-114, o aumento da hidrofobicidade da proteína em pH 5,0 não foi suficiente para deixá-la na fase rica em surfactante.

Um aspecto interessante que pode ser observado com este sistema relaciona-se com sua reprodutibilidade. Observa-se uma variação nos resultados obtidos que em alguns casos atinge ca. 9%, justificando valores de razão de distribuição negativos, mas próximos de zero.

Por fim, realizou-se o estudo de tempo de contato entre a proteína e o surfactante. Neste caso, as condições utilizadas foram tubos contendo $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina, 3,0% (v/v) de Triton[®] X-100 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,4. A Figura 14 apresenta os resultados obtidos.

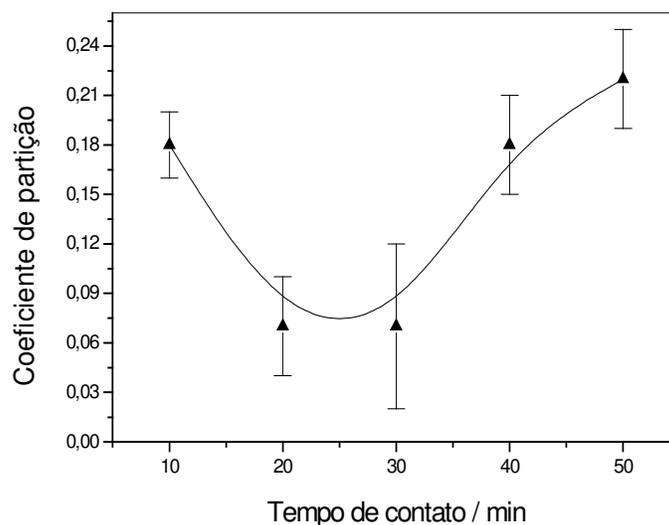


Figura 14. Gráfico representando o coeficiente de partição em função do tempo de contato para soluções contendo $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de 3,0% (v/v) Triton[®] X-100 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, utilizando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 6,4. A linha apresentada na figura serve apenas como guia.

Os resultados obtidos após a avaliação do tempo de contato para o sistema que utiliza Triton[®] X-100 revelam que as diferenças nos teores protéicos das fases, ao longo do tempo, são muito pequenas e novamente não apresentam diferenças estatísticas significativas quando se realiza análise de variância em grupo. No entanto, pode-se notar que o perfil da curva obtida assemelha-se bastante àquelas encontradas para o sistema que utiliza Triton[®] X-114, reforçando

a hipótese de que a dinâmica das proteínas em solução esteja causando esta pequena variação na concentração protéica das fases ao longo do tempo.

4.1.1.4. Estimativa dos raios das micelas para os sistemas Triton[®] X-114 e Triton[®] X-100 empregando os valores de K

Para avaliação da influência das dimensões dos agregados na extração de proteínas, buscou-se correlacionar os coeficientes de partição obtidos com o raio estimado das micelas formadas em solução. Aplicaram-se as equações (ii) e (iii) descritas anteriormente para o sistema contendo Triton[®] X-100 a 3,0% (v/v) (ca. 0,03 g de surfactante por grama de água) na presença de 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, em pH 7,2 ($\bar{K} = 0,18$).

Assim, considerando a formação de micelas esféricas, obtêm-se agregados apresentando raio com ca. 70 Å. A literatura apresenta diversos estudos [52, 113, 114] envolvendo o surfactante em questão, sendo que alguns modelos teóricos são propostos para cálculo do raio das micelas formadas. Robson e Dennis [52] estimaram o raio para micelas esféricas formadas em uma solução de Triton[®] X-100 contendo 0,8 g de surfactante para cada grama de água e obtiveram um valor de 43 Å, que é inferior ao valor calculado. Esta variação pode ser justificada em termos da alta concentração de eletrólitos adicionada ao meio, possibilitando maior compactação dos monômeros de surfactante, levando a formação de estruturas com características mais próximas a de micelas cilíndricas e não mais esféricas.

Considerando, agora, a formação de micelas cilíndricas, obtêm-se um agregado com raio de ca. 42 Å justificando os baixos valores obtidos para os coeficientes de partição, onde a eficiência máxima de extração não ultrapassou 9%; como o raio da micela apresenta 42 Å, seu interior hidrofóbico apresentará um raio ainda menor (para uma micela esférica de 42 Å, este valor não ultrapassa 23 Å [52]), indicando a impossibilidade para que a molécula de albumina, que

apresenta um raio hidrodinâmico de 36 Å [2], seja englobada no interior da estrutura formada.

Da mesma forma, realizou-se uma estimativa para o raio das micelas utilizando o sistema Triton[®] X-114, para tubos contendo 4,0% (v/v) do surfactante ($\bar{K} = 0,21$). Obtiveram-se os valores de 65 Å considerando a formação de micelas esféricas e 39 Å no caso da formação de micelas cilíndricas. No entanto, a formação de micelas esféricas apresenta-se pouco provável, uma vez que o meio apresenta elevada concentração de tensoativo. Assim, o raio de 39 Å também justifica os baixos valores de coeficiente de partição obtidos, em função da proteína não migrar para o interior da micela.

Tais dados complementam os resultados obtidos até este momento, uma vez que mostram que a interação envolvendo proteína-surfactante não é o único fator que influi no processo de extração. Neste caso, a dimensão dos agregados também tem influência significativa neste processo.

4.1.2. Avaliação do sistema utilizando Brij[®] 35 e Triton[®] X-114

Na tentativa de aplicar um tensoativo contendo um maior número de grupos oxietileno para possibilitar interações mais efetivas com os agregados formados, passou-se a aplicar o surfactante BRIJ[®] 35. No entanto, o ponto nuvem para este surfactante é bastante alto (próximo de 100 °C para soluções com concentrações variando entre 1,0% e 6,0% m/v [53]). Desta forma, propôs-se um sistema utilizando Brij[®] 35 em conjunto com Triton[®] X-114 para proporcionar a formação de micelas com características híbridas de ambos os tensoativos. Para iniciar o estudo, fixou-se a concentração de Triton[®] X-114 em 1,0% (v/v) e passou-se a variar a concentração de Brij[®] 35, observando as temperaturas de separação de fases obtidas. O gráfico apresentado na Figura 15 apresenta os resultados obtidos.

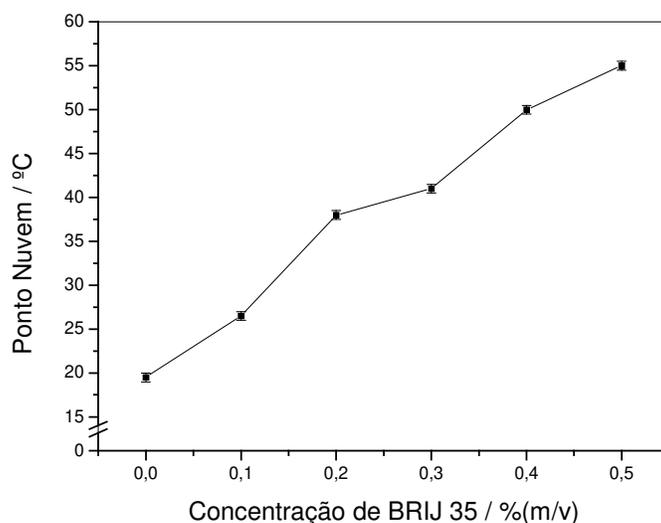


Figura 15. Gráfico apresentado o ponto nuvem para a mistura Triton[®] X-114 e Brij[®] 35 em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2, na presença de 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina em função da concentração de Brij[®] 35, mantendo-se fixa em 1,0% (v/v) a concentração de Triton[®] X-114.

Observando os dados apresentados na Figura 15, pode-se notar que o aumento da concentração de Brij[®] 35 de 0 a 0,5% (v/v) elevou o ponto nuvem de 19,5 °C para 55 °C. Optou-se por trabalhar com a mistura contendo 1,0% (v/v) de Triton[®] X-114 e 0,5% (v/v) Brij[®] 35 (cuja razão molar Brij[®] 35 / Triton[®] X-114 era de 0,23). Embora o ponto nuvem para esta mistura fosse de 55 °C, ela apresentava a maior proporção de Brij[®] 35 na composição das micelas. Logo foi escolhida para dar prosseguimento à avaliação deste sistema por dois motivos: o primeiro consiste no fato de que agregados compostos somente por Triton[®] X-114 já haviam sido testados anteriormente, enquanto o segundo relaciona-se com possibilidade de redução do ponto nuvem mediante utilização de sulfato de amônio, como pôde ser observado para os experimentos realizados com o sistema aplicando Triton[®] X-100. Desta forma, houve a necessidade de reduzir o ponto nuvem por meio da utilização de eletrólitos. Neste caso, optou-se por utilizar o sulfato de amônio, sal que se apresentou mais eficiente para este fim nos testes anteriores.

O gráfico apresentado na Figura 16 mostra a ocorrência de ponto nuvem com a adição do eletrólito.

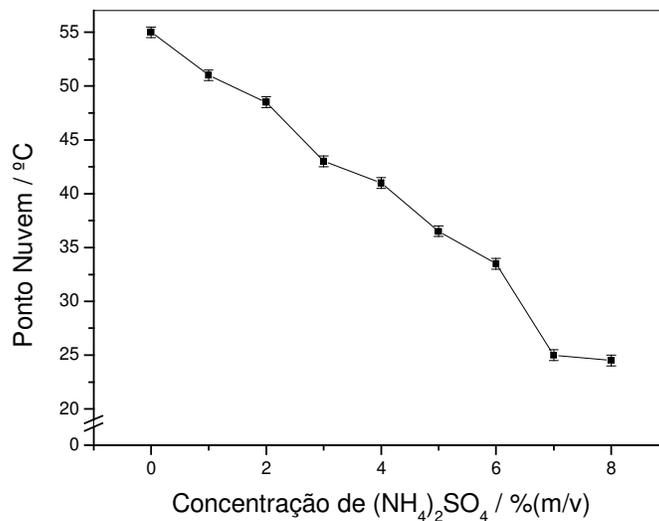


Figura 16. Gráfico de ocorrência do ponto nuvem em função da concentração de sulfato de amônio exibindo a redução na temperatura de separação de fases à medida que se eleva a concentração do eletrólito, para o sistema contendo a mistura de 1,0% (v/v) Triton[®] X-114 e 0,5% (m/v) Brij[®] 35 na presença de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2.

Pode-se observar que a adição de 8,0% (m/v) de sulfato de amônio reduziu a temperatura de turvação para *ca.* $24,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, adequando o sistema para que se pudesse trabalhar em uma temperatura biocompatível. Esta condição foi, então, empregada para realização de um estudo de pH. Neste caso, a faixa estudada situou-se entre 5,0 e 7,6, sendo que os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

Novamente, pôde-se observar que a questão do pH não apresenta relevância significativa no processo de extração utilizando sistemas aquosos de duas fases quando se emprega surfactantes não-iônicos. Os valores obtidos para as concentrações protéicas variaram ao redor de um valor médio de $(101 \pm 9) \mu\text{g mL}^{-1}$, o que representa uma eficiência de extração de *ca.* 20%.

Tabela 10. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina; 1,0% (v/v) de Triton[®] X-114; 0,5% (v/v) de Brij[®] 35 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH compreendido entre 5,0 e 7,6. N = 6.

pH do meio	Concentração protéica na fase	
	pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
5,0	108 ± 4	$0,13 \pm 0,04$
6,4	88 ± 3	$0,39 \pm 0,05$
6,8	102 ± 4	$0,19 \pm 0,05$
7,2	98 ± 4	$0,24 \pm 0,05$
7,6	110 ± 2	$0,11 \pm 0,02$

Mesmo assim, para estudos avaliando tempo de contato entre proteína e surfactante, optou-se por utilizar o sistema empregando tampão fosfato em pH 6,4 (pois se obteve o maior valor de K). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido no estudo de tempo de contato para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e 1,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 0,5% (m/v) de Brij[®] 35 e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,4. N = 6.

Tempo de contato (min)	Concentração protéica na fase	
	pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
10	88 ± 3	$0,39 \pm 0,05$
20	82 ± 5	$0,56 \pm 0,08$
30	77 ± 2	$0,62 \pm 0,05$
40	82 ± 1	$0,52 \pm 0,02$
50	77 ± 9	$0,6 \pm 0,2$
60	82 ± 4	$0,53 \pm 0,08$

Pode-se observar que trabalhando em pH 6,4 obtêm-se valores de K estatisticamente iguais, com um valor médio para a concentração protéica presente na fase pobre de $(81 \pm 4) \mu\text{g mL}^{-1}$, o que representa uma eficiência de extração situada entre 30 e 38%.

Pode-se justificar este aumento na eficiência de extração, frente aos sistemas compostos apenas pelos surfactantes da família Triton[®] devido a possível interação da albumina com os grupamentos oxietileno das moléculas de Brij[®] 35, tendo-se um ótimo em pH 6,4. Não se pode desprezar o fato de que este surfactante apresenta 23 grupamentos oxietileno, razão pela qual foi escolhido para o estudo, o que possibilita a formação de interações mais efetivas envolvendo micelas e as proteínas.

Mesmo com a possibilidade de maior interação entre proteínas e micelas, a dinâmica destes agregados em solução também deve ser considerada para justificar os baixos valores de extração obtidos. As micelas formadas, neste caso, apresentam comportamento totalmente distinto quando comparadas ao sistema que utiliza apenas Triton[®] X-114 [115]. Como exemplo, surfactantes da família BRIJ[®] não apresentam nenhum grupamento fenila em sua cadeia, o que poderia acarretar em uma redução no número de sítios de ligação com regiões hidrofóbicas das proteínas [116]. No entanto, a ausência deste grupamento faz com que sua cadeia de hidrocarbonetos apresente maior mobilidade conformacional, podendo facilitar as interações com determinadas regiões da proteína. Assim, não basta apenas considerar a dimensão das cadeias de surfactantes; deve-se, também, levar em conta a dinâmica micelar presente no meio.

4.1.3. Avaliação do sistema utilizando Tween[®] 80 e Triton[®] X-114

A complexidade estrutural apresentada pela molécula de Tween[®] 80 pode ser interessante pelo fato de promover, de maneira mais efetiva, a interação envolvendo albumina e micelas. No entanto, esta complexidade possui um ponto

negativo, uma vez que implica em regiões da molécula que também podem interagir com o solvente (água), elevando o seu ponto nuvem para 66 °C.

Desta forma, partiu-se para utilização de uma mistura contendo Tween[®] 80 e Triton[®] X-114. Novamente, o Triton[®] atuaria como agente responsável pela redução do ponto nuvem de maneira mais pronunciada, possibilitando a formação de um sistema no qual a separação de fases ocorresse sob condições compatíveis do ponto de vista biológico.

Realizou-se um estudo no qual a concentração de Triton[®] X-114 foi mantida constante em 1,0% (v/v), enquanto a concentração de Tween[®] 80 variou no intervalo de 0,1 a 0,5% (v/v). O gráfico da Figura 17 apresenta os resultados para este estudo.

Como esperado, pôde-se observar que a adição de Tween[®] 80 às soluções contendo 1,0% (v/v) de Triton[®] X-114 resulta na elevação do ponto nuvem. Para misturas nas quais se realizou a adição de 0,5% (v/v) do surfactante Tween[®] 80 obtêm-se a turvação da solução a *ca.* 43 °C, em virtude das micelas formadas apresentarem características mais pronunciadas do surfactante Tween[®] 80.

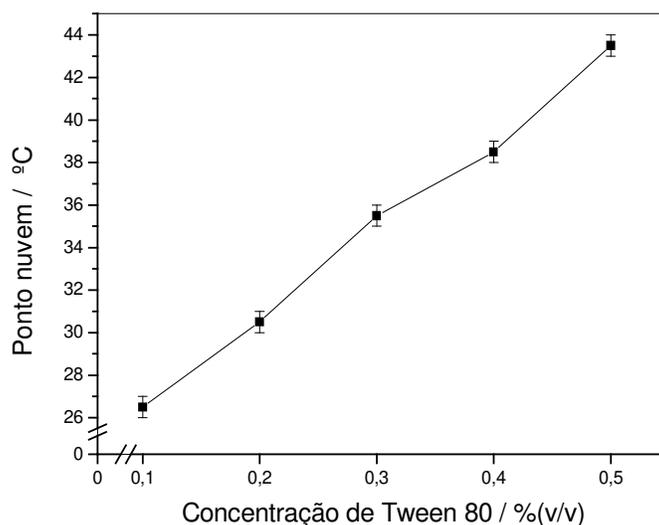


Figura 17. Gráfico apresentando o ponto nuvem em função da concentração de Tween[®] 80, mantendo fixa para todos os tubos a concentração de Triton[®] X-114 em 1,0% (v/v) na presença de 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina, todos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2.

Para prosseguir avaliando o comportamento do sistema contendo a mistura entre os dois surfactantes, optou-se por utilizar aquela que apresentou a maior proporção estudada de Tween[®] 80, que consistiu na mistura 0,5% (v/v) Tween[®] 80 e 1,0% (v/v) Triton[®] X-114.

Passou-se a avaliar o ponto nuvem para diferentes concentrações das misturas de surfactantes, mantendo-se fixa a proporção entre eles. Segundo dados da Tabela 12, pôde-se observar que a alteração na concentração dos tensoativos, mantendo-se fixa a proporção entre eles, não resultou em alterações na temperatura em que ocorreu a turvação das soluções, com valores de ponto nuvem que puderam ser considerados estatisticamente iguais.

Tabela 12. Ponto nuvem para soluções contendo Triton[®] X-114 e Tween[®] 80 em diferentes proporções, mantendo-se fixa a proporção entre os mesmos.

Mistura de surfactantes	Ponto nuvem / °C
1,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 0,5% (v/v) Tween [®] 80	43,5 ± 0,5
2,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 1,0% (v/v) Tween [®] 80	44,5 ± 0,5
3,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 1,5% (v/v) Tween [®] 80	44,5 ± 0,5
4,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 2,0% (v/v) Tween [®] 80	44,0 ± 0,5

Assim, para as quatro condições apresentadas na Tabela 12, realizou-se um estudo avaliando a redução do ponto nuvem frente à adição de eletrólitos. Para tanto, utilizou-se o cloreto de sódio. O resultado obtido é apresentado no gráfico da Figura 18.

Observando-se o perfil de redução do ponto nuvem, nota-se uma diminuição na temperatura de turvação, semelhante para todas as soluções, reforçando a idéia de que para todas as concentrações estudadas têm-se sistemas com agregados micelares semelhantes.

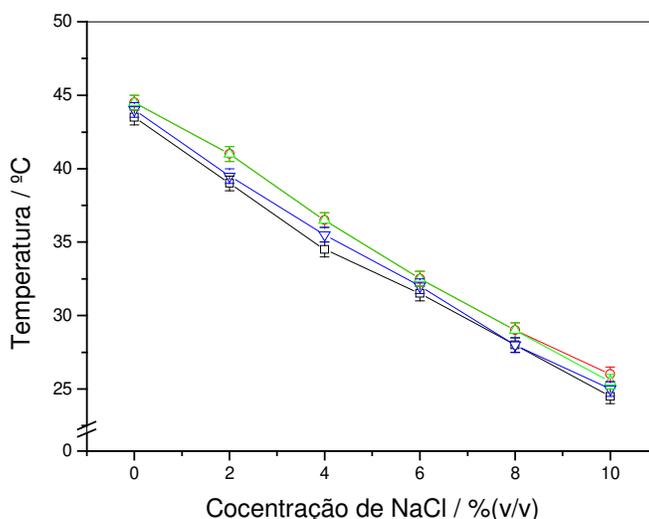


Figura 18. Gráfico apresentando o ponto nuvem em função da concentração de cloreto de sódio, para soluções contendo Triton[®] X-114 / Tween[®] 80 nas respectivas proporções: —□— 1,0% (v/v) / 0,5% (v/v); —○— 2,0% (v/v) / 1,0% (v/v); —△— 3,0% (v/v) / 1,5% (v/v); —▽— 4,0% (v/v) / 2,0% (v/v). Todas as soluções encontram-se na presença de 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina e tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2.

Outro aspecto que deve ser mencionado relaciona-se com o fato deste estudo ter sido conduzido utilizando cloreto de sódio como eletrólito e não o sulfato de amônio. A aplicação de NaCl apresenta um ponto positivo, que se relaciona com o fato deste sal apresentar um comportamento “menos agressivo” frente a amostras reais, no sentido de não gerar uma possível precipitação indesejada das proteínas durante o processo de extração, uma vez que os íons deste sal apresentam menor capacidade para neutralizar cargas de resíduos laterais de proteínas, minimizando problemas de precipitação indesejada.

Assim, passou-se a avaliar as soluções com as concentrações indicadas, anteriormente, na Tabela 12, mas com a adição de 10,0% (m/v) de NaCl em cada um. Neste caso, a formação do ponto nuvem situa-se no intervalo de temperatura de 24,5 a 26,0 °C. A Figura 19 traz os resultados obtidos para este estudo.

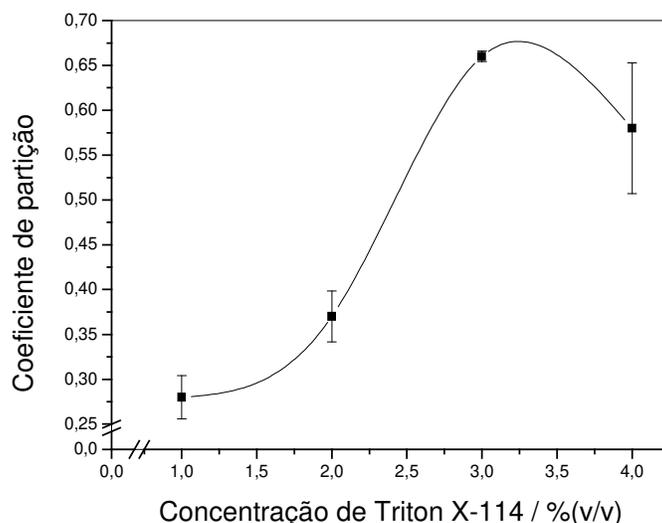


Figura 19. Gráfico apresentando o coeficiente de partição em função da concentração de Triton[®] X-114 para soluções contendo misturas dos tensoativos Triton[®] X-114 e Tween[®] 80, de acordo com as proporções apresentadas na Tabela 12, na presença de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina, 10,0% (m/v) de cloreto de sódio, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,2.

Pelo resultado apresentado no gráfico da Figura 19, observa-se um aumento na eficiência de extração da albumina para a fase rica em surfactante de 22% para ca. 37% à medida que a proporção total da mistura Triton[®] X-114 / Tween[®] 80 sofre acréscimo de 1,0% (v/v) / 0,5% (v/v) para 4,0% (v/v) / 2,0% (v/v), respectivamente.

De maneira distinta ao sistema contendo apenas Triton[®] X-114, no qual o aumento na concentração do agente tensoativo resultou na redução dos valores de coeficiente de partição, a presença de Tween[®] 80, em concentrações crescentes, implica na inserção de uma série de grupamentos que possibilitam a interação efetiva com resíduos laterais de aminoácidos que compõem a albumina.

O grupamento que apresenta maior influência neste processo continua sendo os grupos oxietileno. Tais estruturas também podem se apresentar na forma do íon oxônio, em menor proporção, mas em ambos os casos interagem com as proteínas via ligações de hidrogênio [117]. Outros grupamentos que também estão presentes e que podem contribuir para aumentar a eficiência de

extração consistem em carbonilas e elétrons localizados em sistemas π , também presentes na molécula de Tween[®] 80 [117].

Para avaliar se o pH do meio seria capaz de elevar a eficiência de extração, optou-se por prosseguir o trabalho com a condição que proporcionou a maior extração de proteína para a fase rica em surfactante, que neste caso consistia em soluções contendo 3,0% (v/v) de Triton[®] X-114 e 1,5% (v/v) de Tween[®] 80 na presença de 10,0% (m/v) de NaCl. A Tabela 13 apresenta os resultados do estudo, que foi realizado no intervalo de pH situado entre 5,0 e 7,6.

Tabela 13. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação da mesma pelo método de Bradford, e seus respectivos coeficientes de partição, para soluções com concentrações de 3,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 1,5% (v/v) de Tween[®] 80, 10,0% (m/v) de NaCl e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH variando entre 5,0 e 7,6. N = 6.

pH do meio	Concentração protéica na fase	
	pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
5,0	88 \pm 15	0,46 \pm 0,08
6,4	71 \pm 10	0,77 \pm 0,07
6,8	84 \pm 5	0,50 \pm 0,02
7,2	76 \pm 1	0,66 \pm 0,01
7,6	86 \pm 8	0,47 \pm 0,04

Observa-se que a alteração do pH do meio não resultou em nenhuma tendência estatisticamente significativa para a extração de proteínas nas diferentes condições avaliadas, obtendo-se um sistema onde a eficiência de extração para a fase rica em surfactante situou-se em torno de 35%. Assim como observado nos sistemas apresentados anteriormente, que utilizavam apenas surfactantes não-iônicos ou misturas de surfactantes não-iônicos, nota-se que o pH não apresenta influencia sobre o processo de extração. Neste caso, ocorrem apenas alterações na carga líquida da proteína, o que não é suficiente para que estas interajam de maneira mais efetiva com as micelas formadas.

O tempo de contato entre proteínas e micelas também foi outro ponto avaliado. Os resultados obtidos para este estudo são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição, obtidos no estudo de tempo de contato para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de 3,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 1,5% (v/v) de Tween[®] 80 e 10,0% (m/v) de NaCl, todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 foram avaliados. N =6.

Tempo de contato (min)	Concentração protéica na fase pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
10	93 ± 9	$0,40 \pm 0,13$
20	110 ± 14	$0,15 \pm 0,11$
30	116 ± 7	$0,13 \pm 0,08$
40	111 ± 7	$0,18 \pm 0,07$
50	112 ± 7	$0,16 \pm 0,07$

Embora o estudo realizado para avaliar o pH do meio tenha mostrado a pequena influência deste parâmetro no processo de extração, a questão do tempo de contato mostra que interações envolvendo as proteínas e os agregados existem e causam mudanças nos valores de coeficiente de partição. Pode-se observar que, ao longo do tempo, os valores de K foram reduzidos, passando de *ca.* 0,40 quando a mistura era mantida sob a temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, para algo entre 0,13 e 0,18 no intervalo de 20 e 50 min, indicando um valor médio de extração de albumina para a fase rica em surfactante de *ca.* 10%. Nesta hipótese, o aquecimento da solução a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por períodos prolongados poderia estar resultando em alterações na reologia do sistema, implicando em interações menos efetivas dos agregados com as proteínas.

4.1.4. Avaliação do sistema produzindo micelas mistas de SDS e Triton® X-114

Na tentativa de se obter um sistema que apresentasse características provenientes de monômeros de SDS e possibilitar a separação de fases em temperaturas biocompatíveis, realizou-se a mistura de SDS com um surfactante não-iônico, neste caso o Triton® X-114.

No primeiro estudo realizado, avaliou-se a adição de diferentes concentrações de SDS a uma solução com concentração fixa de Triton® X-114 em 1,0% (v/v). Construiu-se um gráfico a partir deste experimento, que é apresentado na Figura 20.

Para concentrações superiores a 0,3% (m/v) de SDS, obtém-se valores de ponto nuvem que são superiores a 66 °C e não puderam ser determinados.

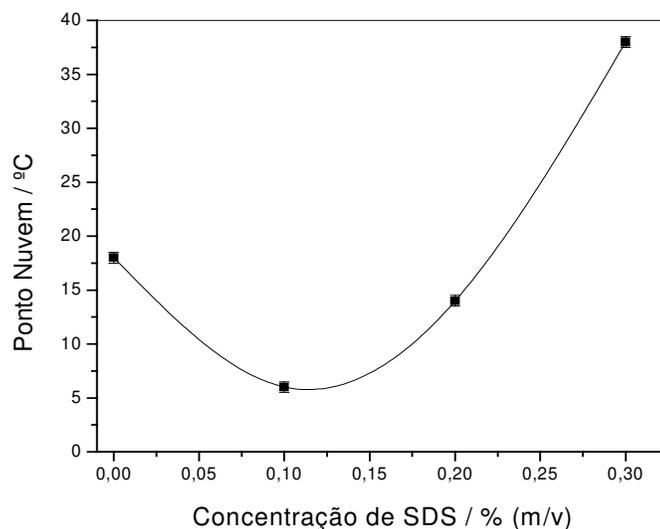


Figura 20. Gráfico apresentado o ponto nuvem para a mistura Triton® X-114 e SDS em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 na presença de 125 µg mL⁻¹ de albumina em função da concentração de SDS, mantendo-se fixa em 1,0% (v/v) a concentração de Triton® X-114 e variando a concentração de SDS no intervalo de 0 a 0,3% (v/v).

Observa-se que dois efeitos antagônicos atuam neste sistema: o primeiro deles pode ser observado quando o SDS se apresenta em baixas concentrações

(entre 0,1% e 0,2% m/v). Nestas condições, o tensoativo atua como co-surfactante reduzindo o ponto nuvem em um efeito similar àqueles apresentados pelos sais: como o SDS apresenta o contra-íon sódio, bem como carga negativa em sua porção polar, atua desidratando os grupamentos oxietileno, resultando na redução da temperatura de turvação. Existem dados na literatura [101] que descrevem um comportamento análogo ao observado neste sistema, mas utilizando um polímero contendo grupos oxietileno, sendo que as faixas de concentração obtidas são muito próximas daquelas observadas neste trabalho.

Em concentrações superiores a 0,2% (m/v) começam a predominar as características do SDS nas micelas formadas, havendo a elevação do ponto nuvem de maneira bastante pronunciada.

Optou-se por prosseguir utilizando um sistema que apresentasse a separação de fases a uma temperatura biocompatível. As duas opções seriam os sistemas com 1,0% (m/v) de Triton[®] X-114 na presença de 0,1 ou 0,2% (m/v) de SDS. Como já haviam sido testados anteriormente sistemas contendo apenas surfactantes não-iônicos, optou-se por utilizar o sistema com 0,2% (m/v) de SDS, visto que este apresenta uma maior concentração do surfactante iônico.

Desta forma, passou-se a avaliar diversas concentrações desta mistura de surfactantes, mantendo-se fixa suas proporções, de acordo com a Tabela 15.

Tabela 15. Proporções avaliadas para misturas contendo Triton[®] X-114 e SDS na presença de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,2.

Triton[®] X-114	SDS
% (v/v)	% (m/v)
1,0	0,2
2,0	0,4
3,0	0,6
4,0	0,8
5,0	1,0

Os resultados obtidos para este estudo são apresentados no gráfico da Figura 21.

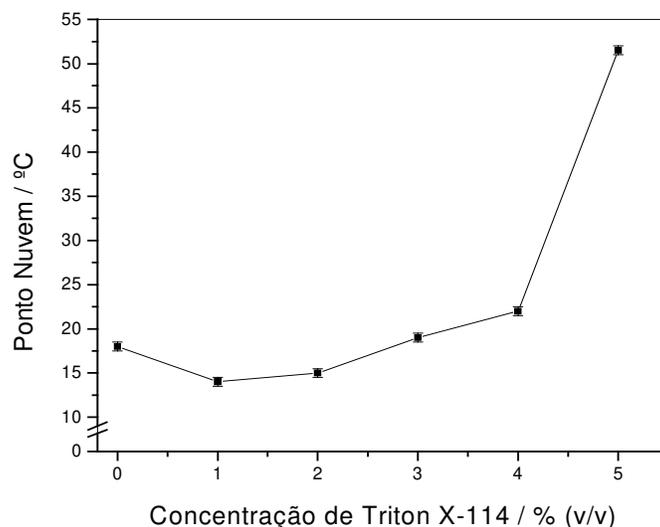


Figura 21. Gráfico exibindo o ponto nuvem em função da concentração da mistura Triton[®] X-114 e SDS para tubos contendo $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. A abscissa do gráfico exibe apenas a concentração de Triton[®] X-114.

Pode-se observar que para as proporções avaliadas, consegue-se trabalhar com temperaturas abaixo de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até a proporção de 4,0% (m/v) Triton[®] X-114 e 0,8% (v/v) SDS.

Partindo destes resultados, passou-se a avaliar o comportamento de extração para as quatro condições em que a separação de fases ocorria em temperaturas abaixo de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ou seja, para as condições contendo de 1,0 a 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114 na presença de 0,2 a 0,8% (m/v) de SDS, respectivamente.

Quando este estudo foi iniciado, notou-se que, aparentemente, a separação de fases não se dava de maneira completa, visto que a fase pobre em surfactante permanecia ligeiramente turva, dando a impressão de apresentar uma concentração de surfactante muito superior a CMC. A literatura [17] descreve que sistemas envolvendo micelas com cargas podem apresentar uma fase pobre em surfactante com concentração relativamente alta de monômeros frente aos sistemas que utilizam apenas surfactantes não-iônicos. Assim, passou-se a adicionar em cada tubo 1,0% (m/v) de cloreto de sódio, o que possibilitou a

separação mais efetiva das fases após a centrifugação (pôde-se notar uma redução na turvação da fase pobre em surfactante).

Os resultados obtidos para o estudo de concentrações em tubos contendo 1,0% (m/v) de NaCl são apresentados na Figura 22.

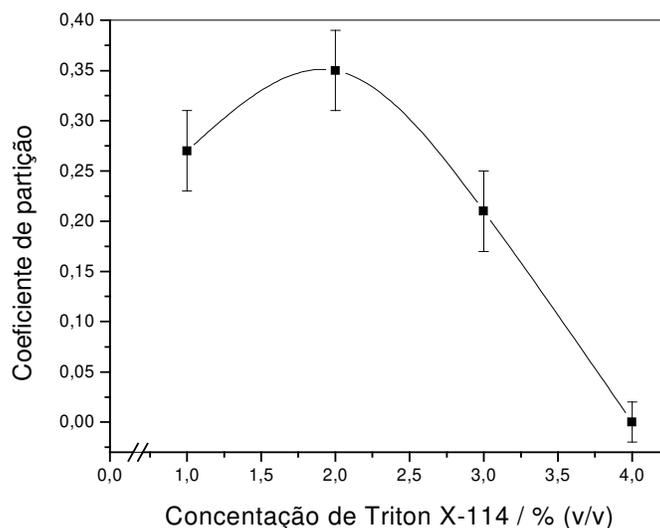


Figura 22. Gráfico representando o coeficiente de partição em função da concentração dos surfactantes Triton[®] X-114 e SDS para soluções contendo $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e 1,0% (m/v) de cloreto de sódio, utilizando tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. A abscissa do gráfico exibe apenas a concentração de Triton[®] X-114.

Avaliando os dados obtidos pode-se perceber que, de maneira análoga ao sistema que continha apenas Triton[®] X-114, a eficiência de extração tende a ser reduzida à medida que ocorre aumento na concentração de surfactante. Assim, quando se atinge 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114 já se encontra praticamente toda a albumina na fase pobre em tensoativo.

Seguindo o raciocínio adotado nos sistemas anteriores, como a eficiência máxima de extração não ultrapassou ca. 25% para a condição onde se tinha 2,0% (v/v) de Triton[®] X-114 e 0,4% (m/v) de SDS, o que corresponde a uma razão de distribuição de 0,35, optou-se por seguir avaliando o sistema que apresentava 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114 e 0,8% (m/v) de SDS e, desta forma, buscar manter toda a proteína na fase pobre em surfactante. Realizou-se um estudo para avaliar a influência do pH do meio na extração. Os resultados podem ser observados no gráfico da Figura 23.

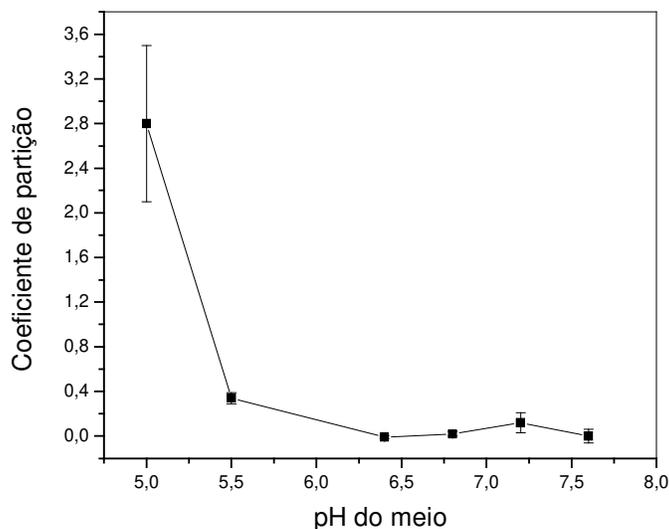


Figura 23. Gráfico representando o coeficiente de partição em função do pH do meio para soluções contendo $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de Triton[®] X-114 4,0% (v/v), 0,8% (m/v) de SDS e 1,0% (m/v) de cloreto de sódio. N = 6.

Avaliando os dados obtidos, observa-se que a redução do pH, para um valor próximo ao ponto isoelétrico da albumina, resulta em uma marcante elevação na eficiência de extração do sistema para *ca.* 70%, sendo notória a contribuição do SDS neste processo. Tal fato ocorre como conseqüência da redução de cargas na proteína, possibilitando uma interação mais efetiva desta com as micelas. Neste caso, em pH 5,0, a carga líquida da proteína é zero. No entanto, neste pH, ainda existem resíduos laterais de aminoácidos que possibilitam a existência de interações eletrostáticas envolvendo albumina e as micelas.

A princípio, não se esperava obter uma melhora na eficiência de extração com a redução do pH do meio para valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína, uma vez que relatos da literatura [118] evidenciam uma redução nas constantes de associação para formação de complexos envolvendo a albumina e surfactantes iônicos nestas condições. Tal redução é resultado da estrutura mais compacta da proteína e conseqüente menor exposição de algumas de suas cavidades ao meio externo, o que dificulta a interação com as moléculas de surfactante.

No entanto, não se pode esquecer que, embora este efeito exista, também ocorre a redução da solubilidade da proteína quando se trabalha próximo ao ponto isoelétrico, o que facilita a migração da albumina para a fase rica em tensoativo, por se tratar de um meio mais hidrofóbico.

Assim, embora as interações eletrostáticas existam em menor número a pH 5,0, elas serão suficientes, para que, juntamente com a redução na solubilidade da molécula protéica, promovam a extração.

Posteriormente, para estudos de tempo de contato, passou-se a trabalhar com o sistema contendo 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) de SDS e 1,0% (m/v) de cloreto de sódio, porém, utilizando tampão fosfato em pH 5,0. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 16. Especificamente, neste teste, quantificou-se a fase rica em surfactante pelo fato de ser a fase com maior teor protéico.

Tabela 16. Concentração protéica média obtida na fase rica em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido no estudo de tempo de contato para soluções com concentrações de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) de SDS e 1,0% (m/v) de NaCl, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0. N = 3.

Tempo de contato (min)	Concentração protéica na fase rica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
10	95 \pm 7	3,2 \pm 0,9
20	95 \pm 1	3,2 \pm 0,2
30	92 \pm 1	2,8 \pm 0,2
40	92 \pm 2	2,8 \pm 0,2
50	98 \pm 3	3,6 \pm 0,5

Obeve-se como resultados, valores de coeficiente de partição que oscilaram entre 3,6 e 2,8. Comparando, então, os teores protéicos na fase rica, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 16), observa-se que tais resultados não apresentam diferenças estatísticas significativas ao se aplicar o teste estatístico de análise de variância em grupo [92], demonstrando que a presença de micelas carregadas

negativamente não irá resultar no aumento da eficiência de extração ao longo do tempo.

Realizou-se, posteriormente, um estudo de tempo de contato para avaliar a questão da eficiência de extração do sistema contendo 1,0% (v/v) de Triton® X-114, 0,2% (m/v) de SDS e 1,0% (m/v) de NaCl em pH 5,0. Baseando-se nos dados da Figura 22, acreditava-se que a eficiência de extração utilizando estas concentrações de surfactante elevariam ainda mais os valores de coeficiente de partição, uma vez que os valores de K eram maiores. A Tabela 17 apresenta os dados de concentração e coeficiente de partição para as extrações realizadas sob estas novas condições.

Tabela 17. Concentração protéica média obtida na fase rica em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido em estudo de tempo de contato para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina e 1,0% (v/v) de Triton® X-114, 0,2% (m/v) de SDS e 1,0% (m/v) de NaCl, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0. N = 6.

Tempo de contato (min)	Concentração protéica na fase rica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
10	61 ± 3	$0,94 \pm 0,09$
20	48 ± 1	$0,63 \pm 0,01$
30	57 ± 1	$0,81 \pm 0,02$
40	59 ± 2	$0,91 \pm 0,06$
50	56 ± 7	$0,83 \pm 0,18$

Como resultados deste estudo observa-se que a eficiência de extração para a fase rica em surfactante é reduzida quando se utiliza o sistema contendo 1,0% (v/v) de Triton® X-114 e 0,2% (m/v) de SDS. A resposta para este comportamento pode se dar por meio da avaliação do sistema sob duas perspectivas. A primeira delas, leva em consideração a presença de Triton® X-114. Devido à concentração quatro vezes menor deste surfactante no meio, quando comparado ao sistema que contém 4,0% (v/v), tem-se favorecida a extração de proteínas para a fase rica, em um comportamento similar àquele apresentado na Figura 22.

Avaliando o sistema sob o ponto de vista do surfactante iônico, pôde-se observar que, na presença de 0,8% (m/v) de SDS, o sistema apresentou características mais pronunciadas deste surfactante. Tal fato foi comprovado avaliando o gráfico da Figura 21, no qual se obteve um aumento gradual da temperatura de turvação à medida que a concentração dos surfactantes aumentava. Conseqüentemente, o aumento na concentração de SDS proporciona aumento na eficiência de extração.

Desta forma, tem-se dois efeitos antagônicos influenciando no processo de extração: o primeiro deles relaciona-se com a redução dos coeficientes de partição em função do aumento da concentração de Triton[®] X-114, enquanto o segundo está ligado ao aumento do coeficiente de partição em função da elevação na concentração de SDS. No caso da solução contendo 1,0% (v/v) Triton[®] X-114 e 0,2% (m/v) SDS, o efeito atribuído ao Triton[®] X-114 irá se sobrepor àquele apresentado pelo SDS, justificando a menor eficiência de extração quando se trabalha com o sistema em menores concentrações, mas em pH 5,0.

Realizou-se, também, uma avaliação do sistema contendo 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114 e 0,8% (m/v) de SDS, mas em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 5,0 (consistindo no dobro da concentração utilizada até então), mas na ausência de cloreto de sódio. Neste caso, a separação de fases já era possível mesmo a 5 °C. A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos para três tubos distintos de mesma composição.

Tabela 18. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina e 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114 e 0,8% (m/v) de SDS, em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 5,0, sem adição de NaCl. N = 6.

Identificação do tubo	Concentração protéica na fase pobre (µg mL ⁻¹)	K
A	13 ± 1	8,9 ± 0,5
B	12 ± 1	9,6 ± 0,6
C	< LQ*	-

* < limite de quantificação – 11,4 µg mL⁻¹.

Pode-se notar que para o sistema no qual não se adiciona NaCl conseguiu-se uma eficiência de extração ainda maior para a fase rica em surfactante. Removeu-se a albumina de maneira bastante satisfatória, atingindo valores mínimos de extração que ficam em torno de ca. 90%, mesmo com a obtenção, ao final do processo de separação, de uma fase pobre em surfactante com aparência ligeiramente turva, fornecendo indícios da presença de uma concentração do tensoativo relativamente alta frente aos demais sistemas estudados. Desta maneira, a hipótese de que a presença de surfactante em maior concentração na fase pobre causaria reduzir a extração das proteínas para a fase rica não foi confirmada.

O aumento na eficiência de extração, neste caso, justifica-se em termos da carga líquida das micelas formadas. A adição de NaCl neutraliza parcialmente as cargas negativas da micela, impedindo a interação eletrostática das moléculas de SDS com a albumina, reduzindo, assim, a eficiência de extração.

Para confirmar a importância da carga das micelas na extração, conduziu-se um estudo em pH 4,3 (simplesmente dissolveu-se a albumina em uma solução 0,2 mol L⁻¹ de diidrogenofosfato de potássio). Como resultado, observou-se que a concentração de albumina na fase pobre permanecia em níveis baixos (abaixo do limite de quantificação para o método de Bradford), indicando que a extração de albumina para a fase rica continuava com eficiência superior a 90%. Como em pH 4,3 esta proteína apresenta carga positiva, passará a interagir de maneira mais efetiva com as micelas formadas (que terão carga negativa). Assim, mesmo apresentando uma estrutura menos compacta, ela permanecerá na fase rica em tensoativo devido a interações eletrostáticas com os agregados formados.

4.1.4.1. Influência da temperatura na eficiência de extração do sistema SDS / Triton[®] X-114

Prosseguindo a avaliação do sistema composto pela mistura de Triton[®] X-114 4,0% (v/v) e 0,8% (m/v) de SDS em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 5,0, realizou-se um estudo para avaliar a influência da temperatura sobre a eficiência

de extração. Como nestas condições era possível obter o ponto nuvem a 5,0 °C, realizou-se o estudo avaliando tubos mantidos sob termostatização durante 10 min nas temperaturas de 6,0, 25,0 e 30,0 °C. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 19.

Tabela 19. Concentração protéica média obtida nas fases pobres em surfactante, após quantificação das mesmas pelo método de Bradford, e seus respectivos coeficientes de partição, obtidos para soluções com concentrações de 125 µg mL⁻¹ de albumina, 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) de SDS em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 7,2 a procedimentos de separação de fases conduzidos a 6,0; 25,0 e 30,0 °C. N = 6.

Temperatura (°C)	Concentração protéica na fase pobre (µg mL ⁻¹)	K
6,0	24 ± 2	4,2 ± 0,4
25,0	13 ± 5	13 ± 4
30,0	< LQ*	10 ± 4

* < limite de quantificação – 11,4 µg mL⁻¹.

A partir dos valores de K apresentados na Tabela 19 e aplicando a equação de van't Hoff (equação iv), calculou-se a variação de entalpia associada ao processo de partição da albumina. Para tanto, fez-se uso dos valores de K nas temperaturas de 6,0 e 30,0 °C, que forneceram um valor de ΔH° de ca. 8 kcal mol⁻¹.

O valor da Energia Livre de Gibbs para o sistema a 25 °C (ΔG°) também foi estimado por meio da relação apresentada na equação (xii).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (\text{xii})$$

Fazendo uso do valor de K nesta temperatura, obteve-se o valor de ΔG° de ca. -1,2 Kcal mol⁻¹.

Neste caso, o cálculo da entropia envolvida no processo deixa de ser significativo, uma vez que se devem aplicar os valores de ΔH° e ΔG° calculados anteriormente, e que já são uma estimativa. No entanto, pelo fato do processo

apresentar-se endotérmico e possuir um valor de Energia Livre negativa, pode-se dizer que será entropicamente favorecido ($\Delta S^\circ > 0$).

Tais resultados vêm colaborar para um melhor entendimento com relação aos mecanismos envolvidos neste processo de partição. O fato da transferência da albumina para a fase rica em surfactante apresentar-se como um processo endotérmico, favorecido entropicamente, sugere a ocorrência de interações envolvendo resíduos hidrofóbicos das proteínas com regiões também hidrofóbicas das moléculas de tensoativo [49]. A literatura [50] reporta a redução do valor de ΔH° para a extração de albumina à medida que polímeros com massas molares crescentes são utilizados para sua extração, fato que pode ser justificado como uma consequência da diminuição da interação dos resíduos hidrofóbicos da proteína com surfactantes, causado pelo maior impedimento estérico.

Para o sistema proposto, a presença de interações envolvendo resíduos hidrofóbicos apresenta-se como uma explicação plausível para os elevados valores de K, uma vez que se espera obter a desnaturação da proteína na presença de um surfactante iônico, resultando na exposição, para o meio aquoso, de uma série de resíduos laterais hidrofóbicos dos aminoácidos. Como em pH 5,0 a solubilidade da molécula protéica é reduzida, esta tende a migrar para o meio que apresenta maior hidrofobicidade, ou seja, a fase rica em tensoativo.

4.1.5. Avaliação do sistema utilizando CTAB / Triton[®] X-114

A avaliação de um sistema que possuía em sua composição apenas CTAB não se apresentou viável. A carga positiva apresentada pelos monômeros deste surfactante em sua porção polar impossibilitou sua aplicação em sistemas aquosos de duas fases sob condições biocompatíveis. Desta forma, assim como havia ocorrido para o sistema contendo SDS, realizou-se a adição de Triton[®] X-114, buscando obter a separação de fases em temperaturas próximas da ambiente.

Para iniciar, avaliou-se a concentração de CTAB entre 0,2 e 1,0% (m/v), mantendo-se fixa a concentração de Triton[®] X-114 em 1,0% (v/v). Como resultado

para este estudo, observou-se que, para nenhum dos tubos avaliados atingia-se temperaturas de separação de fases inferiores a 65 °C. Desta forma, pode-se observar que, de modo diferente do SDS, o surfactante CTAB não atua como co-surfactante do Triton[®] X-114, mesmo em baixas concentrações, não se observando nenhuma redução na temperatura de turvação.

Desta forma, teve que se fazer uso, novamente, de um estudo envolvendo sulfato de amônio para se obter o ponto nuvem a temperatura compatível. As concentrações iniciais dos surfactantes foram mantidas fixas em 0,2% (m/v) para o CTAB e 1,0% (v/v) para o Triton[®] X-114.

O gráfico apresentado na Figura 24 mostra os resultados obtidos para este teste, no qual se pode observar o ponto nuvem em função da concentração de eletrólito. Nota-se que, com a adição de 8,0% (m/v) do referido sal, consegue-se obter a separação de fases em temperatura abaixo de 30 °C.

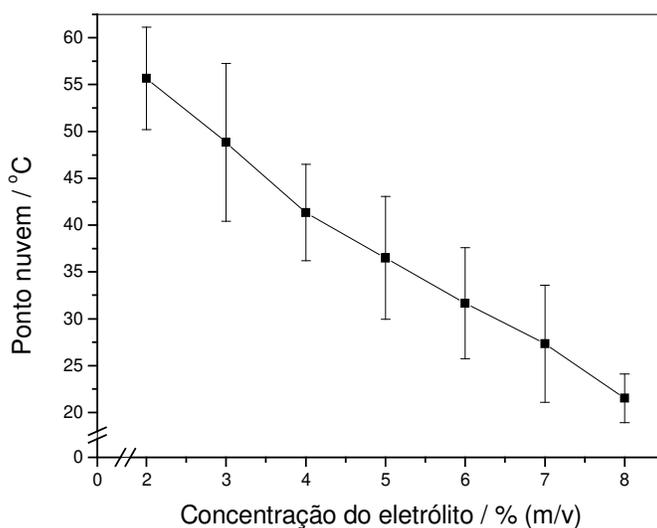


Figura 24. Ponto nuvem em função da concentração de sulfato de amônio para soluções contendo 0,2% (m/v) de CTAB e 1,0% de Triton[®] X-114 na presença de 125 µg mL⁻¹ de albumina bovina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. N = 3.

Como característica distinta frente a todos os outros sistemas avaliados anteriormente, pode-se observar que não se consegue obter repetibilidade para a temperatura em que ocorre a separação de fases (considerando a taxa de

aquecimento avaliada). Observa-se que, com a adição de 6,0% (m/v) de sulfato de amônio já se consegue obter a separação de fases próxima de 30 °C, com valor médio de (32 ± 6) °C. O mesmo comportamento foi observado para soluções contendo 7,0% e 8,0% (m/v) do referido sal, onde o ponto nuvem era formado com temperaturas médias de (27 ± 6) °C e (21 ± 3) °C respectivamente.

Optou-se por continuar avaliando o sistema na presença de 8,0% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ uma vez que se obtiveram as menores temperaturas para o processo de separação de fases. Concentrações crescentes de Triton[®] X-114 e CTAB foram, então, avaliadas, mantendo-se fixa a proporção entre os dois. As composições dos tubos avaliados são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20. Composição das misturas de Triton[®] X-114 e CTAB, utilizadas no estudo para avaliação da formação do ponto nuvem em função da concentração da mistura entre estes dois surfactantes. Todos os tubos possuíam em sua composição 8,0% (m/v) de sulfato de amônio e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2.

Tubo	Mistura de surfactantes
A	1,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 0,2% (m/v) CTAB
B	2,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 0,4% (m/v) CTAB
C	3,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 0,6% (m/v) CTAB
D	4,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 0,8% (m/v) CTAB
E	5,0% (v/v) Triton [®] X-114 / 1,0% (m/v) CTAB

Os resultados obtidos para este estudo de concentração são apresentados na Tabela 21. Pode-se observar que, novamente, a questão da repetibilidade é um problema para o sistema proposto. Para alguns casos, obtiveram-se estimativas de desvios padrão superiores a 20%, como nos tubos A e E, por exemplo. Uma possível causa para esta questão pode-se relacionar com a baixa robustez do sistema no que tange a homogeneização das soluções após a inserção das mesmas no banho termostatizado.

Tabela 21. Valores médios de ponto nuvem para as soluções contendo a mistura Triton® X-114 e CTAB com as concentrações apresentadas na Tabela 20, todos na presença de 8,0% (m/v) de sulfato de amônio e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. N = 6.

Tubo	Ponto Nuvem (°C)
A	23 ± 5
B	19 ± 3
C	20 ± 2
D	17 ± 1
E	20 ± 5

Tubos contendo solução com a composição de 4,0% (v/v) Triton® X-114 e 0,8% (m/v) CTAB apresentaram os melhores resultados em termos de repetibilidade, sendo que a estimativa do desvio padrão não superou 8%. Além disso, obteve-se o valor médio de ponto nuvem mais baixo dentre todas as misturas de surfactantes avaliadas (17 ± 1) °C. Desta forma, a mistura de tensoativos com esta concentração foi escolhida para dar prosseguimento à avaliação da extração de albumina frente aos demais testes.

Realizou-se, em seguida, um estudo para avaliação da influência do pH do meio na extração da albumina. Como pôde ser observado anteriormente, o pH influencia de maneira pronunciada no mecanismo de extração quando se tem no meio a presença de um surfactante iônico, como é o caso do SDS. Os resultados obtidos para este teste são apresentados na Tabela 22.

Pode-se observar que, para este sistema, a alteração do pH do meio não resulta em uma melhora no processo de extração (Tabela 22). Era de se esperar que a utilização de um surfactante catiônico resultasse em uma melhora nos valores de K como consequência da interação envolvendo os monômeros do tensoativo carregados positivamente e a proteína que tem carga global negativa, o que não foi observado. Até mesmo próximo ao ponto isoelétrico da albumina [59], onde se tem a solubilidade reduzida da proteína em meio aquoso, não se obteve aumento da extração para a fase rica em tensoativo.

Tabela 22. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição obtido para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) de CTAB e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH variando na faixa entre 5,0 e 7,6. N = 6.

pH do meio	Concentração protéica na fase	
	pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K
5,0	77 ± 5	$0,63 \pm 0,11$
5,5	81 ± 4	$0,55 \pm 0,07$
6,4	91 ± 2	$0,37 \pm 0,03$
6,8	69 ± 1	$0,82 \pm 0,01$
7,2	86 ± 8	$0,47 \pm 0,14$
7,6	81 ± 4	$0,54 \pm 0,07$

Tal comportamento pode ser justificado em termos da elevada concentração de eletrólitos adicionada ao meio, situada em 8,0% (m/v) de sulfato de amônio. Desta forma, os íons do eletrólito apresentam-se ligados, de maneira temporária, à superfície micelar, por meio de forças de Van der Waals ou eletrostáticas, resultando na neutralização das cargas presentes na superfície da micela [12]. Ao final, foi obtido um sistema com características semelhantes às aquelas apresentadas por sistemas compostos apenas por surfactantes não-iônicos, justificando o fato de não se conseguir obter valores de coeficiente de partição superiores a 1,0, mesmo quando se utilizou pH 5,0.

Por fim, para este sistema também se avaliou a questão do tempo de contato. Para tanto, tubos contendo 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) de CTAB e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio na presença de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina em tampão fosfato pH 7,2 foram estudados no intervalo de tempo situado entre 10 e 50 min. Os resultados obtidos para este teste são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Concentração protéica média obtida na fase pobre em surfactante, após quantificação pelo método de Bradford, e coeficiente de partição, obtido no estudo de tempo de contato, para soluções com concentrações de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina bovina na presença de 4,0% (v/v) de Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) de CTAB e 8,0% (m/v) de sulfato de amônio, todos em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. N = 6.

Tempo de contato (min)	Conc. fase pobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Coeficiente de partição
10	71 ± 4	$0,83 \pm 0,11$
20	75 ± 2	$0,72 \pm 0,04$
30	71 ± 6	$0,81 \pm 0,14$
40	79 ± 4	$0,68 \pm 0,08$
50	80 ± 4	$0,68 \pm 0,07$

De maneira análoga a um sistema composto apenas por surfactantes não-iônicos, pode-se observar que o sistema avaliado não apresenta alterações estatisticamente significativas nos valores de coeficiente de partição, reforçando a idéia de que o excesso de eletrólito adicionado ao meio, com o objetivo de reduzir o ponto nuvem, irá atuar no sentido de neutralizar a carga das micelas. Obtiveram-se, desta forma, eficiências de extração que se situaram entre 36 e 43%.

4.2. Avaliação conformacional da albumina, via dicroísmo circular, após procedimentos de extração

Após apresentação dos resultados obtidos para todos os sistemas de extração estudados, passou-se a avaliar as estruturas secundárias da albumina após submetê-la aos referidos processos. Até este momento, nenhum dos sistemas avaliados havia sido escolhido como mais adequado para remoção de albumina em plasma sangüíneo, uma vez que sistemas apresentando altas eficiências de extração poderiam resultar em desnaturação completa da proteína.

Os experimentos de dicroísmo circular foram conduzidos no intervalo de comprimentos de onda compreendidos entre 200 e 250 nm, ideal para avaliação das estruturas α -hélice. Para avaliação das folhas β , deveria-se estudar comprimentos de onda abaixo de 200 nm. No entanto, devido à interferência causada pelos surfactantes, mesmo após submeter às amostras a uma etapa prévia de precipitação, não foi possível realizar análises nesta região do espectro.

A Figura 25 apresenta um espectro obtido para solução de albumina bovina, utilizada como referência, com concentração de $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, que foi apenas diluída em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2.

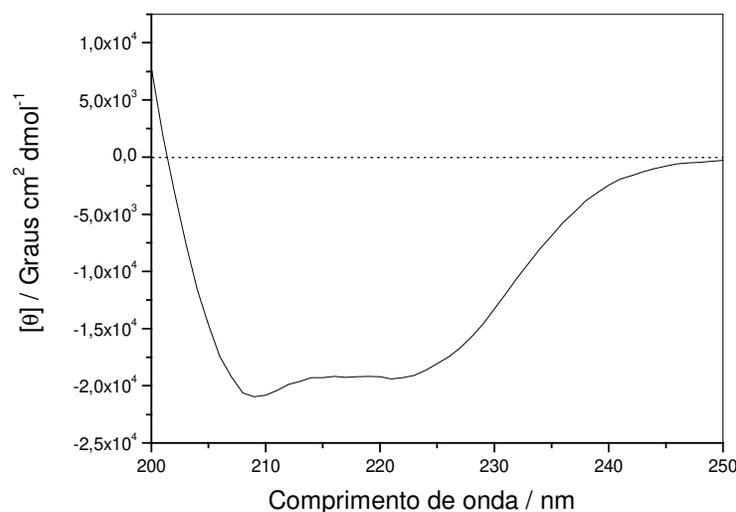


Figura 25. Espectro de dicroísmo circular para albumina bovina $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O eixo da ordenada é expresso em resíduos principais de elipticidade molar, sendo que o valor de branco (solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2) foi previamente subtraído.

Utilizando os dados obtidos experimentalmente para construção da Figura 25, realizou-se o cálculo para estimar a porcentagem de cada uma das estruturas que compõem a proteína em questão. A Tabela 24 apresenta tais resultados.

Tabela 24. Estimativa da porcentagem de cada uma das estruturas secundárias, para a albumina em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2, após cálculos utilizando 4 diferentes algoritmos.

Algoritmo	Estruturas (%)					Soma
	α -hélice	Folha β	Voltas β	PPII	Outras	
Selcon 2	61	5	10	6	12	94
Selcon 3	61	6	9	2	23	101
K2D	69	4	-	-	27	100
CONTIN	55	0	-	-	45	100
Valor médio	62 \pm 6	4 \pm 3	10 \pm 1	4 \pm 3	27 \pm 14	99 \pm 3

A Tabela 24 apresenta, além dos resultados de cada um dos algoritmos utilizados, o valor percentual médio para cada uma das estruturas. A coluna soma mostra a soma de todas as estruturas para um determinado método, sendo que este valor deve se aproximar de 100 (100% das estruturas determinadas). Os algoritmos dos métodos K2D e CONTIN não fazem distinção para as estruturas voltas β e estruturas PPII¹⁵ [119, 120], sendo classificadas como outras estruturas.

Ainda na Tabela 24, pode-se observar que a porcentagem obtida para estruturas α -hélice corresponde a ca. 62%, o que se apresenta bastante coerente com valores encontrados na literatura, que ficam situados em torno de 61 a 67% [75, 121].

Embora os resultados para as demais estruturas sejam apresentados, os mesmos não são confiáveis, incluindo os valores obtidos para as folhas β , uma vez que não se avaliaram comprimentos de onda abaixo de 200 nm. Logo, a discussão ao longo do texto, enfocará apenas os valores obtidos para as estruturas α -hélice.

Passou-se, então, a avaliar todos os sistemas estudados em suas condições de concentração e pH ótimos.

¹⁵ Seqüência de L-prolinas na conformação *trans* (*right-handed helix*). Estas estruturas apresentam-se como solução estrutural no sentido de possibilitar a interação interdomínio entre duas proteínas [119, 120].

4.2.1. Avaliação dos sistemas empregando surfactantes não-iônicos

Primeiramente, avaliaram-se as fases pobres dos sistemas contendo $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albumina, 6,0% (v/v) de Triton[®] X-114, na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 (Sistema A), a fase pobre do sistema contendo 3,0% (v/v) Triton[®] X-100 também em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 na presença de 8,0% (m/v) sulfato de amônio (Sistema B), bem como a fase pobre do sistema contendo 0,5% (m/v) BRIJ[®] 35 na presença de 1,0% (v/v) Triton[®] X-114 e 8,0% (m/v) sulfato de amônio em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 (Sistema C). Vale ressaltar que para estes sistemas a maior parte da albumina era mantida na fase pobre em surfactante. A Figura 26 apresenta o espectro de dicroísmo circular, com os valores de ordenada já convertidos para resíduos de elipticidade molar.

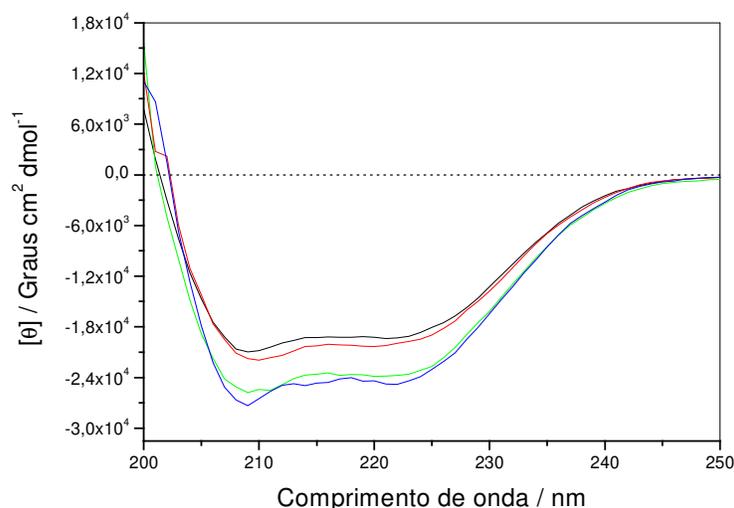


Figura 26. Espectro de dicroísmo circular, na região compreendida entre 200 e 250 nm, para $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina bovina, contida nas fases pobres em surfactante, submetidas aos processos de extração utilizando: — (Sistema A): 6,0% (v/v) de Triton[®] X-114 em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2; — (Sistema B): 3,0% (v/v) de Triton[®] X-100 em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2; — (Sistema C): 0,5% (m/v) BRIJ[®] 35, 1,0% (m/v) Triton[®] X-114 e 8,0% (m/v) sulfato de amônio em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2; — albumina bovina $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2.

A partir dos espectros, pode-se estimar a porcentagem de α -hélices presente na albumina para cada sistema. Os resultados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Estimativa da porcentagem de estruturas α -hélices, para soluções de albumina $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ contida nas fases pobres em surfactante para os sistemas identificados como A, B e C. Quatro diferentes algoritmos foram aplicados para os cálculos.

Algoritmo	Estruturas α -hélice (%)		
	Sistema A	Sistema B	Sistema C
Selcon 2	75	64	74
Selcon 3	79	64	87
K2D	81	72	81
CONTIN	69	58	88
Valor médio	76 ± 5	65 ± 6	83 ± 6

Comparando os resultados obtidos com a solução de referência, observa-se que, para todos os sistemas, a porcentagem de estruturas α -hélice eleva-se: de *ca.* 62% para *ca.* 76% no caso do Sistema A, para *ca.* 65% no caso do Sistema B e para *ca.* 83% no sistema C. Entretanto, este resultado não pode ser considerado como um indicativo de que esteja ocorrendo um aumento nas estruturas α -hélice da proteína; neste caso, torna-se pertinente comentar duas possíveis justificativas para este efeito: na primeira delas pode-se citar uma possível compactação da estrutura protéica, quando esta entra em contato com o surfactante ao longo do processo de extração [122]. Este processo ocorreria como forma da proteína reduzir a exposição de resíduos hidrofílicos, presentes em sua superfície, do meio, que agora possui uma característica hidrofóbica mais pronunciada. Uma segunda possibilidade considera que poderia estar ocorrendo um processo de agregação envolvendo as biomoléculas e o tensoativo. A literatura apresenta dados onde são observados valores mais negativos para a elipticidade molar na região avaliada, como consequência da interação entre albumina e o surfactante [75].

Para os sistemas B e C, deve-se considerar, também, mudanças nas estruturas secundárias provocadas pela adição de eletrólito em grandes concentrações. Assim, avaliaram-se possíveis alterações conformacionais em uma solução contendo 8,0% (m/v) de sulfato de amônio. A Figura 27 apresenta o espectro de dicroísmo circular obtido neste estudo.

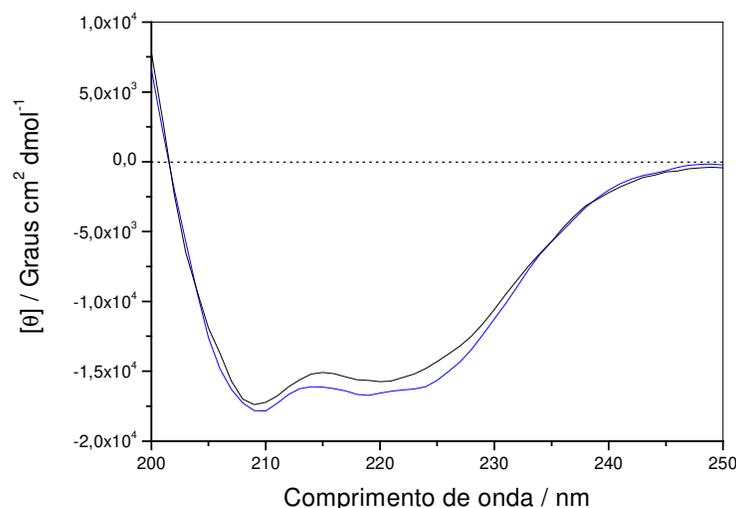


Figura 27. Espectro de dicroísmo circular, na região compreendida entre 200 e 250 nm, para: — solução de albumina bovina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 na presença de 8,0% (m/v) de sulfato de amônio; — solução de albumina bovina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2.

A análise dos resultados do espectro da Figura 27 é apresentada na Tabela 26. Nela, pode-se observar uma pequena redução na porcentagem de estruturas α -hélice para as moléculas de albumina, de *ca.* 62 para *ca.* 56%. Embora, esta variação não apresente diferenças estatísticas significativas não se pode deixar de mencioná-la. Este resultado demonstra que a presença de altas concentrações de eletrólito no meio resulta na desnaturação parcial da proteína, enfatizando a hipótese da ocorrência de uma possível agregação da albumina com o tensoativo.

Tabela 26. Estimativa da porcentagem de estruturas α -hélices, para solução de albumina bovina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 na presença de 8,0% (m/v) de sulfato de amônio. Quatro diferentes algoritmos foram aplicados para os cálculos.

Algoritmo	Estruturas α -hélice (%)
Selcon 2	52
Selcon 3	52
K2D	60
CONTIN	59
Valor médio	56 ± 4

Dando prosseguimento as análises, tem-se agora a discussão com relação ao outro sistema composto por surfactantes não-iônicos, que consistia na fase pobre da mistura composta por 3,0% (v/v) Tween[®] 80, 1,5% (v/v) Triton[®] X-114 na presença de 10,0% (m/v) de cloreto de sódio em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2. Os resultados obtidos podem ser observados no espectro da Figura 28 e na Tabela 27.

Vale ressaltar que, para este sistema, avaliações de comprimentos de onda menores que 204 nm não eram possíveis em função da interferência provocada pelo surfactante presente na fase pobre, mesmo após realizar uma etapa de precipitação. Mesmo assim, os dados obtidos permitiram realizar uma avaliação das estruturas α -hélices, visto que, as duas principais bandas utilizadas para efeitos de cálculos apresentam-se em 208 e 220 nm.

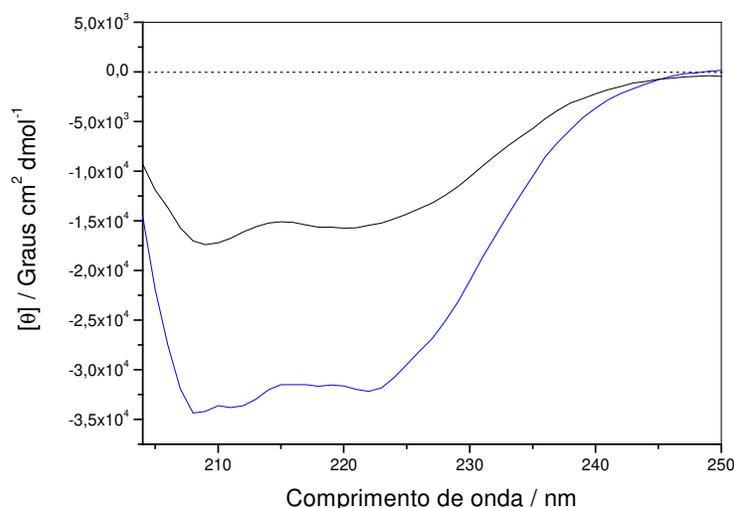


Figura 28. Espectro de dicroísmo circular, na região compreendida entre 204 e 250 nm, para — albumina bovina 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contida na fase pobre em surfactante, após submetê-la ao processo de extração utilizando 3,0% (v/v) Tween[®] 80, 1,5% (v/v) de Triton[®] X-114 e 10,0% (m/v) de cloreto de sódio em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2; — albumina bovina 1,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2.

Foi possível observar, novamente, pelos dados da Tabela 27, o aumento na porcentagem de estruturas α -hélices da proteína de ca. 62% para ca. 80%. Neste caso, aplicou-se dois algoritmos para realizar o cálculo das estruturas protéicas

devido a limitações com relação à faixa de comprimento de onda utilizada nos cálculos.

Tabela 27. Estimativa da porcentagem de α -hélices, para solução contendo $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina contida na fase pobre em surfactante, submetida ao processo de extração utilizando 3,0% (v/v) Tween[®] 80, 1,5% (v/v) Triton[®] X-114, 10,0% (m/v) cloreto de sódio em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. Dois diferentes algoritmos foram aplicados para os cálculos.

Algoritmo	Estruturas α -hélice (%)
Selcon 3	78
K2D	81
Valor médio	80 ± 2

Assim, foi possível observar que, de maneira semelhante aos demais sistemas que apresentavam surfactantes não-iônicos, ocorre uma elevação na porcentagem de estruturas α -hélice, indicando possível agregação ou compactação da albumina em função da presença de surfactantes no meio.

4.2.2. Avaliação dos sistemas empregando surfactantes iônicos

Prosseguindo a avaliação dos experimentos de dicroísmo circular, tem-se, agora, a discussão referente aos sistemas que utilizavam surfactantes iônicos. O primeiro a ser discutido consistirá nas proteínas presentes na fase rica do sistema composto por 4,0% (v/v) Triton[®] X-114 na presença de 0,8% (m/v) de SDS em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 (Sistema D).

Para avaliação deste sistema realizaram-se outros dois estudos: no primeiro deles determinou-se a porcentagem de estruturas α -hélice presente na molécula de albumina dissolvida em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0; e o segundo estudo avaliou o comportamento desta proteína após a realização de uma etapa de precipitação com acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol para remoção do excesso de tensoativo. Os espectros obtidos para este estudo podem ser observados na Figura 29.

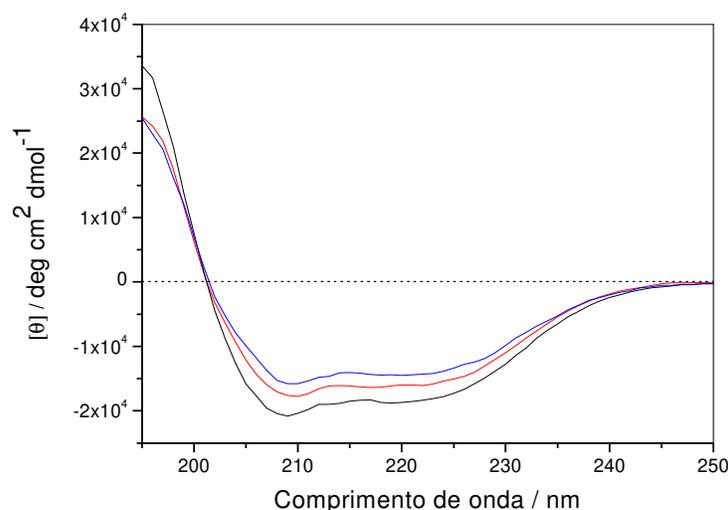


Figura 29. Espectros de dicroísmo circular, na região compreendida entre 195 e 250 nm, para soluções contendo $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina bovina: — em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0; — em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol, e para — fase rica do sistema 4,0% (v/v) Triton® X-114 na presença de 0,8% (m/v) de SDS em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 (Sistema D) após precipitação com acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol.

Após avaliação das estimativas de estruturas α -hélice, apresentadas na Tabela 28, pode-se observar que a redução de pH, bem como aumento da força iônica do tampão utilizado neste sistema de extração não resulta em alterações com relação à porcentagem destas estruturas secundárias na proteína, mantendo-se em ca. 62%.

Tabela 28. Estimativa da porcentagem de estruturas α -hélice, para soluções contendo $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina utilizando 4 diferentes algoritmos e seus respectivos valores médios.

algoritmo	Estruturas α -hélice (%)		
	Padrão em pH 5,0	Padrão após precipitação	Sistema D após precipitação
Selcon 2	58	50	45
Selcon 3	55	51	44
K2D	65	58	60
CONTIN	71	53	50
Valor médio	62 ± 7	53 ± 4	50 ± 7

Com relação à etapa de precipitação com acetato de amônio em metanol, observa-se que esta resulta em alterações na conformação secundária da proteína, passando-se de *ca.* 62% para *ca.* 53% de estruturas α -hélice quando a albumina é submetida ao agente precipitante.

Tendo agora em mãos o comportamento da proteína no tampão utilizado, bem como após o processo de precipitação para remoção do surfactante, pode-se avaliar sua estrutura após submetê-la ao processo de extração proposto. Segundo os dados apresentados na Tabela 28, bem como perfil do espectro de dicroísmo circular da Figura 29, pode-se observar que o processo global de extração seguido de precipitação resulta na desnaturação parcial da proteína (*ca.* 12% de estruturas α -hélice).

Comparando os resultados obtidos após submeter à amostra ao processo de extração com a amostra submetida à precipitação com acetato de amônio em metanol, tem-se que a estrutura protéica sofre pequenas alterações, ou seja, as estruturas α -hélice são reduzidas de *ca.* 53% para *ca.* 50%, valores que podem ser considerados estatisticamente iguais.

Não se pode afirmar que o agente precipitante seja o único responsável pela desnaturação. Tal processo também ocorre devido à presença de SDS; no entanto, como a albumina apresenta certa estabilidade estrutural (devido, por exemplo, a presença de 17 ligações dissulfeto) [75], a desnaturação acontece até uma determinada extensão, seja devido ao surfactante ou ao agente precipitante, resultando em um processo no qual, ao final, tem-se a proteína parcialmente conservada, apresentando *ca.* 50% de estruturas α -hélice em sua estrutura.

Contudo, não se pode descartar o fato de que a desnaturação esteja ocorrendo em maior proporção, e que o resultado esteja sendo mascarado devido à agregação das proteínas na presença de Triton[®] X-114.

O outro sistema de extração que utilizava surfactante iônico consistia na mistura 4,0% (v/v) Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) CTAB, 8,0% (m/v) sulfato de amônio (Sistema E). Neste caso, avaliou-se a fase pobre em surfactante, pois apresentava o maior teor protéico após o processo de extração proposto. Vale ressaltar que, neste caso, a precipitação com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol para

eliminação de surfactante foi necessária, uma vez que o surfactante interferia na análise (entre *ca.* 200 a 210 nm), mesmo em baixas concentrações, como pode ser observado no espectro de dicroísmo circular apresentado na Figura 30, obtido para um branco desta mistura de tensoativos.

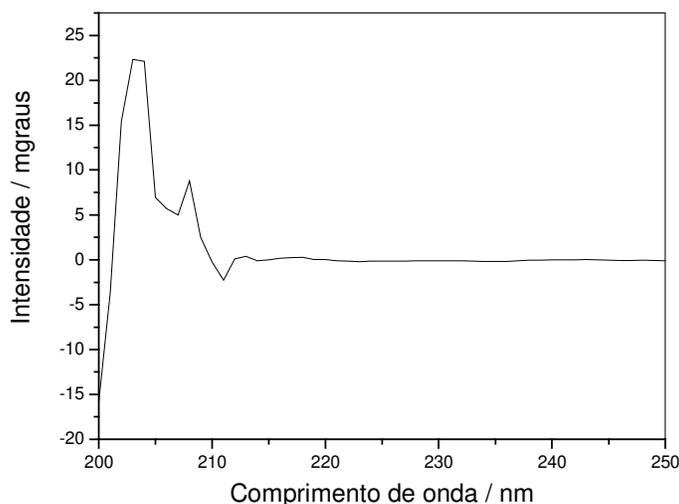


Figura 30. Espectro de dicroísmo circular, na região compreendida entre 200 e 250 nm, para mistura 4,0% (v/v) Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) CTAB, 8,0% (m/v) (NH₄)₂SO₄ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2.

Com a utilização de uma etapa prévia de precipitação com acetato de amônio em metanol, eliminou-se o problema, como pode ser observado pelo espectro de dicroísmo circular da Figura 31.

O resultado deste estudo, apresentado na Tabela 29, mostra que a porcentagem de estruturas α -hélice presente na albumina é reduzida para *ca.* 56%. Considerando o fato de que o tratamento da amostra com acetato de amônio em metanol reduz as estruturas α -hélice para porcentagens próximas deste valor, pode-se inferir que a exposição da albumina ao Triton[®] X-114 e CTAB não implica na desnaturação protéica para valores ainda maiores, num comportamento semelhante aquele apresentado pelo sistema Triton[®] X-114 na presença de SDS. Além disso, para este sistema também existe a influência do sulfato de amônio, atuando como co-surfactante, que também reduz o número de α -hélices para valores próximos de 56%.

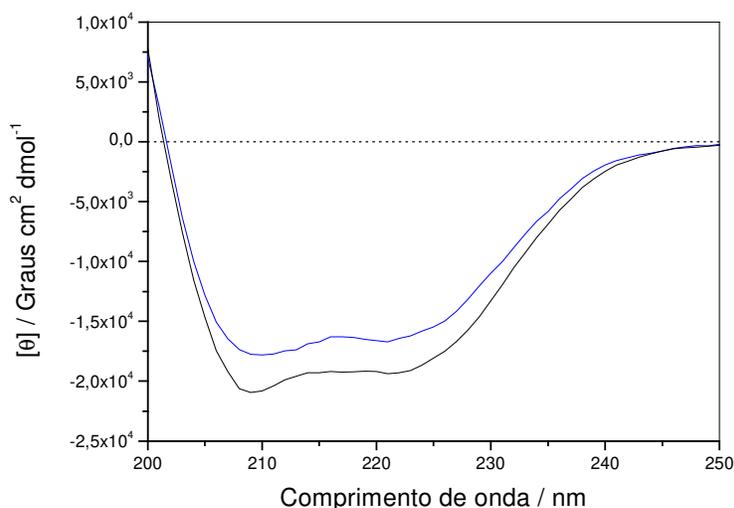


Figura 31. Espectros de dicroísmo circular, na região compreendida entre 200 e 250 nm, para soluções contendo $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de albumina bovina: — em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol, e para — fase pobre do sistema 4,0% (v/v) Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) CTAB, 8,0% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sistema E) com posterior precipitação utilizando sulfato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol.

No entanto, mais uma vez, não se pode deixar de mencionar que a desnaturação pode estar ocorrendo em maior extensão; no entanto, apresenta-se mascarada devido à presença de Triton[®] X-114, que causa a agregação da proteína.

Tabela 29. Estimativa da porcentagem de cada uma das estruturas secundárias, para solução de albumina $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ contida na fase pobre em surfactante, submetida ao processo de extração utilizando 4,0% (v/v) Triton[®] X-114, 0,8% (m/v) CTAB, 8,0% (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, após etapa de precipitação com sulfato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol. Quatro diferentes algoritmos foram aplicados para os cálculos.

Algoritmo	Estruturas α -hélice (%)
Selcon 2	52
Selcon 3	51
K2D	60
CONTIN	61
Valor médio	56 ± 5

4.3. Aplicação do sistema SDS / Triton[®] X-114 para remoção de albumina em plasma sanguíneo

Após avaliar a eficiência de extração para os sistemas estudados, bem como o grau de desnaturação protéico das amostras sintéticas submetidas a cada um destes sistemas, optou-se por aplicar a mistura composta por 4,0% (v/v) Triton[®] X-114 na presença de 0,8% (m/v) SDS em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 5,0 para remover albumina em plasma sanguíneo, com posterior avaliação pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Tal mistura apresentou os maiores valores de coeficiente de partição, dentre todos os sistemas avaliados, bem como não apresentou restrições no que se refere à desnaturação das proteínas, uma vez que este processo ocorre, mas de maneira parcial, o que não inviabiliza sua aplicação prática.

Primeiramente, realizou-se a quantificação do teor de proteínas totais para a amostra de plasma sanguíneo que seria submetida ao procedimento de extração proposto, utilizando, para tanto, o método de Bradford. Obteve-se, neste caso, uma amostra com teor de proteínas totais de 51 ± 4 g L⁻¹.

Partiu-se, a princípio, de 30 µL de plasma aplicados a um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução isotrópica (150 µg mL⁻¹ de proteínas). Após realizar o procedimento de separação de fases e coleta dos volumes de cada uma, realizou-se uma etapa de precipitação com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol para remoção do excesso de tensoativo presente nas mesmas. A Tabela 30 apresenta a concentração de proteínas totais após precipitação.

Tabela 30. Quantificação de proteínas totais nas fases rica e pobre, para amostras de plasma sanguíneo, obtidas após precipitação com sulfato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol na proporção 1:5 (v/v) (amostra:agente precipitante). Concentração total de proteína adicionada = 150 µg mL⁻¹. N = 4.

Fase	Teor protéico (µg mL ⁻¹)
Rica	61 ± 43
Pobre	46 ± 12

Os resultados apresentados neste estudo não foram satisfatórios. De maneira diferente às amostras sintéticas, que utilizavam apenas albumina bovina, não se conseguia obter reprodutibilidade utilizando este agente precipitante. Além disso, a concentração total de proteína quantificada (representada pela soma das concentrações das fases rica e pobre) representa *ca.* 75% do total de proteínas adicionado aos tubos (considerando o valor médio obtido).

Desta forma, buscou-se avaliar outros três agentes precipitantes, que consistiam em acetona na proporção 1:4 (v/v); acetonitrila, também na proporção 1:4 (v/v) e ácido tricloroacético (TCA) 20% (v/v) em acetona na proporção 1:5 (v/v).

Como resultados iniciais, pôde-se concluir que a solução de TCA 20% (v/v) em acetona não resultou na formação de precipitado. Para as demais soluções, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 31.

Tabela 31. Quantificação de proteínas totais nas fases rica e pobre, para amostras de plasma sangüíneo, obtidas após precipitação com acetona na proporção 1:4 (v/v) ou acetonitrila 1:5 (v/v) (proporção amostra:agente precipitante). Concentração total de proteína adicionada = 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. N = 4.

Agente precipitante	Fase	Teor protéico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Acetona	Rica	55 \pm 7
	Pobre	53 \pm 11
Acetonitrila	Rica	12 \pm 2
	Pobre	8 \pm 5

A partir dos dados obtidos, pode-se observar que, de modo semelhante à solução de acetato de amônio em metanol, a acetona não precipita de maneira quantitativa as proteínas da amostra, obtendo-se uma recuperação que não supera 75%. No entanto, com a utilização de acetona foi possível melhorar a reprodutibilidade para o método quando comparado ao acetato de amônio em metanol. Já para a solução de acetonitrila a precipitação foi ainda menos efetiva, obtendo-se uma recuperação média de *ca.* 12%.

A literatura [123] mostra que tais solventes apresentam-se altamente eficientes para realizar a precipitação de proteínas plasmáticas. No entanto, uma justificativa para o comportamento observado pode-se dar em função da presença de surfactantes e gordura no plasma, estabilizando as proteínas no meio. Aliado a este fato pode-se citar, também, a presença de moléculas protéicas com diferentes graus de hidrofobicidade, ou seja, tem-se um cenário muito mais complexo, sendo difícil realizar a precipitação quantitativa da amostra.

Assim, optou-se por utilizar a acetona como agente precipitante para o plasma avaliado. Um dado interessante que deve ser mencionado refere-se ao coeficiente de partição, que neste caso foi de 1,1, indicando a presença de *ca.* 51% das proteínas quantificadas na fase rica em surfactante.

4.3.1. Avaliação das amostras de plasma, após remoção da albumina, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Submeteram-se 100 μ L de plasma ao procedimento de extração por ponto nuvem e posterior precipitação com acetona. Cada fase foi ressolubilizada com tampão desnaturante e aplicada, posteriormente, à técnica de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida.

Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 32. O perfil eletroforético revela que ocorre a remoção preferencial da albumina para a fase rica em surfactante, como previsto, devido à presença de uma banda intensa, estimada em *ca.* 63,3 kDa.

Para o gel obtido com as proteínas remanescentes na fase pobre em surfactante, identificam-se 18 bandas, inclusive uma bastante intensa em *ca.* 63,5 kDa referente à albumina, podendo concluir que a remoção desta proteína para a fase rica não se dá por completo. Pode-se observar ainda a presença de bandas referentes a importantes proteínas relacionadas com mecanismos de defesa, dentre outras, tais como, imunoglobulina G em *ca.* 142,3 kDa, transferrina em *ca.* 81,1 kDa, Imunoglobulina A em *ca.* 73,3 kDa, antitripsina em *ca.* 55,7 kDa,

imunoglobulina de cadeia pesada em *ca.* 54,9 kDa e imunoglobulina de cadeia leve em *ca.* 30,5 kDa.

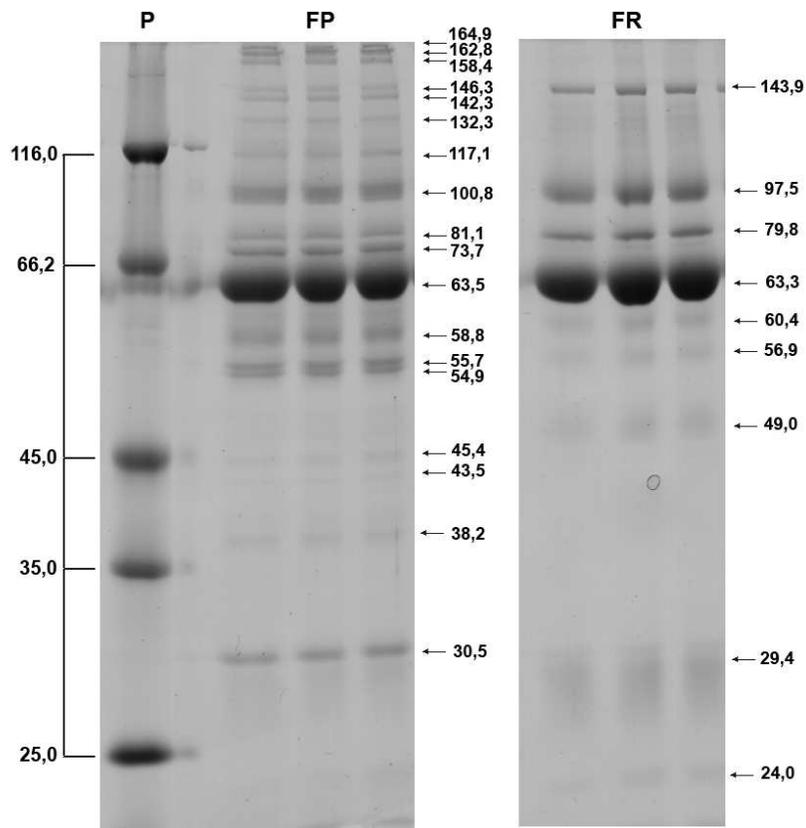


Figura 32. Perfil eletroforético obtido para amostras de plasma sanguíneo submetidas ao procedimento de extração proposto. (FP) representa a fase pobre em surfactante (8,1 μ g de proteína aplicada), (FR) representa a fase rica em surfactante (4,0 μ g de proteína aplicada) e (P) representa a canaleta contendo padrão protéico. As setas indicam, de maneira ilustrativa, as bandas identificadas na imagem.

Compararam-se os perfis eletroforéticos das amostras submetidas à extração baseada em ponto nuvem com uma amostra de plasma que não foi submetida ao procedimento de extração (denominada amostra bruta). Neste caso, a amostra proveniente da mesma bolsa de plasma foi apenas diluída adequadamente com tampão desnaturante. A Figura 33 apresenta o resultado obtido.

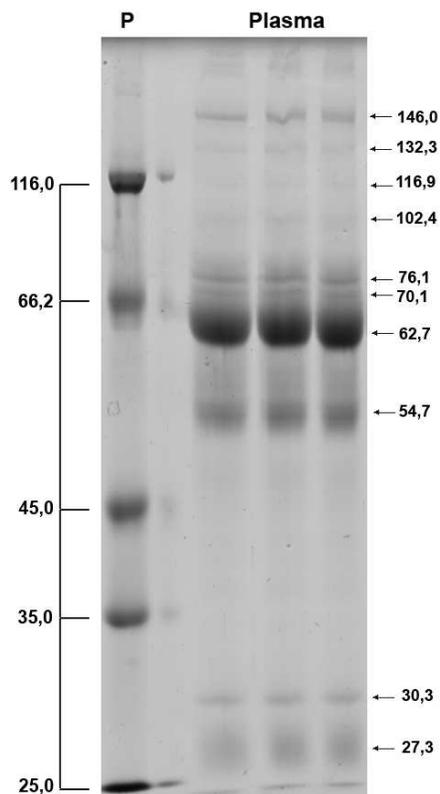


Figura 33. Perfil eletroforético para amostra de plasma sanguíneo bruto. Foram aplicadas 8,0 µg de proteína, após diluição com tampão dissociante.

A análise da Figura 33 mostra a presença majoritária de albumina na amostra, devido à banda identificada em *ca.* 62,7 kDa. Ainda nesta amostra, não se conseguiu identificar as mesmas 18 bandas que estavam presentes no gel submetido ao procedimento de extração baseado em ponto nuvem; nota-se, portanto, um decréscimo na resolução, implicando na redução no número de bandas para apenas 10. Neste gel, consegue-se observar somente proteínas presentes em alta concentração no plasma, destacando-se a transferrina em *ca.* 76,1 kDa e a imunoglobulina G em *ca.* 146,0 kDa.

O aumento da massa aplicada, para obtenção de um gel com maior número de bandas, (semelhante àquele obtido na Figura 32), resultaria no espalhamento e arraste daquela atribuída à albumina, implicando na formação de um “borrão” que inviabilizaria a análise. Assim, nota-se que embora o sistema de extração baseado

em ponto nuvem não remove por completo esta proteína da amostra, ele possibilita a obtenção de um perfil eletroforético mais detalhado.

Baseado-se em dados estimados de densidade óptica, obtidos com auxílio do software para tratamento de dados, pode-se avaliar a intensidade de cada banda do gel e realizar uma análise comparativa entre a amostra submetida ao procedimento de extração (fase pobre) e a amostra bruta, evidenciando ainda mais a existência de um maior número de bandas ao longo do gel submetido ao procedimento de extração baseado em ponto nuvem. A Figura 34 apresenta estes resultados.

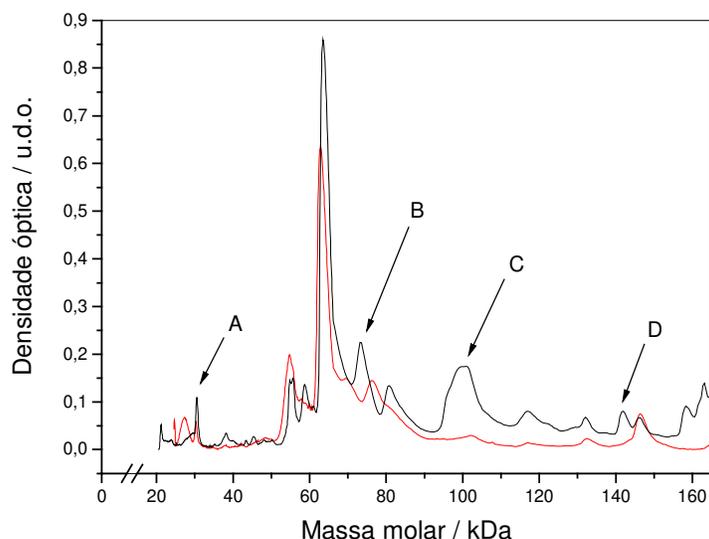


Figura 34. Gráfico apresentando a densidade óptica em função da massa molar das proteínas presentes nas canaletas dos géis apresentados nas Figuras 32 e 33: — amostra de plasma sanguíneo submetido ao processo de extração por ponto nuvem (fase pobre); — amostra bruta. As bandas apresentadas nos géis são representadas no gráfico pelos máximos dos picos. A, B, C e D identificam regiões que apresentam intensidades distintas entre os dois géis.

O software utilizado para tratamento de dados ainda permite correlacionar a densidade óptica com a massa estimada de proteína presente em cada banda, desde que se tenha conhecimento prévio da massa protéica aplicada no gel. Tais dados podem ser observados na Tabela 32.

Tabela 32. Massa protéica estimada para cada banda identificada, baseada nos dados de densidade óptica calculados.

Amostra bruta		Ponto nuvem (fase pobre)	
Massa Molar (kDa)	Massa estimada (ug)	Massa Molar (kDa)	Massa estimada (ug)
146,0	0,2	164,9	0,1
132,3	0,1	162,8	0,1
116,9	0,0	158,4	0,1
102,4	0,1	146,3	0,1
76,1	0,5	142,3	0,2
70,1	0,1	132,3	0,2
62,7	3,4	117,1	0,3
54,7	1,1	100,8	0,6
30,3	0,2	81,1	0,3
27,3	0,5	73,7	0,3
		63,5	3,4
		58,8	0,4
		55,7	0,3
		54,9	0,5
		45,4	0,1
		43,5	0,0
		38,2	0,2
		30,5	0,2
Massa Total (µg)	6,2	Massa Total (µg)	7,4

Nota-se, primeiramente, que a somatória das massas de todas as proteínas identificadas não é igual à massa total aplicada ao gel (8 µg). Isto se deve ao fato de uma fração das proteínas aplicadas não ter sido identificada em consequência do sistema de revelação utilizado (solução de Coomassie Brilliant Blue coloidal) não apresentar sensibilidade suficiente para identificar bandas de proteínas em menor concentração. No entanto, ressalta-se o fato de que uma maior fração das proteínas pôde ser identificada para as amostras submetidas ao procedimento de extração por ponto nuvem.

Observa-se, também, que a massa estimada para a albumina, em todas as situações, apresenta-se superior frente todas as outras proteínas. Para o gel

submetido ao procedimento de extração baseado em ponto nuvem (fase pobre), observa-se à presença de *ca.* 3,4 μg de albumina, o que equivale a *ca.* 42% do total de proteínas identificadas neste gel. Para a amostra bruta, a massa desta proteína também é de *ca.* 3,4 μg . No entanto, esta proteína corresponde a *ca.* 55% do total das proteínas identificadas.

Assim, é notória a melhora no perfil eletroforético quando a amostra é submetida ao procedimento de extração proposto. Desta forma, este procedimento foi, então, comparado com um disponível comercialmente, neste caso, um kit da empresa Millipore[®], baseado em uma coluna que apresenta afinidade pela albumina. A Figura 35 apresenta, para a mesma amostra de plasma das análises anteriores, o gel de eletroforese obtido, quando se aplica o protocolo padrão recomendado pela empresa, para o material eluído desta coluna (equivalente à fase pobre) e para o material retido na coluna (equivalente à fase rica).

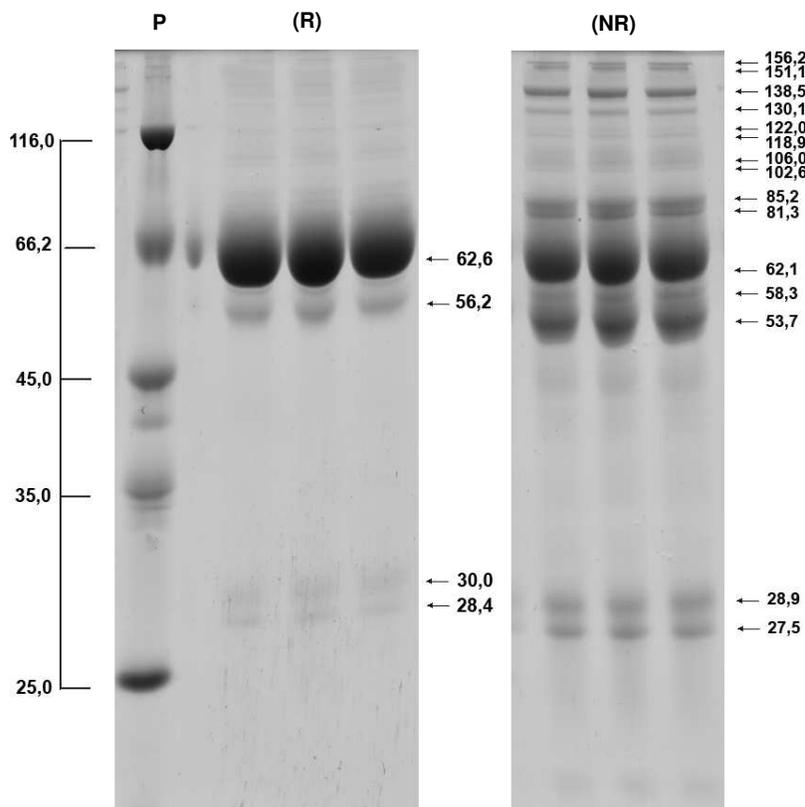


Figura 35. Perfil eletroforético para amostras de plasma sanguíneo submetidas ao protocolo de extração padrão proposto pela empresa Millipore[®], quando se utiliza 100 μL de plasma sanguíneo para realização do procedimento. (R) refere-se à proteína retida, (NR) a proteína não retida na coluna e (P) representa a canaleta contendo padrão protéico.

O perfil eletroforético obtido para o sistema comercial da Millipore® apresenta-se semelhante ao sistema desenvolvido neste trabalho. Pode-se observar que, assim como no sistema proposto, a albumina, em ca. 62,6 kDa não é removida de forma seletiva, havendo mais de uma banda nas canaletas onde se aplicou a fração retida na coluna.

Outra questão que pode ser levantada refere-se ao fato da albumina também não ser removida em sua totalidade da amostra, uma vez que na fração não retida na coluna existe uma banda muito intensa em ca. 62,1 kDa.

Com relação à fração não retida na coluna, pode-se observar que o gel obtido e apresentado na Figura 35 apresentou 15 bandas identificadas, número inferior frente as 18 bandas apresentadas pelo gel submetido ao método de extração proposto neste trabalho.

Novamente, a construção de um gráfico da densidade óptica dos géis em função da massa molar das proteínas, apresentado na Figura 36 compara o procedimento de extração baseado em ponto nuvem e o kit da empresa Millipore®.

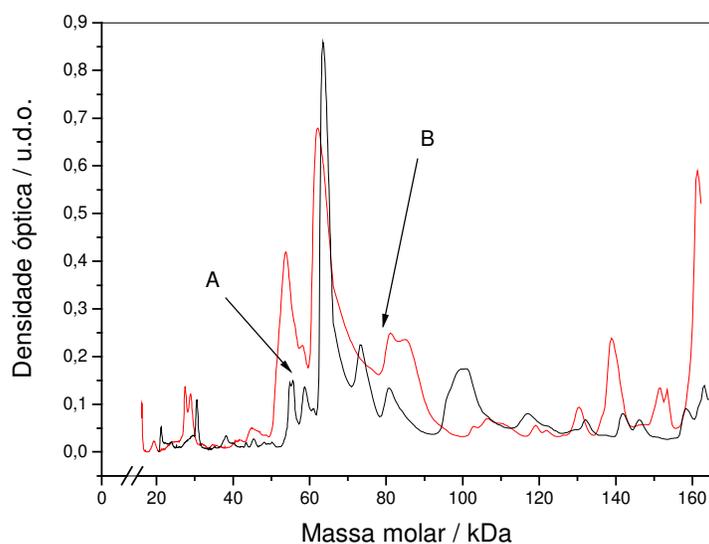


Figura 36. Gráfico apresentando densidade óptica em função da massa molar das proteínas presentes nas canaletas dos géis apresentados nas Figuras 32 e 35: — amostra de plasma sangüíneo submetido ao processo de extração por ponto nuvem (fase pobre); — fração da amostra não retida na coluna do sistema da empresa Millipore®. As bandas apresentadas nos géis são representadas no gráfico pelos máximos dos picos.

Mais uma vez ele revela que a aplicação do sistema proposto resulta em melhora na resolução para algumas regiões do gel, como pode ser observado pelas regiões A e B, indicadas pelas setas no gráfico apresentado da Figura 36.

5. CONCLUSÕES

Como conclusões deste trabalho tem-se que a eficiência de extração de albumina para a fase rica em tensoativo em um sistema aquoso de duas fases é baixa (não supera 40%) quando se trabalha apenas com surfactante não-iônicos. Tal comportamento é justificado em termos de diversos fatores e incluem a alta hidrofiliabilidade da albumina, a baixa interação envolvendo esta proteína e grupos oxietileno do tensoativo, bem como, restrições ao volume de exclusão, fator diretamente relacionado com a dimensão dos agregados formados.

Na presença de surfactantes iônicos, a extração apresenta-se viável, desde que dois parâmetros sejam adequados. O primeiro deles consiste no pH do meio, que deve ser menor ou igual a 5,0. Neste pH, encontra-se o ponto isoelétrico da albumina; logo, tem-se elevada a hidrofobicidade da proteína favorecendo a interação com as micelas que apresentam carga. Abaixo deste pH, proteínas e agregados apresentam cargas opostas o que também facilita a interação entre os mesmos. O segundo parâmetro consiste na força iônica do meio; concentrações salinas elevadas resultam na blindagem das cargas das micelas reduzindo a extração para a fase rica. Desta maneira, ressalta-se a importância das interações eletrostáticas no processo de extração, sendo, portanto, a principal variável para conduzir a albumina para a fase rica em tensoativo. Além do mais, é possível concluir que a dimensão dos agregados formados não apresenta influência significativa no processo de extração da proteína alvo.

A aplicação da técnica de dicroísmo circular mostra que ocorrem reduções das estruturas α -hélice para a proteína submetida aos procedimentos de extração baseados em misturas de surfactantes iônicos e não-iônicos. Há indicativos que ocorra a desnaturação parcial da proteína submetida ao procedimento de extração. No entanto, não se pode desconsiderar uma possível agregação da

proteína com o tensoativo. Para surfactantes não-iônicos, evidenciou-se aumento das bandas referentes às estruturas α -hélice, sendo um indicativo de que processos de agregação ou uma maior compactação da proteína podem estar ocorrendo na presença de tensoativo. Tais dados evidenciam a ocorrência de processos que não se completam biocompatíveis.

Por fim, a aplicação do sistema contendo a mistura Triton[®] X-114 / SDS apresentou resultados satisfatórios para remoção de albumina em plasma sanguíneo. A avaliação das amostras submetidas ao procedimento proposto frente à técnica de eletroforese em gel de poli(acrilamida) revelou um perfil eletroforético mais detalhado, embora a remoção da albumina não se dê por completo, ou seja, as amostras não se encontravam totalmente livres desta proteína. A Tabela 33 apresenta as características, bem como as condições que possibilitam obtenção de máxima eficiência de extração para o sistema. Vale ressaltar que pequenas alterações em alguns destes parâmetros não inviabilizam a aplicação do sistema para remoção de albumina, apenas reduzem sua eficiência.

Tabela 33. Parâmetros otimizados e características para o sistema composto pela mistura Triton[®] X-114 / SDS.

Parâmetro	Condição
Triton [®] X-114 (% - v/v)	4,0
SDS (% - m/v)	0,8
Concentração de dihidrogenofosfato de potássio (mol L ⁻¹)	0,2
pH do meio	5,0
Temperatura (°C)	25,0
Tempo de contato entre proteínas e tensoativos (min)	10
Volume de plasma bruto utilizado (μ L)	100
Tempo estimado do procedimento experimental (min)	15
Agente precipitante para remoção de tensoativo	Acetona
Proporção (amostra : solvente)	1:4 (v/v)
Redução estimada de estruturas α -hélice para albumina (%)	12

A comparação do método proposto frente a outro comercial evidenciou semelhanças entre os perfis eletroforéticos, com a vantagem de que a extração baseada em ponto nuvem apresenta-se como um procedimento de menor custo (menos de R\$ 1,00 por amostra) e que também demanda pouco tempo (ca. 15 min/amostra).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A aplicação da técnica de ponto nuvem para extração de albumina do plasma sangüíneo apresentou-se viável sob o ponto de vista prático, surgindo, portanto, como uma nova alternativa que torna possível a separação de proteínas presentes em alta concentração no plasma sangüíneo, mais especificamente albumina. Devido a grande simplicidade, pode-se propor a implementação para produção da tecnologia desenvolvida em escala industrial com a posterior comercialização da mesma.

Por fim, com a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de partição para sistemas envolvendo diferentes composições de tensoativos, pode-se propor a aplicação de variantes às alternativas apresentadas no sentido de aplica-las para isolamento de moléculas em geral, de maneira especial, proteínas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] McIntire, G. L.; *Micelles in analytical chemistry*, **Crit. Rev. Anal. Chem.**, **1990**, 21, 257-278.
- [2] Tani, H.; Kamidate, T.; Watanabe, H.; *Aqueous micellar two-phase systems for protein separation*, **Anal. Sci.**, **1998**, 14, 875-888.
- [3] Cordero, B. M.; Pavón, J. L. P.; Pinto, C. G.; Laespada, E. F.; *Cloud point methodology: a new approach for preconcentration and separation in hydrodynamic systems of analysis*, **Talanta**, **1993**, 40, 1703-1710.

- [4] Xiao, J. X.; Sivars, U.; Tjerneld, F.; *Phase behavior and protein partitioning in aqueous two-phase systems of cationic-anionic surfactant mixtures*, **J. Chromatogr. B**, **2000**, 743, 327-338.
- [5] Björhall, K.; Miliotis, T.; Davidsson, P.; *Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples*, **Proteomics**, **2005**, 5, 307-317.
- [6] Jiang, L.; He, L.; Fountoulakis, M.; *Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis*, **J. Chromatogr. A**, **2004**, 1023, 317-320.
- [7] Hoyer, B.; Jensen, N.; Busch, L. P.; *Effect of the pretreatment of recast nafion membranes on their rejection of the albumin interference in anodic stripping voltametry*, **Electroanalysis**, **2001**, 13, 843-848.
- [8] Bezerra, M. A.; Arruda, M. A. Z.; Ferreira, S. L. C.; *Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: a review*, **Appl. Spec. Rev.**, **2005**, 40, 269-299.
- [9] Moroi, Y.; *Micelles: theoretical and applied aspects*, 1ª edição, **1992**, Plenum Press, Nova Iorque, EUA.
- [10] Maniasso, N.; *Ambientes micelares em química analítica*, **Quim. Nova**, **2001**, 24, 87-93.
- [11] Ghamdi, A. M. A.; Din, H. A. N. E.; *Effect of oilfield chemicals on the cloud point of nonionic surfactants*, **Colloids Surf. A**, **1997**, 125, 5-18.
- [12] Shaw, D. J.; *Introdução à química dos colóides e de superfícies*, 2ª Edição, **1975**, Editora Edgard Blücher, São Paulo, Brasil.
- [13] Magalhães, C. S.; Garcia, J. S.; Lopes, A. S.; Figueiredo, E. C.; Arruda, M. A. Z.; *Strategies for sample preparation focusing biomolecules determination / characterization*. Em: *Trends in sample preparation*, Arruda, M. A. Z. (ed.), 1ª edição, **2006**, Nova Science Publishers, Nova Iorque, EUA.
- [14] West, C. C.; Harwell, J. F.; *Surfactants and subsurface remediation*, **Environ. Sci. Technol.**, **1992**, 26, 2324-2330.
- [15] Reich, I.; *Factors responsible for the stability of detergent micelles*, **J. Phys. Chem.**, **1956**, 60, 257-262.
- [16] Bezerra, M. A.; Ferreira, S. L. C.; *Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica*, 1ª edição, **2006**, Editora UESB, Vitória da Conquista, Brasil.
- [17] Wang, Y.; Kimura, K.; Dubin, P. L.; *Polyelectrolyte-micelle coacervation: effects of micelle surface charge, density, polymer molecular weight and polymer/surfactant ratio*, **Macromolecules**, **2000**, 33, 3324-3331.

- [18] Quina, F. H.; Hinze, W. L.; *Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach*, **Ind. Eng. Chem. Res.**, **1999**, 38, 4150-4168.
- [19] Coelho, L. M.; Arruda, M. A. Z.; *Preconcentration procedure using cloud point extraction in the presence of electrolyte for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry*, **Spectrochim. Acta**, **B**, **2005**, 60, 743-748.
- [20] Shriver, D. F.; Atkins, P. W.; Langford, C. H.; *Inorganic chemistry*, 2ª edição, **1995**, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- [21] Gu, T.; Gómez, P. A. G.; *Clouding of triton X-114: the effect of added electrolytes on the clouding point of triton X-114 in the presence of ionic surfactants*, **Coll. Surf. A**, **1995**, 104, 307-312.
- [22] Schott, H.; *Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants – XIV. Effect of chaotropic anions on the cloud point of octoxynol 9 (Triton X-100)*, **J. Colloid Interf. Sci.**, **1997**, 189, 117-122.
- [23] Chai, J. L.; Mu, J. H.; *Effects of various additives on the cloud point of dodecyl polyoxyethylene polyoxypropylene ether*, **Colloid J.**, **2002**, 64, 550-555.
- [24] Zhu, X.; Zhu, X.; Hu, Y.; Yu, S.; Wang, B.; *Cloud point extraction of serum albumin and its spectrophotometric determination in serum samples*, **Anal. Lett.**, **2006**, 39, 1853-1864.
- [25] Sussulini, A.; Arruda, M. A. Z.; *Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem*, **Ecl. Quim.**, **2006**, 31, 73-80.
- [26] Watanabe, H.; Tanaka, H.; *A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol*, **Talanta**, **1978**, 25, 585-589.
- [27] Wuilloud, G. M.; Wuilloud, J. C. A.; Wuilloud, R. G.; Silva, M. F.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D.; *Cloud point extraction of vanadium in parenteral solutions using a nonionic surfactant (PONPE 5.0) and determination by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, **Talanta**, **2002**, 58, 619-627.
- [28] Manzoori, J. L.; Tabrizi, A. B.; *The application of cloud point preconcentration for the determination of Cu in real samples by flame atomic absorption spectrometry*, **Microchem. J.**, **2002**, 72, 1-7.
- [29] Zhu, X.; Hu, B.; Jiang, Z.; Li, M.; *Cloud point extraction fore speciation of chromium in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry*, **Water Res.**, **2005**, 39, 589-595.

- [30] Cerutti, S.; Silva, M. F.; Gásquez, J. A.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D.; *Cloud point preconcentration prior to capillary zone electrophoresis: simultaneous determination of platinum and palladium at trace levels*, **Electrophoresis**, **2005**, 26, 3500-3506.
- [31] Donati, G. L.; Nascentes, C. C.; Nogueira, A. R. A.; Arruda, M. A. Z.; Nóbrega, J. A.; *Acid extraction and cloud point preconcentration as sample preparation strategies for cobalt determination in biological materials by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry*, **Microchem. J.**, **2006**, 82, 189-195.
- [32] Silva, M. A. M.; Frescura, V. L. A.; Curtius, A. J.; *Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction*, **Spectrochim. Acta B**, **2000**, 55, 803-813.
- [33] Nascentes, C. C.; Arruda, M. A. Z.; *Cloud point formation base on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and preconcentration*, **Talanta**, **2003**, 61, 759-768.
- [34] Borges, D. L. G.; Veiga, M. A. S.; Frescura, V. L. A.; Welz, B.; Curtius, A. J.; *Cloud-point extraction for the determination of Cd, Pb and Pd in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ir or Ru as permanent modifiers*, **J. Anal. At. Spectrom.**, **2003**, 18, 501-507.
- [35] Pinto, C. G.; Pavon, J. L. P.; Cordero, B. M.; *Cloud point preconcentration and high-performance liquid-chromatographic analysis with electrochemical detection*, **Anal. Chem.**, **1992**, 64, 2334-2338.
- [36] Holm, C.; Fredrikson, G.; Belfrage, P.; *Demonstration of the amphiphilic character of hormone-sensitive lipase by temperature-induced phase separation in Triton X-114 and charge-shift electrophoresis*, **J. Biol. Chem.**, **1986**, 261, 5659-5661.
- [37] Hinze, W.; Pramauro, E.; *A Critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud-point extractions): theory and applications*, **Crit. Rev. Anal. Chem.**, **1993**, 24, 133-177.
- [38] Rukhadze, M. D.; Tsagareli, S. K.; Sidamonidze, N. S.; Meyer, V. R.; *Cloud-point extraction for the determination of the free fraction of antiepileptic drugs in blood plasma and saliva*, **Anal. Biochem.**, **2000**, 287, 279-283.
- [39] Saitoh, T.; Hinze, W. L.; *Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins*, **Talanta**, **1995**, 42, 119-127.
- [40] Ganong, B. R.; Delmore, J. P.; *Phase-separation temperatures of mixtures of Triton X-114 and Triton X-45 – application to protein separation*, **Anal. Biochem.**, **1991**, 193, 35-37.

- [41] Zhang, T.; Liu, H.; Chen, J.; *Affinity-based reversed micellar bovine serum albumin (BSA) extraction with unbound reactive dye*, **Sep. Sci. Technol.**, **2000**, 35, 143-151.
- [42] Lopes, A. S.; Garcia, J. S.; Catharino, R. R.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Arruda, M. A. Z.; *Cloud point extraction applied to casein proteins of cow milk and their identification by mass spectrometry*, **Anal. Chim. Acta**, **2007**, 590, 166-172.
- [43] Yagui, C. O. R.; Lam, H.; Kemei, D. T.; Wang, D. C.; Pessoa Jr., A.; Blankschtein, D.; *Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems*, **Biotechnol. Bioeng.**, **2003**, 82, 445-456.
- [44] Nascentes, C. C.; Maniasso, N.; Arruda, M. A. Z.; *Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pré-concentração*, **Quim. Nova**, **2002**, 25, 483-489.
- [45] Casero, I.; Sicília, D.; Rubio, S.; Bendito, D. P.; *An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds*, **Anal. Chem.**, **1999**, 71, 4519-4526.
- [46] Yu, H.; Man, B. K. W.; Chan, L. L. N.; Lam, M. H. W.; Lam, P. K. S.; Wang, L.; Jin, H.; Wu, R. S. S.; *Cloud point extraction of nodularin-R from natural waters*, **Anal. Chim. Acta**, **2004**, 509, 63-70.
- [47] Sicilia, D.; Rubio, S.; Perez-Bendito, D.; *Evaluation of the factors affecting extraction of organic compounds based on the acid-induced phase cloud point approach*, **Anal. Chim. Acta**, **2002**, 460, 13-22.
- [48] Nikas, Y. J.; Liu, C. L.; Srivastava, T.; Abbott, N. L.; Blankschtein, D.; *Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions*, **Macromolecules**, **1992**, 25, 4797-4806.
- [49] Bolognese, B.; Nerli, B.; Picó, G.; *Application of the aqueous two-phase systems of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for protein purification*, **J. Chromatogr. B**, **2005**, 814, 347-353.
- [50] Nerli, B. B.; Espariz, M.; Picó, G. A.; *Thermodynamic study of forces involved in bovine serum albumin and ovalbumin partitioning in aqueous two-phase systems*, **Biotechnol. Bioeng.**, **2001**, 72, 468-474.
- [51] Nilsson, A.; Johansson, H. O.; Mannesse, M.; Egmond, M. R.; Tjerneld, F.; *Partitioning of peptide-tagged proteins in aqueous two-phase systems using hydrophobically modified micelle-forming thermoseparating polymer*, **Biochim. Biophys. Acta**, **2002**, 1601, 138-148.
- [52] Robson, R. J.; Dennis, E. A.; *The size, shape, and hydration of nonionic surfactant micelles. Triton X-100*, **J. Phys. Chem.**, **1977**, 81, 1075-1078.

- [53] Borgerding, M. F.; Hinze, W. L.; *Characterization and evaluation of the use of nonionic polyoxyethylene(23)dodecanol micellar mobile phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography*, **Anal. Chem.**, **1985**, 57, 2183-2190.
- [54] Mahajan, R. K.; Chawla, J.; Bakshi, M. S.; *Depression in the cloud point of Tween 80 in the presence of glycol additives and triblock polymers*, **Colloid Polym. Sci.**, **2004**, 282, 1165-1168.
- [55] Zadymova, N. M.; Yampol'skaya, G. P.; Filatova, L. Y.; *Interaction of bovine serum albumin with nonionic surfactant tween 80 in aqueous solutions: complexation and association*, **Colloid J.**, **2006**, 68, 162-172.
- [56] Bloomfield, M. M., *Chemistry and the living organism*, 5ª edição, **1992**, John Wiley & Sons, Nova Iorque, EUA.
- [57] Nelson, D. L.; Cox, M. M., *Lehninger Princípios de bioquímica*, 3ª edição, **2002**, Editora Sarvier, São Paulo, Brasil.
- [58] Carter, D. C.; He, X. M.; Munson, S. H.; Twigg, P. D.; Gernert, K. M.; Broom, M. B.; Miller, T. Y.; *Three-dimensional structure of human serum albumin*, **Science**, **1989**, 244, 1195-1198.
- [59] Peters Jr., T.; *Serum albumin*, **Adv. Prot. Chem.**, **1985**, 37, 161-245.
- [60] Stewart, A. J.; Blindauer, C. A.; Berezenko, S.; Sleep, D.; Sadler, P. J.; *Interdomain zinc site on human albumin*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **2003**, 100, 3701-3706.
- [61] Guo, X. H.; Chen, S. H., *Observation of polymerlike phase separation of protein-surfactant complexes in solution*, **Phys. Rev. Lett.**, **1990**, 64, 1979-1982.
- [62] Luca, G. C.; Reis, B. F.; *Simultaneous photometric determination of albumin and total protein in animal blood plasma employing a multicommutated flow system to carried out on line dilution and reagents handing*, **Spectrochim. Acta A**, **2004**, 60, 579-583.
- [63] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fundamentos de bioquímica*, Neto, A. G. F. (tradução), 1ª edição, **2000**, Artmed, Porto Alegre, Brasil.
- [64] Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V.; Lichtig, J.; *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*, **Quim. Nova**, **1998**, 21, 787-793.
- [65] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *Protein measurement with folin phenol reagent*, **J. Biol. Chem.**, **1951**, 193, 265-275.
- [66] Bradford, M. M.; *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Anal. Biochem.**, **1975**, 72, 248-254.

- [67] Peterson, G. L.; *Review of the foline phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall*; **Anal. Biochem.**, **1979**, 100, 201-220.
- [68] Compton, S. J.; Jones, C. G.; *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*, **Anal. Biochem.**, **1985**, 151, 369-374.
- [69] Splittgerber, A. G.; Sohl, J.; *Non linearity in protein assays by the coomassie blue dye-binding method*, **Anal. Biochem.**, **1989**, 179, 198-201.
- [70] Read, S. M.; Northcote, D. H.; *Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein*, **Anal. Biochem.**, **1981**, 116, 53-64.
- [71] Wilson, C. M.; *Studies and critique of amido black-10b, coomassie blue-r, and fast green FCF as stains for proteins after polyacrylamide-gel electrophoresis*, **Anal. Biochem.**, **1979**, 96, 263-278.
- [72] Lucarini, A. C.; Kilikian, B. V.; *Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances*, **Biotechnol. Tech.**, **1999**, 13, 149-154.
- [73] Hirst, J. D.; Colella, K.; Gilbert, A. T. B.; *Electronic circular dichroism of proteins from first-principles calculations*", **J. Phys. Chem. B.**; **2003**, 107, 11813-11819.
- [74] Chen, Y. H.; Yang, J. T.; Chau, K. H.; *Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism*", **Biochem.**, **1974**, 13, 3350-3359.
- [75] Li, Y.; Wang, X.; Wang, Y.; *Comparative studies on interactions of bovine serum albumin with cationic gemini and single-chain surfactants*, **J. Phys. Chem.**, **2006**, 110, 8499-8505.
- [76] Sreerama, N.; Woody, R. W.; *Computation and analysis of protein circular dichroism spectra*, **Method. Enzymol.**, **2004**, 383, 318-351.
- [77] Greenfield, N.; Fasman, G. D.; *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*, **Biochem.**, **1969**, 8, 4108-4116.
- [78] Bolotina, I. A.; Chekhov, V. O.; Lugauskas, V. Y.; Finkelshtein, A. V.; Ptitsyn, O. B.; *Determination of the secondary structure of proteins from circular-dichroism spectra. 1. Protein reference spectra for alpha structure, beta structure, and irregular structure*, **Molec. Biol.**, **1980**, 14, 701-709.
- [79] Bolotina, I. A.; Chekhov, V. O.; Lugauskas, V. Y.; Ptitsyn, O. B.; *Determination of the secondary structure of proteins from circular-dichroism spectra. 2. Consideration of the contribution of beta-bends*, **Molec. Biol.**, **1980**, 14, 709-715.
- [80] Yang, J. T.; Wu, C. S. C.; Martinez H. M.; *Calculation of protein conformation from circular dichroism*, **Methods Enzymol.**, **1986**, 130, 208-269.

- [81] Sreerama, N.; Woody, R. W.; *A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism*, **Anal. Biochem.**, **1993**, 209, 32-44.
- [82] Provencher, S. W.; *A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral-equations*, **Comput. Phys. Commun.**, **1982**, 27, 213-227.
- [83] Provencher, S. W.; *"A general-purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral-equations*, **Comput. Phys. Commun.**, **1982**, 27, 229-242.
- [84] Andrade, M. A.; Chacon, P.; Merelo, J. J.; Moran, F.; *Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network*", **Protein Eng., Des. Sel.**, **1993**, 6, 383-390.
- [85] Hames, B. D.; Rickwood, D.; *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*, 2ª edição, **1990**, Oxford University Press, Inglaterra.
- [86] Laemmli, U. K., *Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, **Nature**, **1970**, 227, 680-685.
- [87] Deutscher, M. P.; *Guide to protein purification*, 1ª edição, **1990**, Academic Press, EUA.
- [88] Cherry, J. P.; Barford, R. A.; *Methods for proteins analysis*, 1ª edição, **1988**, American Oil Chemists' Society, EUA.
- [89] Garcia, J. S.; Silva, G. A.; Arruda, M. A. Z.; Poppi, R. J.; *Application of Kohonen neural network to exploratory analyses of synchrotron radiation X-ray fluorescence measurements of sunflower metalloproteins*, **X-Ray Spectrom.**, **2007**, 36, 122-129.
- [90] Heller, M.; Schlappritzi, E.; Stalder, D.; Nuoffer, J. M.; Haeberli, A.; *Compositional protein analysis of high density lipoproteins in hypercholesterolemia by shotgun LC-MS/MS and probabilistic peptide scoring*, **Mol. Cell. Proteomics**, **2007**, 6, 1059-1072.
- [91] Copeland, R. A.; *Methods for Protein Analysis: A practical guide to laboratory protocols*, 1ª edição, **1994**, Chapman & Hall, Nova Iorque, EUA.
- [92] Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistics for analytical chemistry*", 3ª edição, **1994**, Ellis Horwood, Londres, Reino Unido.
- [93] Hiller, G. K.; Calkins, N.; vonWandruszka, R.; *Changes in polarity and aggregation number upon clouding of a nonionic detergent: effect of ionic surfactants and sodium chloride*, **Langmuir**, **1996**, 12, 916-920.
- [94] Silva, M. A. O.; Arruda, M. A. Z.; *Bradford reaction mechanization for the spectrophotometry determination of total proteins*", **Anal. Biochem.**, **2006**, 351, 155-157.

- [95] Kim, S. T.; Kim, H. S.; Kim, H. J.; Kim, S. G.; Kang, S. Y.; Lim, D. B.; Kang, K.Y.; *Prefractionation of protein samples for proteome analysis by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, **Mol. Cell**, **2003**, 16, 316-322.
- [96] Tantipaiboonwong, P.; Sinchaikul, S.; Sriyam, S.; Phutrakul, S.; Chen, S. T.; *Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients*, **Proteomics**, **2005**, 5, 1140-1149.
- [97] Carpentier, S. C.; Witters, E.; Laukens, K.; Deckers, P.; Swennen, R.; Panis, B.; *Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis*, **Proteomics**, **2005**, 5, 2497-2507.
- [98] Kuehner, D. E.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J.M.; *Salt-induced protein precipitation: phase equilibria from an equation of state*, **Fluid Phase Equilib.**, **1996**, 116, 140-147.
- [99] Curtis, R. A.; Lue, L.; *A molecular approach to bioseparations: protein-protein and protein-salt interactions*, **Chem. Eng. Sci.**, **2006**, 61, 907-923.
- [100] Peyre, V.; Lair, V.; André, V.; Maire, G.; Hansen, U. K.; Maire, M.; Møller, J. V.; *Detergent binding as a sensor of hydrophobicity and polar interactions in the binding cavities of proteins*, **Langmuir**, **2005**, 21, 8865-8875.
- [101] Jönsson, M.; Johansson, H. O.; *Protein partitioning in thermoseparating systems of a charged hydrophobically modified ethylene oxide polymer*, **J. Chromatogr. A**, **2003**, 983, 133-144.
- [102] Persson, J.; Johansson, H. O.; Tjerneld, F.; *Purification of protein and recycling of polymers in a new aqueous two-phase system using two thermoseparating polymers*, **J. Chromatogr. A**, **1999**, 864, 31-48.
- [103] Unsworth, L. D.; Sheardown, H.; Brash, J. L.; *Protein resistance of surfaces prepared by sorption of end-thiolated poly(ethylene glycol) to gold: effect of surface chain density*, **Langmuir**, **2005**, 21, 1036-1041.
- [104] Vanderah, D. J.; La, H.; Naff, J.; Silin, V.; Rubinson, K. A.; *Control of protein adsorption: molecular level structural and spatial variables*, **J. Am. Chem. Soc.**, **2004**, 126, 13639-13641.
- [105] Malmsten, M.; Emoto, K.; Alstine, J. M. V.; *Effect of chain density on inhibition of protein adsorption by poly(ethylene glycol) based coatings*, **J. Colloid Interface Sci.**, **1998**, 202, 507-517.
- [106] Damodaran, S.; *Adsorbed layers formed from mixtures of proteins*, **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, **2004**, 9, 328-339.

- [107] Mackie, A. R.; *Structure of absorbed layers of mixtures of proteins and surfactants*, **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, **2004**, 9, 357-361.
- [108] Roth, S.; Murray, B. S.; Dickinson, E.; *Interfacial shear rheology of aged and heat-treated β -lactoglobulin films: displacement by nonionic surfactant*, **J. Agric. Food Chem.**, **2000**, 48, 1491-1497.
- [109] Linke, W. F. (ed.), *Solubilities of inorganic and metal-organic compounds*, Volume I, 4^a edição, **1985**, American Chemical Society, Washington, EUA.
- [110] Shaw, M. M.; Riederer, B. M.; *Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis*, **Proteomics**, **2003**, 3, 1408-1417.
- [111] Ghosh, R.; *Separation of human albumin and IgG by a membrane-based integrated bioseparation technique involving simultaneous precipitation, microfiltration and membrane adsorption*, **J. Membr. Sci.**, **2004**, 237, 109-117.
- [112] Grigsby, J. J.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; *Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions: effect of salt type, salt concentration and pH*, **Biophys. Chem.**, **2001**, 91, 231-243.
- [113] Li, M.; Rharbi, Y.; Huang, X.; Winnik, M. A.; *Small variations in the composition and properties of Triton X-100*, **J. Colloid Interface Sci.**, **2000**, 230, 135-139.
- [114] Charlton, I. D.; Doherty, A. P.; *Electrolyte-induced structural evolution of Triton X-100 micelles*, **J. Phys. Chem. B**, **2000**, 104, 8327-8332.
- [115] Ruiz, C. C.; Aguiar, J.; *Interaction, stability, and microenvironmental properties of mixed micelles of Triton X100 and n-alkyltrimethylammonium bromides: influence of alkyl chain length*, **Langmuir**, **2000**, 16, 7946-7953.
- [116] Kumar, S.; Sharma, D.; Khan, Z. A.; Din, K.; *Salt-induced cloud point in anionic surfactants solutions: role of the headgroup and additives*, **Langmuir**, **2002**, 18, 4205-4209.
- [117] Poteshnova, M. V.; Zadymova, N. M.; *Normal micelles and oil-in-water microemulsions in a water-toluene-tween 80 ternary system*, **Colloid J.**, **2006**, 68, 201-210.
- [118] Gelamo, E. L.; Silva, C. H. T. P.; Imasato, H.; Tabak, M.; *Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modeling*, **Bioch. Biophys. Acta**, **2002**, 1594, 84-99.
- [119] Macias, M. J.; Wiesner, S.; Sudol, M.; *WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands*, **FEBS Letters**, **2002**, 513, 30-37.

- [120] Schimmel, P. R.; Flory, P. J.; *Conformational energy and configuration statistics of poly-L-proline*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **1967**, 58, 52-59.
- [121] Güzey, D.; Gülseren, Í.; Bruce, B.; Weiss, J.; *Interfacial properties and structural conformational of thermosonicated bovine serum albumin*, **Food Hydrocoll.**, **2006**, 20, 669-677.
- [122] Wu, D.; Xu, G.; Sun, Y.; Zhang, H.; Mao, H.; Feng, Y.; *Interaction between proteins and cationic gemini surfactant*, **Biomacromolecules**, **2007**, 8, 708-712.
- [123] Flanagan, R. J.; Morgan, P. E.; Spencer, E. P.; Whelpton, R.; *Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review*, **Biomed. Chromatogr.**, **2006**, 20, 530-538.