



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS

**ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO ISOELÉTRICA DA INSULINA SUÍNA EM
SOLUÇÕES AQUOSAS COM O DIÓXIDO DE CARBONO**

Autor: Alexandre Keiji Tashima
Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho

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

Campinas, SP

Outubro de 2007

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

T181e Tashima, Alexandre Keiji
Estudo da precipitação isoeétrica da insulina suína
em soluções aquosas com o dióxido de carbono /
Alexandre Keiji Tashima. --Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

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

1. Dióxido de carbono. 2. Insulina. 3. Precipitação.
4. Modelagem. 5. Termodinâmica. I. Miranda, Everson
Alves. II. Pessoa Filho, Pedro de Alcântara. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Study of the isoelectric precipitation of porcine insulin in
aqueous solutions with carbon dioxide.

Palavras-chave em Inglês: Carbon dioxide, Insulin, Isoelectric
precipitation, Volatile electrolytes, Phase
equilibrium, Thermodynamic model.

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Carlos Eduardo Calmanovici, Martín Aznar, Paulo de
Tarso Vieira e Rosa e Theo Guenter Kieckbusch.

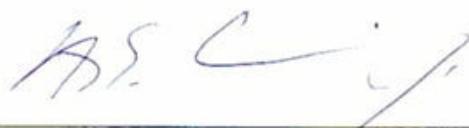
Data da defesa: 04/10/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

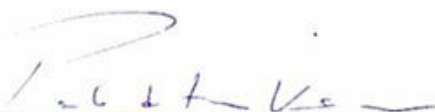
Tese de Doutorado defendida por Alexandre Keiji Tashima e aprovada em 04 de outubro de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Everson Alves Miranda – FEQ/Unicamp
Orientador



Dr. Carlos Eduardo Calmanovici - Braskem



Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa – IQ/Unicamp



Prof. Dr. Martín Aznar – FEQ/Unicamp



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch – FEQ/Unicamp

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Alexandre Keiji Tashima em 04 de outubro de 2007.



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha madrinha Cida,
minha grande incentivadora.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e aos Mestres, por tudo.

Aos meus pais, João e Cecília, que me deram a vida, amor, apoio e compreensão.

A minha madrinha, Cida e ao meu padrinho, Jaci, fortalezas espirituais a me apoiarem e guiarem os caminhos constantemente.

Ao Prof. Rahoma Sadeg Mohamed (*in memoriam*), pelo exemplo de trabalho, dedicação, humanismo e fé, por todo o esforço que empenhou para que conseguíssemos a bolsa e pela grande oportunidade que me deu de iniciar este projeto. Agradeço-lhe por tudo o que fez por mim.

Aos Profs. Everson Alves Miranda e Pedro de Alcântara Pessoa Filho, por terem aceito a orientação e a co-orientação deste trabalho em um difícil momento, e por terem tido paciência, confiança, dedicação e entusiasmo para conduzi-las tão bem, até o fim.

Ao Prof. Theo, pelo apoio em diversos momentos.

Às Profas. Ângela e Sônia pelo uso dos equipamentos de seus laboratórios.

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Aos Profs. Luuk van der Wielen e Marcel Ottens pelo convite para a ida a TU Delft e pelo apoio durante a minha estadia na Holanda.

Ao Prof. Lício Velloso, ao Dennys Cyntra e ao Rodrigo Pauli pelos ensaios de atividade biológica das amostras de insulina.

Aos Profs. e funcionários da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Aos meus grandes amigos, Christian e Tati, pelo companheirismo e incentivo.

Ao amigo Goran, pelos bons momentos de risadas, pelo apoio e pelas frutíferas discussões de trabalho. Aos amigos do grupo do Prof. Rahoma e do DPB por terem compartilhado comigo este bom período de pós-graduação.

A todos os amigos, da faculdade e de fora dela, que me deram apoio e compreensão durante esta fase de minha vida.

A meus irmãos, Priscila e Eduardo, pela torcida, apoio e compreensão.

Ao meu tio Shoiti, minha tia Rosa (*in memoriam*) e aos meus primos, pela acolhida durante grande parte do tempo em que morei em Campinas.

E finalmente, à Yuki, minha grande companheira, que partilha comigo desta caminhada e que torna mais doce e leve o meu viver.

“Existem montanhas ásperas, no entanto, em seguida a cada uma habitualmente se estende a planície por imenso tapete de relva.”

Meimei

“Plantas o milharal e o milharal te responde ao carinho com o tesouro da colheita.”

Emmanuel

RESUMO

A técnica de precipitação é frequentemente utilizada na recuperação de proteínas de soluções aquosas. Uma das formas de se realizá-la é através do processo de precipitação isoeletrica, que consiste no ajuste do pH do meio ao valor em que a proteína tem carga global nula, ou seja, no ponto isoeletrico, pI. Ácidos e bases minerais são normalmente utilizados para ajustar o pH do meio ao pI e provocar a precipitação de proteínas. Contudo, para se obter proteínas de alta pureza e evitar a poluição do meio com resíduos indesejáveis, há a necessidade de um processo adicional para a neutralização da solução e remoção dos sais gerados. Além disso, concentrações locais elevadas dos ácidos podem causar a desnaturação da proteína de interesse. Estudos recentes vêm apontando a utilização de eletrólitos voláteis como uma alternativa promissora aos agentes de precipitação convencionalmente empregados na recuperação de proteínas. Eletrólitos voláteis são obtidos pela dissolução de gases como o dióxido de carbono em solução aquosa; nesta dissolução formam-se íons, cujas concentrações dependem da temperatura e pressão do sistema. Biomoléculas de interesse farmacêutico, como a insulina, por exemplo, podem ser potencialmente recuperadas por processos de precipitação isoeletrica com o CO₂.

Assim, neste projeto realizou-se um estudo experimental e teórico da precipitação isoeletrica da insulina suína com dióxido de carbono, avaliando-se a influência dos parâmetros de processo como a temperatura, pressão e concentrações de eletrólitos e de proteínas sobre a precipitação. A cinética de variação de pH devida à acidificação das soluções contendo a insulina foi determinada, assim como a cinética de precipitação da proteína. A utilização do bicarbonato de sódio como agente tamponante, em conjunto com o ácido carbônico formado em solução, permitiu que os estudos de equilíbrio fossem realizados sem a necessidade de nenhum componente adicional para o controle do pH do sistema. Dados de solubilidade da insulina suína foram obtidos entre as temperaturas de 5 e 25°C, até a pressão de 16 bar de CO₂. Estes dados foram correlacionados por um modelo termodinâmico em que a proteína em solução foi considerada como um eletrólito, o que permitiu uma análise do efeito de forças eletrostáticas sobre a solubilidade da proteína.

Palavras chave: dióxido de carbono, insulina, precipitação, modelagem, termodinâmica.

ABSTRACT

Precipitation is a technique frequently employed in downstream process for the recovery of proteins from aqueous solutions. One example of such technique is the isoelectric precipitation, which consists of the adjustment of solution pH to the value where the protein has zero net charge, the isoelectric point, pI. Commonly, mineral acids and bases are used for pH adjustment and to induce protein precipitation. However, in order to obtain high purity proteins and avoid environmental pollution, an additional process is needed to neutralize and remove residual salts. It is also necessary to take into account the fact that local pH extremes can cause denaturation of the targeted protein. Recent works have pointed the use of volatile electrolytes as promising alternatives to the precipitating agents conventionally utilized in protein recovery. Volatile electrolytes are obtained by dissolution of gases as carbon dioxide in aqueous solutions. In this process, the volatile electrolyte dissociates into ions, whose concentrations depend on system pressure and temperature. Biomolecules of pharmaceutical interest as insulin, for instance, may be potentially recovered by isoelectric precipitation process with carbon dioxide.

Thus, in this project an experimental and theoretical study of the isoelectric precipitation of porcine insulin with carbon dioxide was conducted, in order to evaluate the influence of parameters such as temperature, pressure and concentrations of electrolytes and protein over the precipitation process. Kinetics of pH variation due to acidification of the insulin solutions was determined, as well as protein precipitation kinetics. The use of sodium bicarbonate as buffer agent with carbonic acid produced in solution allowed the equilibrium studies be conducted without the need of any additional component to control system pH. Solubility data of porcine insulin were obtained in the temperature range of 5 to 25°C and up to CO₂ pressures of 16 bar. These data were correlated by a thermodynamic model in which the protein in solution was considered as an electrolyte, which allowed an analysis of electrostatic force effects over protein solubility.

Keywords: carbon dioxide, insulin, isoelectric precipitation, volatile electrolytes, phase equilibrium, thermodynamic model.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Colocação do problema | 3 |
| 1.2. Objetivo..... | 4 |
| 1.3. Plano de trabalho desenvolvido | 5 |
| | |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 2.1. Precipitação isoelétrica de proteínas..... | 7 |
| 2.2. Precipitação isoelétrica de proteínas com o CO₂ | 13 |
| 2.3. Modelos termodinâmicos de eletrólitos voláteis..... | 17 |
| 2.3.1. Modelo de eletrólitos de Pitzer (1973)..... | 17 |
| 2.3.2. Modelo de eletrólitos voláteis de Edwards <i>et al.</i> (1975, 1978)..... | 20 |
| 2.3.3. Sistemas de eletrólitos contendo o bicarbonato de sódio..... | 24 |
| 2.4. Modelos para o equilíbrio de fases de sistemas contendo biomoléculas | 25 |
| 2.4.1. Fundamentos de solubilidade..... | 25 |
| 2.4.2 Modelos para o equilíbrio de fases de sistemas contendo aminoácidos | 27 |
| 2.4.3 Modelos para o equilíbrio de fases de sistemas contendo proteínas | 29 |
| 2.5. Insulina..... | 35 |
| | |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 3.1. Materiais | 43 |
| 3.2. Equipamento para a precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis | 43 |
| 3.3. Métodos experimentais..... | 50 |
| 3.3.1 Preparação das soluções de insulina suína para os experimentos de precipitação | 50 |

| | |
|---|--------|
| 3.3.2. Medidas de pH da água e de soluções de NaHCO ₃ pressurizada por CO ₂ | 50 |
| 3.3.3. Cinética da precipitação isoeletrica da insulina suína com o CO ₂ | 51 |
| 3.3.3.1. Determinação do pH de equilíbrio nos ensaios cinéticos..... | 52 |
| 3.3.3.2. Determinação da concentração de equilíbrio de insulina | 53 |
| 3.3.4. Solubilidade da insulina suína na precipitação isoeletrica com o CO ₂ | 53 |
| 3.3.5. Precipitação isoeletrica da insulina suína com o CO ₂ para os ensaios de atividade biológica | 54 |
| 3.3.6 Precipitação isoeletrica da insulina suína com ácido fosfórico para os ensaios de atividade biológica | 54 |
| 3.4. Métodos analíticos..... | 55 |
| 3.4.1. Medidas de concentração da insulina em solução..... | 55 |
| 3.4.2. Medida da quantidade de Zn da insulina suína..... | 55 |
| 3.4.3. Análise dos precipitados por microscopia eletrônica de varredura..... | 55 |
| 3.4.4. Análise de atividade biológica da insulina suína..... | 56 |
| 3.5. Métodos estatísticos | 57 |
| 3.5.1. Estimativa do erro experimental das medidas de solubilidade | 57 |
| 3.5.2. Teste-t de Student para comparação entre populações..... | 58 |
| 4. MODELO TERMODINÂMICO..... | 59 |
| 4.1. Fundamentos termodinâmicos..... | 60 |
| 4.2. Modelagem do equilíbrio do sistema CO ₂ /H ₂ O/NaHCO ₃ | 63 |
| 4.3. Modelagem do equilíbrio do sistema CO ₂ /H ₂ O/NaHCO ₃ /insulina suína | 70 |
| 4.3.1 Cálculo da solubilidade da proteína..... | 70 |
| 4.3.2 Ajuste dos parâmetros de interação binários..... | 74 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO I – EXPERIMENTAL..... | 77 |
| 5.1. Estudos cinéticos da precipitação isoeletrica da insulina suína com o CO ₂ | 77 |
| 5.1.1. Cinética de variação do pH da solução pela acidificação com o CO ₂ | 78 |
| 5.1.2. Cinética de precipitação de insulina suína pelo CO ₂ | 83 |
| 5.1.3. Influência da concentração inicial de insulina | 86 |
| 5.2. Solubilidade da insulina suína na precipitação isoeletrica com o CO ₂ | 89 |

| | |
|--|------------|
| 5.3. Atividade biológica da insulina suína obtida por precipitação isoelétrica | 95 |
| 5.3.1. Atividade biológica da insulina suína precipitada por CO ₂ | 96 |
| 5.3.2. Atividade biológica da insulina suína precipitada por H ₃ PO ₄ | 103 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO II – MODELO TERMODINÂMICO | 107 |
| 6.1. Modelagem do equilíbrio do sistema CO ₂ /H ₂ O/NaHCO ₃ | 107 |
| 6.2. Modelagem do equilíbrio do sistema CO ₂ /H ₂ O/NaHCO ₃ /insulina suína | 111 |
| 6.2.1. Cálculo da carga global da molécula de insulina suína..... | 111 |
| 6.2.2. Resolução do equilíbrio de fases do sistema CO ₂ /H ₂ O/NaHCO ₃ /insulina suína | 116 |
| 7. CONCLUSÕES | 135 |
| 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 137 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 139 |
| APÊNDICE A – CORRELAÇÕES..... | 157 |
| A.1. Constante de Henry | 157 |
| A.2. Pressão de saturação da água | 157 |
| A.3. Densidade da água | 158 |
| A.4. Constante dielétrica da água..... | 158 |
| A.5. Constantes de dissociação..... | 159 |
| A.6. Volume molar parcial do CO ₂ em água à diluição infinita | 160 |
| A.7. Segundo coeficiente do virial para o CO ₂ puro | 160 |
| APÊNDICE B – PARÂMETROS DE INTERAÇÃO DO MODELO DE PITZER... 161 | |
| B.1. CO ₂ – HCO ₃ ⁻ | 161 |
| B.2. NaHCO ₃ | 161 |
| APÊNDICE C – CÁLCULO DA CARGA GLOBAL DA MOLÉCULA DE PROTEÍNA | 163 |

| | |
|--|------------|
| APÊNDICE D – CONSTANTES FUNDAMENTAIS..... | 165 |
| APÊNDICE E – DADOS EXPERIMENTAIS DOS ESTUDOS CINÉTICOS..... | 167 |
| APÊNDICE F – DADOS EXPERIMENTAIS DOS ESTUDOS DE EQUILÍBRIO .. | 169 |
| APÊNDICE G – DADOS DOS SISTEMAS DE ELETRÓLITOS..... | 173 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1** – Esquema do plano de trabalho para a realização deste estudo.....6
- Figura 2.1** – Perfil de solubilidade das proteínas de soja medidas pela porcentagem de nitrogênio extraído em soluções de diversos ácidos e bases (Smith e Circle, 1938).....9
- Figura 2.2** – Solubilidade da ribonuclease Sa em função do pH do meio: (○) proteína original; (●) proteína modificada por três lisinas (3K); (△) proteína modificada por cinco lisinas (5K). As linhas não tem significado teórico (Shaw *et al.*, 2001)..... 10
- Figura 2.3** – Imagens de microscopia eletrônica dos precipitados de proteína de soja obtidos por (Hofland *et al.*, 2000): A – precipitação isoelétrica com CO₂; B – precipitação isoelétrica com ácido sulfúrico.....15
- Figura 2.4** – Equilíbrio líquido-vapor de um sistema composto pela fase aquosa e um eletrólito volátil (Edwards *et al.*, 1975).21
- Figura 2.5** – Curvas de solubilidade de diferentes frações (B, C e C') de quimotripsina (Butler, 1940). Nota-se que Mg representa o elemento magnésio e a abreviação de miligramas nos eixos x e y da figura.27
- Figura 2.6** – Solubilidade experimental e calculada para a glicina a 298,15 K (Pinho *et al.*, 1994).28
- Figura 2.7** – Efeito do pH sobre o logaritmo da solubilidade da insulina a várias concentrações de NaCl e KCNS totalizando 0,1 M: (○) NaCl 0,1 M; (□) NaCl 0,08 M – KCNS 0,02 M; (△) NaCl 0,05 M – KCNS 0,05 M; (▽) KCNS 0,1 M. As curvas são os valores calculados pela equação 2.12 (Fredericq e Neurath 1950).33
- Figura 2.8** – Estrutura primária das insulina suína. A insulina possui duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto (adaptado de Berg *et al.*, 2002).....37

| | |
|--|----|
| Figura 2.9 – Estruturas tridimensionais da insulina suína criadas a partir do arquivo 9INS.PDB (Gursky <i>et al.</i> , 1992) no programa Protein Explorer 2.80. (A) representação das estruturas helicoidais da molécula em rosa e das pontes dissulfeto em amarelo; (B) aminoácidos colorizados de acordo com a sua natureza: (■) hidrofóbicos; (■) polares; (■) ionizáveis com carga positiva (NH_x^+); (■) ionizáveis com carga negativa (COO^-); (■) estrutura da cadeia polipeptídica..... | 38 |
| Figura 2.10 – Dímero de insulina suína. A estrutura foi criada a partir do arquivo 4INS.PDB (Baker <i>et al.</i> , 1988) no programa Rasmol 2.4. | 40 |
| Figura 2.11 – Hexâmero de insulina humana. A estrutura foi criada a partir do arquivo 3AIY.PDB (O'Donoghue <i>et al.</i> , 2000) no programa Rasmol 2.4..... | 41 |
| Figura 2.12 – Passos para a formação do hexâmero de insulina suína a partir das unidades monoméricas e diméricas (adaptado de Dunn, 2005). As estruturas foram criadas a partir do arquivo 4INS.PDB (Baker <i>et al.</i> , 1988)..... | 42 |
| Figura 3.1 – Imagem do equipamento para a precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis..... | 44 |
| Figura 3.2 – Partes do equipamento: A: algema; B: jaqueta térmica; C: unidade de precipitação; D: janelas de quartzo acomodadas em peças de aço inox 316. | 44 |
| Figura 3.3 – Sistema combinado de fechamento da unidade de precipitação com a algema e parafusos..... | 44 |
| Figura 3.4 – Esquema do equipamento para a precipitação de proteínas por eletrólitos voláteis. L-01 e L-02: linhas de entrada de CO_2 e NH_3 , respectivamente; P-01 e P-02: manômetros das linhas de entrada; VR-01 e VR-02: válvulas de retenção; V-01 e V-02: válvulas micrométricas de entrada; F-01: filtro de linha; E-01 e E-02: janelas de quartzo para observação; TF-01: barra magnética recoberta por teflon para agitação da solução; F-02: filtro para amostragem da fase líquida; P-03: manômetro do reator; V-03: válvula micrométrica da fase vapor; V-04: válvula micrométrica da fase líquida; T-01 e T-02: termopares da fase líquida e da fase vapor; pH-01: sensor de pH do reator. | 46 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.5 – Tubulação de PEEK de 1/16” (de cor laranja) para a retirada de amostras da fase líquida..... | 47 |
| Figura 3.6 – Filtro de seringa de 0,2 µm para a retenção dos precipitados, acoplado ao tubo de PEEK na parte superior e a uma tubulação de borracha na parte inferior, que permanece imersa na fase líquida. | 47 |
| Figura 3.7 – Inserção da unidade de precipitação na jaqueta térmica. | 48 |
| Figura 3.8 – Fixação e vedação da unidade de precipitação pelo encaixe das janelas de quartzo e do sensor de pH..... | 48 |
| Figura 3.9 – Barra de agitação magnética apoiada em uma estrutura de teflon. | 49 |
| Figura 3.10 – Barra magnética posicionada na unidade de precipitação..... | 49 |
| Figura 3.11 – “Webcam” utilizada para a aquisição de dados dos painéis de instrumentação..... | 49 |
| Figura 3.12 – Imagem típica dos painéis de instrumentação capturada pela “webcam”.... | 49 |
| Figura 4.1 – Representação do equilíbrio líquido-vapor e dos equilíbrios químicos do sistema composto por CO ₂ , H ₂ O e NaHCO ₃ | 64 |
| Figura 4.2 – Algoritmo para o cálculo das composições e do pH de equilíbrio na fase líquida do sistema CO ₂ /H ₂ O/NaHCO ₃ | 69 |
| Figura 4.3 - Representação dos equilíbrios sólido-líquido-vapor e dos equilíbrios químicos do sistema composto por CO ₂ /H ₂ O/NaHCO ₃ /proteína..... | 70 |
| Figura 4.4 – Algoritmo para o cálculo do equilíbrio químico e de fases do sistema composto por CO ₂ /H ₂ O/NaHCO ₃ /proteína..... | 75 |
| Figura 5.1 – Valor de pH em função do tempo da solução de NaHCO ₃ 10 mM a 25°C sob CO ₂ a 1 bar. (A) em escala linear; (B) em escala logarítmica: (○) dados experimentais e (---) valor ajustado da solução de 0,62 mg/mL de insulina suína sem agitação; (◇) dados experimentais e (—) valor ajustado solução de 0,61 mg/mL de insulina suína sob agitação de 480 rpm. | 80 |

Figura 5.2 – Concentração de íons H^+ em função do tempo na solução de $NaHCO_3$ 10 mM a $25^\circ C$ sob CO_2 a 1 bar: (\circ) solução de 0,62 mg/mL de insulina suína sem agitação; (\diamond) solução de 0,61 mg/mL de insulina suína sob agitação de 480 rpm..... 80

Figura 5.3 – Valores de pH em função do tempo das soluções de insulina suína em $NaHCO_3$ 10 mM a $25^\circ C$ sob pressão de CO_2 e sob agitação de 480 rpm: (\diamond) dados experimentais; (—) ajuste pela função de decaimento exponencial de segunda ordem. (A) Pressão de CO_2 de 1,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,96 mg/mL; (B) pressão de CO_2 de 2,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,85 mg/mL.....81

Figura 5.4 – Valores de pH em função do tempo das soluções de insulina suína em $NaHCO_3$ 10 mM a $25^\circ C$ sob pressão de CO_2 e sob agitação de 480 rpm: (\diamond) dados experimentais; (—) ajuste pela função de decaimento exponencial de segunda ordem. (A) Pressão de CO_2 de 3,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,94 mg/mL; (B) pressão de CO_2 de 5,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,87 mg/mL; (C) pressão de CO_2 de 9,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,79 mg/mL; (D) pressão de CO_2 de 16,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 1,27 mg/mL.82

Figura 5.5 – Concentração de insulina suína em função do tempo em soluções de $NaHCO_3$ 10 mM a $25^\circ C$ sob pressão de CO_2 e sob agitação de 480 rpm: (\square) dados experimentais com barras de erro; (—) ajuste pela função de decaimento exponencial de primeira ordem. (A) Pressão de CO_2 de 1,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,96 mg/mL; (B) pressão de CO_2 de 2,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,85 mg/mL.....84

Figura 5.6 – Concentração de insulina suína em função do tempo em soluções de $NaHCO_3$ 10 mM a $25^\circ C$ sob pressão de CO_2 e sob agitação de 480 rpm: (\square) dados experimentais com barras de erro; (—) ajuste pela função de decaimento exponencial de primeira ordem. (A) Pressão de CO_2 de 3,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,94 mg/mL; (B) pressão de CO_2 de 5,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,87 mg/mL; (C) pressão de CO_2 de 9,0 bar e concentração inicial

de insulina suína de 0,79 mg/mL; (D) pressão de CO₂ de 16,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 1,27 mg/mL.....85

Figura 5.7 – Valores de pH das soluções de insulina suína em função do tempo em soluções de NaHCO₃ 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm e sob variadas condições de pressão de CO₂ e concentrações iniciais de insulina suína. (A) 1 bar: (◇) 0,61 mg/mL; (+) 0,84 mg/mL; (□) 0,96 mg/mL; (B) 2 bar: (◇) 0,52 mg/mL; (+) 0,85 mg/mL; (C) 3 bar: (◇) 0,78 mg/mL; (+) 0,94 mg/mL; (D) 9 bar e (◇) 0,79 mg/mL; (+) 0,81 mg/mL.....85

Figura 5.8 – Concentrações de insulina suína em função do tempo em soluções de NaHCO₃ 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm e sob variadas condições de pressão de CO₂ e concentrações iniciais de insulina suína. (A) 1 bar: (◇) 0,61 mg/mL; (○) 0,84 mg/mL; (□) 0,96 mg/mL; (B) 2 bar: (◇) 0,52 mg/mL; (○) 0,85 mg/mL; (C) 3 bar: (◇) 0,78 mg/mL; (○) 0,94 mg/mL; (D) 9 bar e (◇) 0,79 mg/mL; (○) 0,81 mg/mL.....88

Figura 5.9 – Valores de pH das soluções em função da pressão de CO₂. (A) temperatura de 5°C: (◇) soluções de insulina suína em NaHCO₃ 10 mM; (◆) solução de NaHCO₃ 10 mM; (B) temperatura de 15°C: (□) soluções de insulina suína em NaHCO₃ 10 mM; (■) solução de NaHCO₃ 10 mM; (C) temperatura de 25°C: (○) soluções de insulina suína em NaHCO₃ 10 mM; (●) solução de NaHCO₃ 10 mM.....88

Figura 5.10 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 5°C: (A) solubilidade em função da pressão de CO₂; (B) solubilidade em função do pH de equilíbrio.92

Figura 5.11 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 15°C: (A) solubilidade em função da pressão de CO₂; (B) solubilidade em função do pH de equilíbrio.....90

Figura 5.12 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 25°C: (A) solubilidade em função da pressão de CO₂; (B) solubilidade em função do pH de equilíbrio.93

Figura 5.13 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a (◆) 5°C, (□) 15°C e (○) 25°C: (A) solubilidade em função da pressão de CO₂; (B) solubilidade em função do pH de equilíbrio.93

| | |
|--|-----|
| Figura 5.14 – Fotomicrografia dos precipitados de insulina suína obtidos a 5°C em NaHCO ₃ 10 mM, 1,6 bar de CO ₂ e pH de equilíbrio 5,37. Ampliação de 5.000 x por microscopia eletrônica de varredura. | 95 |
| Figura 5.15 – Estimativas de pH em função da pressão para soluções de NaHCO ₃ a 25°C nas concentrações: (—) 10 mM; (---) 20 mM; (···) 50 mM NaHCO ₃ . Os pontos de intersecção das curvas com a linha paralela ao eixo x indicam o pI da insulina suína. | 97 |
| Figura 5.16 – Variação de pH em função do tempo das soluções de insulina suína a 25°C nas condições experimentais: (◇) NaHCO ₃ 10 mM, 3 bar de CO ₂ ; (□) NaHCO ₃ 20 mM, 6 bar de CO ₂ ; (○) NaHCO ₃ 50 mM, 16 bar de CO ₂ | 98 |
| Figura 5.17 – Curvas de queda de glicemia em camundongos em função do tempo após a injeção de insulina: (—○—) controle de insulina humana; (—■—) controle de insulina suína. | 100 |
| Figura 5.18 – Curvas de queda de glicemia em camundongos: (—■—) controle de insulina suína; amostras precipitadas por CO ₂ a 25°C nas condições: (—+—) 3 bar e NaHCO ₃ 10 mM; (—Δ—) 6 bar e NaHCO ₃ 20 mM; (—◇—) 16 bar e NaHCO ₃ 50 mM. | 99 |
| Figura 5.19 – Curvas de queda percentual de glicemia: (—■—) padrão de insulina suína; amostras precipitadas por CO ₂ a 25°C nas condições: (—+—) 3 bar e NaHCO ₃ 10 mM; (—Δ—) 6 bar e NaHCO ₃ 20 mM; (—◇—) 16 bar e NaHCO ₃ 50 mM. | 102 |
| Figura 5.20 – Variação de pH em função do tempo das soluções de insulina suína a 25°C no processo de precipitação isoeletrica com H ₃ PO ₄ 2,0 M nas seguintes concentrações de Na ₂ HPO ₄ : (◇) 10 mM; (□) 20 mM; (○) 50 mM. | 105 |
| Figura 5.21 – Curvas de queda de glicemia dos camundongos do controle de insulina suína (—■—) e das amostras de insulina suína precipitadas por H ₃ PO ₄ 2,0 M a 25°C em: Na ₂ HPO ₄ 10 mM (—+—); Na ₂ HPO ₄ 20 mM (—Δ—); Na ₂ HPO ₄ 50 mM (—◇—). | 105 |
| Figura 5.22 – Curvas de queda percentual de glicemia dos camundongos do controle de insulina suína (—■—) e das amostras de insulina suína precipitadas por H ₃ PO ₄ 2 M a 25°C em: Na ₂ HPO ₄ 10 mM (—+—); Na ₂ HPO ₄ 20 mM (—Δ—); Na ₂ HPO ₄ 50 mM (—◇—). | 106 |

| | |
|--|-----|
| Figura 6.1 – pH de equilíbrio da água em função da pressão de CO ₂ . (+) Dados experimentais deste trabalho a 25°C; (∇) dados de Meyassami <i>et al.</i> (1992) a 32°C; (△) dados de Hofland <i>et al.</i> (2000) a 25°C; (—) pH calculado pelo modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978) a 25°C..... | 108 |
| Figura 6.2 – Valores de pH de equilíbrio das soluções de NaHCO ₃ em função da pressão de CO ₂ . Símbolos representam os valores experimentais e linhas os valores calculados pelo modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978): (◇, —) NaHCO ₃ 10 mM e 5°C; (□, ---) NaHCO ₃ 10 mM e 15°C; (○, --) NaHCO ₃ 10 mM e 25°C; (■, ...) NaHCO ₃ 50 mM e 15°C..... | 110 |
| Figura 6.3 – Carga global da insulina suína calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch (Stryer, 1995): (—) valores típicos de pK_a dos aminoácidos isolados (Stryer, 1995); (---) valores de pK_a experimentais obtidos para a insulina humana 1 mM em GdHCl 6 M (Kaarsholm <i>et al.</i> 1990). Faixas de pH: (A) de 0 a 14; (B) de 4,0 a 6,0..... | 114 |
| Figura 6.4 – Quadrado da carga global da insulina suína (z_{IS}^2) em função do pH: (—) valores típicos de pK_a dos aminoácidos isolados (Stryer, 1995); (---) valores de pK_a experimentais obtidos para a insulina humana 1 mM em GdHCl 6 M (Kaarsholm <i>et al.</i> , 1990). Faixas de pH: (A) de 0 a 14; (B) de 4,0 a 6,0..... | 113 |
| Figura 6.5 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO ₃ 10 mM a 5°C: (A) em função da pressão de CO ₂ ; (B) em função do pH da solução. (◆) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978) apenas com o termo de longo alcance do modelo de Pitzer (1973); (---) inclusão do termo de interação β_{IS,CO_2}^0 | 120 |
| Figura 6.6 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO ₃ 10 mM a 15°C: (A) em função da pressão de CO ₂ ; (B) em função do pH da solução. (■) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978) apenas com o termo de longo alcance do modelo de Pitzer (1973); (---) inclusão do termo de interação β_{IS,CO_2}^0 | 121 |

- Figura 6.7** – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 25°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (●) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) apenas com o termo de longo alcance do modelo de Pitzer (1973); (---) inclusão do termo de interação β_{IS,CO_2}^0 .
.....119
- Figura 6.8** – Comparação da fração mássica do monômero (a) e do hexâmero (b) de insulina bovina em função da concentração mássica total para a insulina sem Zn (—) e com Zn (---) em tampão de Tris-HCl/NaCl, pH 7,0 e $I = 0,2$ a 25°C (Milthorpe *et al.*, 1977).
.....124
- Figura 6.9** – Cargas dos multímeros de insulina suína utilizando-se os valores de pK_a dos aminoácidos livres (Stryer, 1995) e a proporção de cargas dada por Nettleton *et al.* (2000): (—) monômero; (—) dímero; (—) tetrâmero; (—) hexâmero.
.....127
- Figura 6.10** – Quadrado das cargas dos multímeros de insulina suína utilizando-se os valores de pK_a dos aminoácidos livres (Stryer, 1995) e a proporção de cargas dada por Nettleton *et al.* (2000): (—) monômero; (—) dímero; (—) tetrâmero; (—) hexâmero.
.....127
- Figura 6.11** – Valores de pH de soluções saturadas de insulina suína em NaHCO₃ 10 mM em função da pressão de CO₂. (A): (◇) dados experimentais a 5°C; (B): (□) dados experimentais a 15°C; (C): (○) dados experimentais a 25 °C. (—) valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k .
.....130
- Figura 6.12** – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 5°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (◆) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k .
.....131
- Figura 6.13** – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 15°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (■) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k .
.....131
- Figura 6.14** – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 25°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (●) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k .
.....132

Figura 6.15 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO_3 10 mM: (A) em função da pressão de CO_2 ; (B) em função do pH. Dados experimentais: (\blacklozenge) 5°C; (\square) 15°C; (\circ) 25°C. Valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k : (\cdots) 5°C; ($---$) 15°C; ($---$) 25°C.132

Figura 6.16 – Coeficientes de atividade da insulina suína em NaHCO_3 10 mM: (A) em função da pressão de CO_2 ; (B) em função do pH. Valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k : (\cdots) 5°C; ($---$) 15°C; ($---$) 25°C.....134

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 2.1 – Valores de pI de algumas proteínas (Belter <i>et al.</i> , 1988; Voet e Voet, 1990). | 11 |
| Tabela 2.2 – Estudos de equilíbrio líquido-vapor ou sólido-líquido-vapor de sistemas compostos por NH ₃ e CO ₂ em equilíbrio com uma fase aquosa utilizando o modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978)..... | 23 |
| Tabela 5.1 – Valores de concentração inicial de insulina suína para os experimentos de precipitação por CO ₂ em soluções de NaHCO ₃ a 25°C sob agitação de 480 rpm..... | 86 |
| Tabela 5.2 – Estimativas de erro experimental das medidas de pH em soluções de insulina suína em NaHCO ₃ sob pressão de CO ₂ | 90 |
| Tabela 5.3 – Estimativas de erro experimental das medidas de solubilidade de insulina suína em NaHCO ₃ sob pressão de CO ₂ | 91 |
| Tabela 5.4 – Condições experimentais de precipitação da insulina suína por CO ₂ para realização de ensaios biológicos..... | 97 |
| Tabela 5.5 – Resultados do nível de glicemia dos camundongos como medida de atividade biológica da insulina precipitada por CO ₂ | 99 |
| Tabela 5.6 – Valores de K_{itt} e dados da análise estatística para os controles de insulina humana e suína..... | 100 |
| Tabela 5.7 – Valores de K_{itt} e dados da análise estatística para os controles de insulina humana e suína..... | 102 |
| Tabela 5.8 – Condições experimentais de precipitação da insulina suína por H ₃ PO ₄ 2,0 M... | 103 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 5.9 – Resultados do nível de glicemia dos camundongos como medida de atividade biológica da insulina precipitada por H_3PO_4 2,0 M..... | 104 |
| Tabela 5.10 – Valores de K_{it} e dados da análise estatística para os controles de insulina humana e suína..... | 106 |
| Tabela 6.1 – Erros médios entre os valores de pH de equilíbrio experimentais e os calculados pelo modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978). | 110 |
| Tabela 6.2 – Valores de pK_a das cadeias ionizáveis da insulina suína. | 113 |
| Tabela 6.3 – Solubilidade experimental da insulina suína em $NaHCO_3$ 10 mM sob pressão de CO_2 nas proximidades do pI. | 116 |
| Tabela 6.4 – Lista dos parâmetros de interação binários do modelo de eletrólitos de Pitzer (1973) para o sistema $CO_2/H_2O/NaHCO_3$ /insulina suína. | 118 |
| Tabela 6.5 – Erros médios entre os valores experimentais e calculados da solubilidade da insulina suína em $NaHCO_3$ 10 mM sob atmosfera de CO_2 | 120 |
| Tabela 6.6 – Solubilidade da insulina suína em função da pressão de CO_2 e concentração de $NaHCO_3$ | 123 |
| Tabela 6.7 – Erros médios entre os valores experimentais e calculados da solubilidade da insulina suína em $NaHCO_3$ 10 mM sob atmosfera de CO_2 | 133 |
| Tabela A.1 – Constantes da equação empírica para o cálculo de $H_{CO_2}^{(P^S)}$ para o CO_2 em água entre 273 e 523 K..... | 157 |
| Tabela A.2 – Constantes da equação de Saul e Wagner (1987) para o cálculo da pressão de saturação da água. | 158 |
| Tabela A.3 – Constantes da equação de Saul e Wagner (1987) para o cálculo da densidade da água. | 158 |
| Tabela A.4 – Constantes da equação de Bradley e Pitzer (1979). | 159 |
| Tabela A.5 – Parâmetros da equação empírica para o cálculo das constantes de dissociação. | 159 |
| Tabela A.6 – Volume molar parcial do CO_2 | 160 |

| | |
|--|-----|
| Tabela B.1 – Constantes da equação para o cálculo dos parâmetros do NaHCO ₃ | 161 |
| Tabela D.1 – Valores das constantes utilizadas neste trabalho..... | 165 |
| Tabela E.1 – Dados experimentais, valores dos parâmetros da função de decaimento exponencial de segunda ordem ajustados aos dados cinéticos de pH das soluções de insulina suína e o tempo necessário para que a variação de pH fosse < 0,01 ($t_{0,01}$). Soluções de insulina suína em NaHCO ₃ 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm e variadas condições de pressão de CO ₂ | 167 |
| Tabela E.2 – Dados experimentais, valores dos parâmetros da função de decaimento exponencial de segunda ordem ajustados aos dados cinéticos de pH das soluções de insulina suína e o tempo necessário para que a variação de pH fosse < 0,01 ($t_{0,01}$). Soluções de insulina suína em NaHCO ₃ 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm e variadas condições de pressão de CO ₂ | 168 |
| Tabela F.1 – Dados experimentais de pressão, concentrações iniciais e de equilíbrio de insulina suína e pH de equilíbrio em soluções de NaHCO ₃ 10 mM a 5°C sob agitação de 480 rpm. | 169 |
| Tabela F.2 – Dados experimentais de pressão, concentrações iniciais e de equilíbrio de insulina suína e pH de equilíbrio em soluções de NaHCO ₃ 10 mM a 15°C sob agitação de 480 rpm..... | 170 |
| Tabela F.3 – Dados experimentais de pressão, concentrações iniciais e de equilíbrio de insulina suína e pH de equilíbrio em soluções de NaHCO ₃ 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm..... | 171 |
| Tabela G.1 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978) com os respectivos erros para o sistema CO ₂ /H ₂ O a 25°C. | 173 |
| Tabela G.2 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978) com os respectivos erros para o sistema CO ₂ /NaHCO ₃ 10 mM a 5°C. | 173 |
| Tabela G.3 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards <i>et al.</i> (1978) com os respectivos erros para o sistema CO ₂ /NaHCO ₃ 10 mM a 15°C. | 174 |

Tabela G.4 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) com os respectivos erros para o sistema CO₂/NaHCO₃ 50 mM a 15°C.174

Tabela G.5 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) com os respectivos erros para o sistema CO₂/NaHCO₃ 10 mM a 25°C.175

NOMENCLATURA

Letras latinas

| | |
|------------|--|
| a_i | Atividade do componente i |
| a_w | Atividade da água |
| A_γ | Parâmetro da equação de Debye-Hückel e de Debye-Hückel estendida |
| A_ϕ | Parâmetro do modelo de Pitzer (1973) |
| A_1 | Parâmetro das equações 3.1 e 3.2 |
| A_2 | Parâmetro da equação 3.1 |
| b | Constante do modelo de Pitzer (1973) |
| B_i | Segundo coeficiente virial do componente i |
| c | Número de componentes de um sistema em equilíbrio |
| C_{IS} | Concentração de insulina suína da equação 3.2 |
| C_{ISO} | Parâmetro da equação 3.2 |
| D | Constante dielétrica do meio |
| e | Carga elementar |
| F | Número de graus de liberdade de um sistema em equilíbrio |
| f_i | Fugacidade do componente i |
| F_{obj} | Função objetivo |
| G^{EX} | Energia livre de Gibbs de excesso |

| | |
|--------------|---|
| ΔG^0 | Variação da energia livre de Gibbs de cristalização |
| H_i | Constante de Henry do componente i |
| ΔH^0 | Variação da entalpia de cristalização |
| I | Força iônica |
| i | Número de monômeros que compõem o multímero de insulina suína |
| K | Constante da equação de Cohn, constante da equação 2.13 |
| k | Fator multiplicador da carga do monômero de insulina suína para a população de multímeros |
| k_B | Constante de Boltzmann |
| K_i | Constante de dissociação do componente i |
| k_i | Fator multiplicador da carga do monômero de insulina suína para o multímero i |
| K_{itt} | Taxa de desaparecimento de glicose |
| m_i | Molalidade do componente i |
| M_w | Massa molecular da água |
| n | Número de valores experimentais na equação 4.37 |
| N_A | Número de avogadro |
| n_i | Quantidade de matéria do componente i |
| n_j | Número de repetições experimentais |
| n_w | Número de moles de água |
| p | Significância do teste-t de Student |
| P | Pressão |
| pH_0 | Valor de pH para o qual ocorre o mínimo de solubilidade |
| pH_0 | Parâmetro da equação 3.1 |

| | |
|--------------------|---|
| pK_a | Valor de pH no qual o grupo ionizável está 50% dissociado |
| q_i | Carga da partícula i |
| R | Constante universal dos gases |
| r | Distância de separação entre duas partículas carregadas |
| S | Solubilidade |
| s | Erro experimental |
| s^2 | Variância experimental |
| s_i^2 | Variância amostral |
| S_0 | Valor mínimo de solubilidade |
| s_D | Desvio padrão da diferença entre médias |
| s_i | Desvio padrão |
| ΔS^0 | Varição da entropia de cristalização |
| T | Temperatura |
| t | Tempo de experimento, valor encontrado na distribuição de Student |
| t_1 | Parâmetro das equações 3.1 e 3.2 |
| $t_{1/2}$ | Tempo para a queda de glicemia à metade do valor de referência |
| t_2 | Parâmetro da equação 3.1 |
| \bar{v}_i^∞ | Volume molar parcial do soluto i à diluição infinita |
| x_i | Valor experimental da amostra i |
| \bar{x} | Média amostral para o teste-t de Student |
| y_j | Valor experimental da amostra j |

| | |
|----------------|--|
| \bar{y} | Média amostral |
| z_i | Carga da espécie i |
| \bar{z}_{IS} | Carga média da população de multímeros de insulina suína |

Letras gregas

| | |
|-----------------|--|
| α | Constante do modelo de Pitzer (1973) |
| β | Constante da equação de Cohn |
| $\beta_{i,j}^0$ | Parâmetro de interação binário do modelo de Pitzer (1973) entre as espécies i e j |
| $\beta_{i,j}^1$ | Parâmetro de interação binário do modelo de Pitzer (1973) entre as espécies i e j , dependente da força iônica |
| $\beta_{i,k}$ | Parâmetro de interação entre as espécies i e k da equação de Debye-Hückel estendida |
| ϵ_0 | Permissividade no vácuo |
| ϵ_r | Permissividade relativa |
| ϕ_i | Coefficiente de fugacidade do componente i |
| γ_{\pm} | Coefficiente de atividade médio |
| γ_i | Coefficiente de atividade do componente i |
| λ | Parâmetro da equação 2.12 relacionado à interações eletrostáticas |
| μ_i | Potencial químico do componente i |
| ν_i | Coefficiente estequiométrico do componente i |
| π | Número de fases de um sistema em equilíbrio, razão da circunferência pelo diâmetro de um círculo |

| | |
|-------------------|---|
| ρ_s | Densidade do solvente |
| σ | Parâmetro da equação 2.12 relacionado à interações hidrofóbicas |
| Φ_i | Fração do multímero i de insulina suína |
| $\Lambda_{i,j,k}$ | Parâmetro de interação ternário entre as espécies i, j e k |
| Ω | Parâmetro da equação 2.12 relacionado à interações hidrofóbicas |

Subscritos

| | |
|-----------|-----------------------------|
| – | Cargas negativas |
| + | Cargas positivas |
| D | Dímero de insulina suína |
| H | Hexâmero de insulina suína |
| i, j, k | Componente |
| IS | Insulina suína |
| M | Monômero de insulina suína |
| P | Proteína |
| T | Tetrâmero de insulina suína |
| w | Água |
| x | Condição experimental |
| y | Condição experimental |

Sobrescritos

| | |
|-----------------|-----------------------|
| α, β | Fases |
| 0 | Referência |
| j | Condição experimental |
| k | Condição experimental |
| L | Fase líquida |
| ref | Referência |
| V | Fase vapor |
| T | Total |
| y | Condição experimental |

1. INTRODUÇÃO

A separação e a purificação de proteínas em processos biotecnológicos não constituem tarefas simples e em geral envolvem uma série de etapas, chamadas de recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) ou “downstream process.” Processos de RPB representam uma parcela significativa dos custos de produção e em muitos casos, o custo majoritário do processo. No processo de produção de insulina humana recombinante em *Escherichia coli*, por exemplo, estima-se que 92% do custo global de produção esteja associado somente às etapas de recuperação e purificação da molécula de insulina (Harrison *et al.*, 2003).

Uma das técnicas mais comumente utilizadas nas etapas de RPB, principalmente nas etapas iniciais de isolamento e concentração de proteínas, é a precipitação. A precipitação consiste da formação de uma fase sólida, por adição de agente precipitante, evaporação do solvente ou resfriamento da solução, que posteriormente pode ser removida da fase líquida original por uma etapa de separação física apropriada. Estima-se que 80% dos protocolos de purificação de proteínas publicados incluam pelo menos uma etapa de precipitação, que abrange desde as separações primárias, gerando um produto parcialmente purificado de volume reduzido, até operações de refinamento (Winters *et al.*, 1999). Existem muitos tipos de agentes precipitantes, incluindo sais, polieletrólitos, polímeros não iônicos, ácidos, bases e solventes orgânicos (Wheelwright, 1991). A escolha do método de precipitação depende de diversos aspectos, incluindo o custo, a facilidade de remoção do agente precipitante da solução e do precipitado e das características desnaturantes do agente precipitante sobre a proteína de interesse.

Um método de precipitação frequentemente utilizado no processamento de proteínas é a precipitação isoelétrica, em que o pH do meio é ajustado ao ponto isoelétrico (pI) da proteína. No pI, a proteína apresenta carga global nula, reduzindo a repulsão eletrostática entre as moléculas e resultando, em geral, em um valor mínimo de solubilidade* (Harrison *et al.*, 2003). O fato da maioria das proteínas apresentarem o pI na região ácida (Wheelwright, 1991) faz com que seja comum o uso de ácidos como o HCl e o H₂SO₄ nos processos de precipitação isoelétrica de proteínas.

Contudo, altas concentrações de ácidos e bases podem causar desnaturações irreversíveis à proteína em uma extensão que depende do tipo de ácido e do pH da solução (Salt *et al.*, 1982). A desnaturação de proteínas de interesse farmacêutico pode comprometer seriamente o uso e a eficácia do produto final obtido. Além disso, grandes quantidades de efluentes são geradas no processo de precipitação. Após a precipitação com ácidos, os efluentes gerados devem ser neutralizados, produzindo soluções salinas que necessitam ser tratadas antes do descarte ao meio ambiente. O precipitado também pode conter quantidades significativas de sais residuais, o que pode requerer processos adicionais de purificação ou interferir em etapas de processamento subsequentes.

O uso de eletrólitos voláteis como o CO₂ para a precipitação isoelétrica de proteínas surgiu como uma alternativa promissora à precipitação com ácidos convencionais. Os eletrólitos voláteis se dissolvem e se dissociam em solução aquosa, gerando íons que tem a capacidade de precipitar as proteínas pela mudança de pH (Jordan *et al.*, 1987; Tomasula *et al.*, 1995; Hofland *et al.*, 1999, 2000) ou pelo efeito de salting-out (Watanabe *et al.*, 2006; Lima, 2007). Após o processo, os eletrólitos podem ser facilmente removidos da solução simplesmente reduzindo-se a pressão ou elevando-se a temperatura, diminuindo consideravelmente a geração de efluentes salinos no processo. Uma outra vantagem de se utilizar eletrólitos voláteis é que extremos locais de pH não ocorrem, visto que a solubilização do agente precipitante é lenta e pode ser cuidadosamente controlada pela condição de equilíbrio de fases do sistema, o que deve resultar em minimização de desnaturação protéica.

* O termo solubilidade será utilizado neste trabalho para designar a concentração de equilíbrio (ou saturação).

Os processos com eletrólitos voláteis são relativamente recentes, havendo poucas publicações e trabalhos sobre o assunto. Os estudos da precipitação isoelétrica com eletrólitos voláteis publicados até o momento foram realizados com sistemas protéicos complexos e voltados principalmente aos aspectos tecnológicos do processo, não havendo na literatura um conhecimento sistemático do efeito das variáveis termodinâmicas sobre o equilíbrio de fases de sistemas que contenham proteínas.

1.1. Colocação do problema

O uso do CO₂ ou de outros eletrólitos voláteis como agentes acidificantes em substituição aos ácidos utilizados convencionalmente requer consideráveis mudanças no conceito dos processos atualmente empregados e um profundo conhecimento do comportamento termodinâmico destes eletrólitos e da proteína em fase aquosa. Isto porque o eletrólito não é adicionado ao sistema na fase líquida, mas sim pela fase vapor. Sua presença em solução depende da pressão e da temperatura do sistema e da composição da fase líquida. Conforme já mencionado, a precipitação isoelétrica de proteínas presentes em sistemas complexos como os extratos de soja e o leite com o uso de CO₂ foi estudada por alguns grupos de pesquisa, porém, aspectos termodinâmicos como o comportamento da solubilidade das proteínas nestes sistemas não foram elucidados. Determinar a solubilidade da proteína é, na verdade, determinar a sua condição de equilíbrio sólido-líquido.

O comportamento de eletrólitos voláteis em equilíbrio com uma fase aquosa foi exaustivamente estudado experimental e teoricamente (Edwards *et al.*, 1975, 1978; Beutier e Renon, 1978; Kawazuishi e Prausnitz, 1987; Göppert e Maurer, 1988; Rumpf e Maurer, 1993, 1994; Xia *et al.*, 1999, 2000), tendo-se estabelecido uma base termodinâmica sólida e bons modelos para a descrição do equilíbrio de fases destes sistemas. No entanto, a descrição do equilíbrio de fases da proteína no processo de precipitação isoelétrica ainda está restrita a modelos empíricos e a dados de solubilidade obtidos experimentalmente. A solubilidade, que é a concentração de saturação na fase sobrenadante de um soluto em equilíbrio sólido-líquido, é um parâmetro de fundamental importância na precipitação. O projeto de processos industriais e os rendimentos da precipitação dependem da solubilidade da proteína em solução. O conhecimento sobre a solubilidade também permite que se faça uma análise da condição de supersaturação na qual o processo pode ser conduzido. Dependendo da condição de supersaturação, pode-se direcionar o processo para a formação

de um precipitado amorfo ou, eventualmente, para a formação de cristais (Feher e Kam, 1985; Asherie, 2004).

Apesar da maturidade da tecnologia de precipitação, há poucos avanços em relação à compreensão do processo e no desenvolvimento de modelos para a predição da solubilidade (Przybycien *et al.*, 2004). Existem na literatura trabalhos experimentais sobre a solubilidade de proteínas em função do pH em sistemas contendo ácidos e bases convencionais, mas foram encontrados poucos dados experimentais e nenhum modelo de solubilidade para proteínas precipitadas com a utilização de eletrólitos voláteis como o CO₂. Dados experimentais confiáveis são sempre necessários, mas é preciso considerar que a realização exaustiva de experimentos é custosa. Neste sentido, os modelos se apresentam como ferramentas úteis, pois permitem a redução do esforço experimental com economia de tempo e de recursos. Os modelos empíricos, apesar de extremamente úteis e especialmente precisos para a faixa de condições experimentais em que foram determinados, geralmente pouco explicam sobre os fenômenos físicos envolvidos nos processos estudados. Modelos termodinâmicos, apesar de requererem um esforço maior no seu desenvolvimento, são geralmente mais abrangentes e proporcionam explicações físicas mais consistentes. Embora o efeito do pH e da carga global sobre a solubilidade da proteína seja conhecido há muito tempo e o efeito das interações eletrostáticas tenha sido relatado em diversos estudos, somente foram encontrados na literatura modelos empíricos para a descrição da solubilidade das proteínas no processo de precipitação isoelétrica. Não foram encontrados modelos termodinâmicos para a resolução do equilíbrio de fases de proteínas em tais sistemas.

1.2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é determinar experimentalmente a solubilidade da insulina suína no processo de precipitação isoelétrica com o CO₂ e, considerando-se a proteína como um eletrólito, utilizar um modelo termodinâmico de eletrólitos para correlacionar a solubilidade da proteína em função das condições de temperatura, pressão e pH do sistema. Espera-se que os resultados deste trabalho possam proporcionar uma maior compreensão do fenômeno de precipitação isoelétrica e contribuir com o avanço da tecnologia de precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis em processos industriais.

1.3. Plano de trabalho desenvolvido

A realização deste trabalho de doutorado envolveu estudos experimentais e teóricos (Figura 1.1). No campo de estudos experimentais, foi de fundamental importância o equipamento para a condução dos ensaios de precipitação com o dióxido de carbono, realizados na maior parte dos casos sob pressões acima da pressão atmosférica, e por isto, requerendo uma unidade de precipitação isolada do meio externo. Pela necessidade de tal equipamento, sem o qual os estudos experimentais não poderiam ter sido realizados, grande parcela dos esforços se concentraram em seu desenvolvimento e construção, que estão em parte relatados na seção de Materiais e Métodos.

Para os estudos experimentais também foram desenvolvidas as metodologias para a realização dos ensaios de cinética de precipitação e determinação da solubilidade da insulina suína em soluções aquosas de NaHCO_3 sob atmosfera de CO_2 . Os ensaios de atividade biológica foram realizados para se avaliar o efeito dos parâmetros do processo de precipitação com o CO_2 sobre a atividade biológica da insulina e também comparar os resultados com a atividade biológica da insulina obtida pela precipitação por um ácido convencional, o H_3PO_4 .

Nos estudos teóricos, o modelo de Edwards *et al.* (1978) foi aplicado aos sistemas compostos pelo eletrólito volátil CO_2 em soluções de NaHCO_3 para a determinação das quantidades das espécies moleculares e iônicas na fase líquida e determinação do pH de equilíbrio em função da temperatura, pressão e composição da fase líquida. As estimativas de pH geradas pelo modelo serviram de base para a escolha das condições experimentais de precipitação isoelétrica da insulina suína com o CO_2 , pois o pH do tampão formado entre o ácido carbônico e o bicarbonato de sódio depende da concentração e da proporção entre ambos, fortemente influenciada pela quantidade de CO_2 na fase líquida. Para a inclusão da proteína ao modelo, considerou-se a proteína em solução aquosa como um eletrólito e utilizou-se o modelo de eletrólitos de Pitzer (1973) para se calcular o seu coeficiente de atividade e a própria atividade, variáveis necessárias para a determinação da concentração de saturação da proteína, ou seja, sua solubilidade.

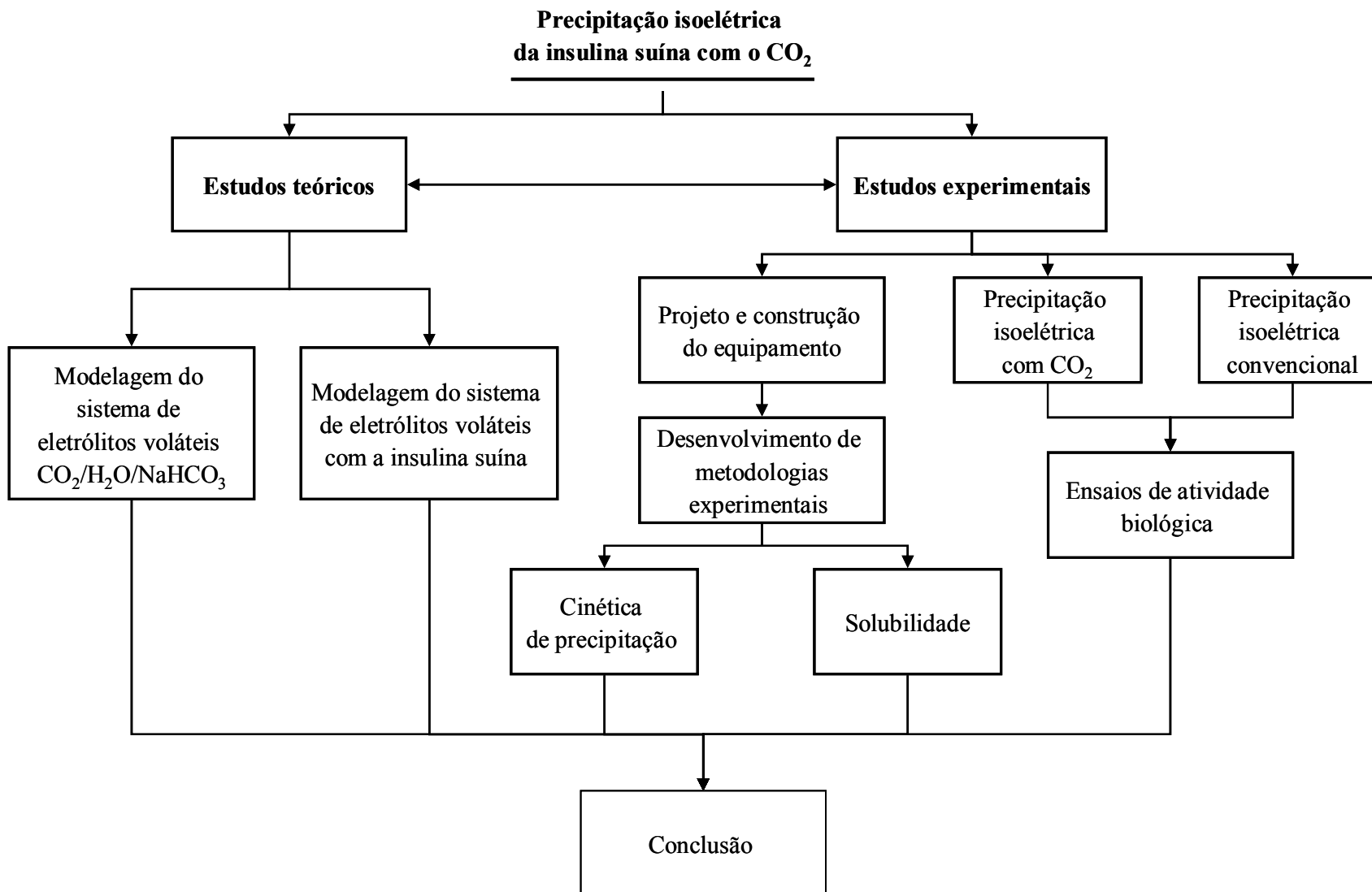


Figura 1.1 – Esquema do plano de trabalho para a realização deste estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados e discutidos os principais estudos encontrados na literatura acerca do tema deste trabalho. Inicialmente, o processo de precipitação isoelétrica de proteínas com ácidos convencionais é apresentado, estudando-se a seguir os trabalhos de precipitação isoelétrica de proteínas com o dióxido de carbono. A termodinâmica de eletrólitos e de eletrólitos voláteis em equilíbrio com uma fase líquida é discutida em seguida, pois a precipitação isoelétrica de proteínas com o uso de eletrólitos voláteis está relacionada a estes temas. Dados do sistema tamponante formado pelo $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$ também são mencionados, pois este sistema tampão (dos mais importantes tampões de fluidos biológicos) foi utilizado neste trabalho para manter constante o pH das soluções de insulina. Em seguida, apresenta-se uma revisão dos principais trabalhos voltados ao desenvolvimento de modelos para a descrição equilíbrio de fases de proteínas em soluções de eletrólitos. Por fim, apresenta-se uma breve descrição da molécula de insulina, mencionando-se a sua função e algumas de suas características mais relevantes.

2.1. Precipitação isoelétrica de proteínas

As proteínas são macromoléculas formadas pela ligação de aminoácidos através de ligações peptídicas. A seqüência de aminoácidos que compõe a proteína determina a sua estrutura primária e especifica grande parte de suas propriedades (Stryer, 1995). Alguns aminoácidos possuem cadeias laterais de caráter ácido enquanto outros possuem cadeias laterais com caráter básico que se mantêm intactos na formação da proteína, o que faz com que a proteína possua caráter anfotérico (Nozaki e Tanford, 1967). Dependendo do pH do

meio, estes grupos presentes nas proteínas podem ter cargas positivas ou negativas (Arakawa e Timasheff, 1985) e, se as proteínas carregarem carga global diferente de zero, haverá como resultado a atuação de forças de repulsão eletrostática entre as moléculas inibindo o fenômeno de agregação (Glatz, 1990).

Na precipitação isoeletrica de proteínas, o pH da solução é levado ao ponto em que a proteína possui carga global nula, o ponto isoeletrico, o que resulta na diminuição das repulsões eletrostáticas e em um valor mínimo de solubilidade (Harrison *et al.*, 2003). A redução da solubilidade da proteína pela aproximação do pH do meio ao pI induz ao fenômeno de agregação, que se torna mais pronunciado para proteínas de baixa capacidade de hidratação ou alta hidrofobicidade superficial (Bell *et al.*, 1983). A carga global da proteína em função do pH é determinada pelos valores de pK_a de seus grupos ionizáveis, sendo positiva para valores de pH abaixo do pI e negativa para valores de pH acima do pI (Tanford, 1962; Tanford e Roxby, 1972; Yang *et al.*, 1993).

De acordo com estudos teóricos, a solubilidade deve ser, de um modo aproximado, proporcional ao quadrado da carga global da proteína (Tanford, 1961). De fato, o perfil típico de solubilidade das proteínas em função do pH tem um formato em U, parabólico, sendo a proteína mais solúvel ao se afastar do pI em qualquer uma das direções ao longo do eixo do pH. Este comportamento pode ser observado nitidamente pelo gráfico de solubilidade de proteínas de soja em função do pH (Figura 2.1), obtido por Smith e Circle (1938). Neste trabalho, os ensaios de solubilidade abrangeram uma faixa ampla de pH, entre 0,5 a 12,2, tendo sido utilizados os ácidos clorídrico, tricloroacético, sulfúrico, fosfórico e oxálico para os ajustes de pH na região ácida e os hidróxidos de sódio e de cálcio para o ajuste do pH na região alcalina. A mistura de proteínas de soja contém uma grande quantidade de proteínas com valores de pI entre 4 e 5 (Chove *et al.*, 2007), o que reflete em um valor mínimo de solubilidade comum para a população de proteínas entre estes valores de pH .

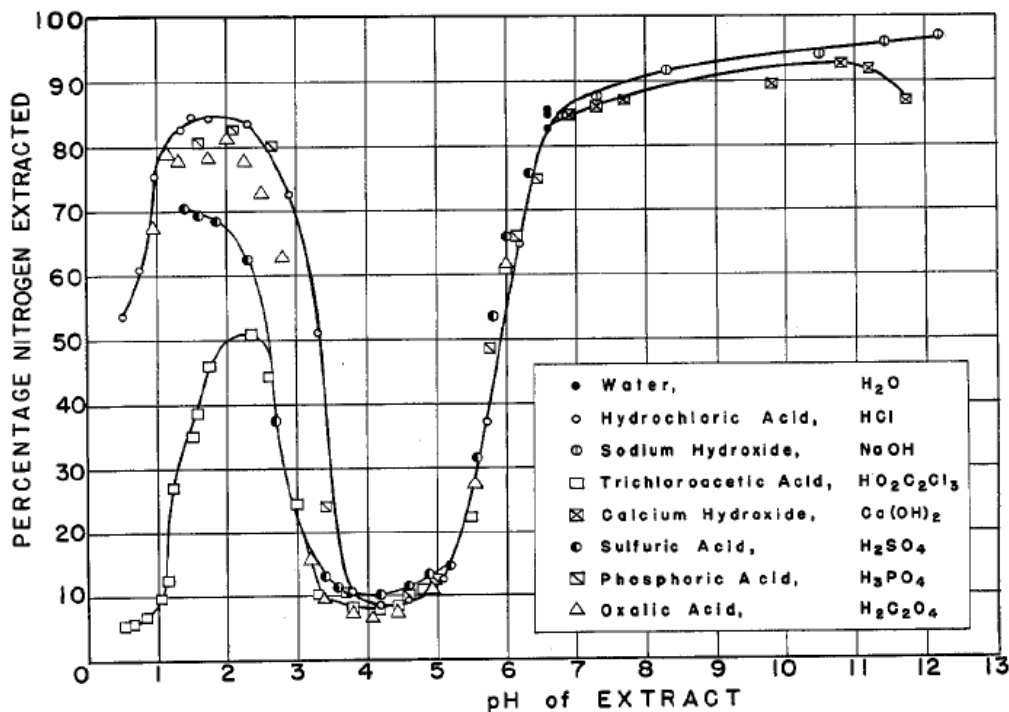


Figura 2.1 – Perfil de solubilidade das proteínas de soja medidas pela porcentagem de nitrogênio extraído em soluções de diversos ácidos e bases (Smith e Circle, 1938).

Shaw *et al.* (2001) obtiveram a curva de solubilidade em função do pH da ribonuclease Sa (RNase Sa) e de duas mutações desta proteína, que tiveram três e cinco resíduos de ácido aspártico e de ácido glutâmico substituídos por resíduos de lisina. A RNase Sa é uma proteína com um excesso de resíduos ácidos, o que lhe confere um pI de 3,5 e uma carga global de -7 em pH neutro (Hebert *et al.*, 1997). Com as substituições dos aminoácidos por três (3K) e cinco (5K) lisinas (aminoácido com cadeia lateral de caráter básico), os valores de pI da proteína elevaram-se de 3,5 para 6,4 e 10,2, respectivamente. Os autores determinaram as solubilidades da RNase Sa e das variantes 3K e 5K, e observaram um deslocamento da curva em relação ao eixo do pH devido à mudança do ponto isoelétrico nas proteínas modificadas (Figura 2.2). No entanto, para as variantes 3K e 5K, observou-se uma possível discordância dos valores mínimos de solubilidade em relação aos valores experimentais de pI. Este fato pode ser atribuído às diferentes soluções tampão utilizadas na determinação dos dados de solubilidade para cada faixa de pH (foram utilizados glicina 10 mM para os valores de pH entre 2,0 e 3,5, acetato 10 mM para os

valores de pH entre 3,5 e 5,5, MES 10 mM para os valores de pH entre 6,0 e 6,5, MOPS 10 mM para os valores de pH entre 7,0 e 8,0, Tris 10 mM para os valores de pH entre 8,5 e 10,0 e CAPS 10 mM para valores de pH acima de 10,0). A mudança de espécies iônicas nas soluções tampão pode causar variação nos níveis de solubilidade (Arakawa e Timasheff, 1985) e pode também deslocar o ponto isoelétrico da proteína (Fredericq e Neurath, 1950; Kaarshholm *et al.*, 1990). Além disso, os pontos isoelétricos das proteínas foram determinados em condições diferentes das utilizadas nos ensaios de solubilidade, em géis de eletroforese, o que também pode ter contribuído para estas variações. De qualquer modo, é possível observar que o efeito da modificação pelas lisinas sobre o comportamento de solubilidade da proteína e sobre o valor do pI é significativo.

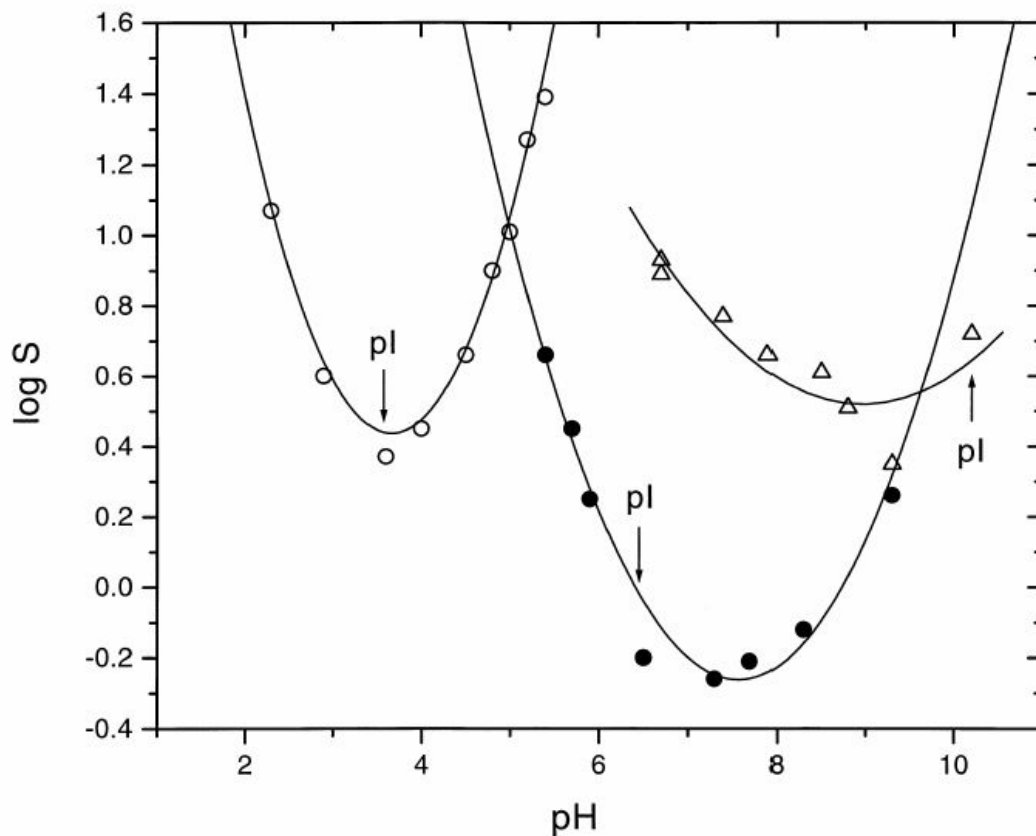


Figura 2.2 – Solubilidade da ribonuclease Sa em função do pH do meio: (○) proteína original; (●) proteína modificada por três lisinas (3K); (Δ) proteína modificada por cinco lisinas (5K). As linhas não tem significado teórico (Shaw *et al.*, 2001).

As diferentes composições de aminoácidos das proteínas fazem com que estas apresentem uma grande variedade de valores de pI, que cobrem uma ampla faixa de valores de pH (Tabela 2.1, Belter *et al.*, 1988; Voet e Voet, 1990). No entanto, observa-se que a maioria das proteínas apresenta o pI na região ácida (Wheelwright, 1991) e, este fato, aliado ao baixo custo relativo dos ácidos (Shaewitz e Henry Jr., 2002) faz com que seja comum o uso de ácidos como o HCl e o H₂SO₄ nos processos de precipitação de proteínas. A precipitação isoelétrica é tradicionalmente utilizada em processos industriais para recuperar proteínas de extratos de soja (Hofland, 2001) e do leite (Southward e Walker, 1980). A caseína comercial, por exemplo, é produzida pelo ajuste do pH do leite ao ponto isoelétrico da caseína, em torno de 4,6 (Southward, 1985) pela adição direta de ácidos como o ácido sulfúrico, clorídrico ou pela adição de ácido láctico proveniente de fermentação (Richert, 1975, Huffman e Harper, 1999).

Tabela 2.1 – Valores de pI de algumas proteínas (Belter *et al.*, 1988; Voet e Voet, 1990).

| Proteína | pI |
|------------------------------|-------------|
| Pepsina | 2,75 – 3,00 |
| Ovalbumina | 4,6 |
| HSA (albumina sérica humana) | 4,9 |
| Insulina suína | 5,30 – 5,35 |
| Insulina bovina | 5,4 |
| Fibrinogênio humano | 5,8 |
| Mioglobina equina | 7,0 |
| Hemoglobina humana | 7,1 |
| Citocromo C | 10,6 |
| Lisozima | 11,0 |
| Salmina | 12,1 |

Como é característico em processos de precipitação, na precipitação isoelétrica há uma grande redução de volume e concentração do produto, que pode ser recuperado de forma rápida e parcialmente purificado (Walsh e Headon, 1994). Entretanto, a precipitação isoelétrica com ácidos minerais apresenta algumas desvantagens. Sabe-se que a precipitação pela adição de soluções de ácidos convencionais pode causar desnaturação irreversível às proteínas (Salt *et al.*, 1982). Além disso, é preciso considerar que no processo de precipitação isoelétrica são necessárias etapas de neutralização dos ácidos utilizados, que geram quantidades consideráveis de efluentes salinos, e remoção dos eletrólitos residuais dos precipitados, o que interfere nos rendimentos e custos do processo (Hofland, 2001).

Em um estudo com proteínas de soja, Nash *et al.* (1971) observaram que as proteínas precipitadas por ácido clorídrico em pH 4,5 apresentavam perda de solubilidade após o processo de precipitação. Os autores atribuíram esta perda de solubilidade aos valores extremos de acidez da solução e ao tempo em que as proteínas ficaram expostas ao ácido. Salt *et al.* (1982) estudaram os efeitos da adição de vários tipos de ácidos em altas concentrações, do pH da solução e das condições de agitação sobre proteínas de soja e verificaram que a desnaturação irreversível da proteína depende do tipo de ânion do ácido utilizado e do valor de pH do meio. Os autores explicaram o fato com base na série de Hofmeister, pois a tendência do íon em causar danos estruturais à proteína está inversamente relacionada a sua posição na série liotrópica (Bell *et al.*, 1983).

Os efeitos de desnaturação de proteínas e a geração de grandes quantidades de efluentes salinos observados nos processos de precipitação isoelétrica com ácidos convencionais despertaram o interesse pela busca de alternativas a este processo utilizando agentes menos danosos e processos que pudessem ser conduzidos de forma mais branda para as proteínas. Neste contexto, alguns autores estudaram o uso do CO₂ como alternativa aos ácidos convencionalmente utilizados em tais processos (Jordan *et al.*, 1987; Tomasula *et al.*, 1995; Hofland *et al.*, 1999, 2000).

2.2. Precipitação isoelétrica de proteínas com o CO₂

O primeiro relato da utilização de um ácido volátil para a precipitação de proteínas como alternativa aos ácidos convencionais foi feito por Jordan *et al.* (1987), que precipitaram a caseína pela dissolução do CO₂ sob pressão no leite. Entre as vantagens relatadas pelos autores sobre os processos convencionais estavam a possibilidade de produção de caseínas com diferentes propriedades funcionais, a maior pureza do precipitado obtido, a diminuição dos efluentes gerados, a grande disponibilidade deste eletrólito e a inativação de bactérias pelo dióxido de carbono. A inativação de microorganismos pelo tratamento por CO₂ pode ser atribuída ao decréscimo do pH do meio até um ponto no qual as diferenças entre os valores de pH intracelular e extracelular se aproximam ou igualam a zero, resultando na incapacidade da manutenção do microorganismo (Nannen e Hutkins, 1991; Spilimbergo *et al.*, 2005). Os ensaios de precipitação de Jordan *et al.* (1987) foram conduzidos entre pressões de 6,8 e 55 bar e temperaturas entre 40 e 70°C, sendo que rendimentos de recuperação de caseína superiores a 99% foram alcançados.

O trabalho de Jordan *et al.* (1987) serviu de base para uma maior exploração da técnica pela realização de outros trabalhos de precipitação de proteínas com o CO₂. Tomasula *et al.* (1995) investigaram o efeito da pressão, temperatura e tempo de residência sobre as propriedades da caseína do leite precipitada por CO₂ e as compararam com as propriedades da caseína obtida por ácidos convencionais. Em outros trabalhos, os autores se concentraram em aspectos tecnológicos da precipitação, visando o delineamento de um processo contínuo para a recuperação da caseína do leite com CO₂ sob pressão (Tomasula *et al.*, 1997) e na análise técnico-econômica deste processo (Tomasula *et al.*, 1998), sugerindo ser tecnicamente possível e economicamente viável a sua implementação em processos industriais, desde o CO₂ fosse reciclado no processo.

A caseína também foi precipitada pelo CO₂ sob pressão a partir do leite no trabalho de Hofland *et al.* (1999). Porém, em relação aos trabalhos anteriores, neste estudo os autores obtiveram uma quantidade maior de dados experimentais e fizeram uma análise mais extensa do efeito da temperatura e pressão do sistema sobre o pH de equilíbrio e sobre o rendimento da precipitação. Na comparação do pH de equilíbrio do leite com o pH de

equilíbrio da água nas mesmas condições de temperatura e pressão, ficou evidente a capacidade tamponante dos componentes presentes no leite, pois o pH foi sempre superior a duas unidades em relação ao pH da água. Devido a este efeito tamponante, o pI da caseína não pôde ser alcançado, mesmo nas maiores pressões de CO₂, mas este fato não impediu que altos rendimentos de precipitação fossem alcançados para os maiores valores de pressão. Possivelmente isto se deu porque as proteínas que compõem a caseína possuem um valor comum de pI em torno de 4,6 (Walstra e Jenness, 1984), e o valor mínimo de pH alcançado pelos autores foi de 4,82, a pressão de CO₂ de 55 bar e a 25°C, relativamente próximo ao pI.

Em um trabalho de precipitação isoeletrica de proteínas de soja com o CO₂, Hofland *et al.* (2000) avaliaram o efeito da temperatura, pressão e concentração inicial de proteínas de soja sobre o pH de equilíbrio da solução. Este sistema de proteínas apresentou efeito tamponante similar ao verificado no leite. Os rendimentos de precipitação da proteína de soja com o CO₂ foram similares aos obtidos por Nelson e Glatz (1985) com o ácido clorídrico. No entanto, ao compararem as morfologias dos precipitados obtidos pela precipitação com o CO₂ e pelo uso do ácido sulfúrico, os autores verificaram que os precipitados obtidos pelo ácido volátil apresentavam uma geometria muito mais regular e homogênea do que os obtidos pelo ácido sulfúrico (Figura 2.3). Segundo os autores, o processo com o dióxido de carbono proporcionou um controle mais preciso do processo de precipitação devido à cinética lenta de acidificação e à ausência de extremos locais de pH, uma vez que este nunca cai abaixo do valor de equilíbrio definido pelas condições de temperatura e pressão do sistema.

Thiering *et al.* (2001a) fracionaram proteínas de soja com dióxido de carbono sob pressão. Os autores conseguiram obter as proteínas glicinina e β-conglicinina do extrato de soja, em níveis de pureza de 95% e 80%, respectivamente. A glicinina e a β-conglicinina são as duas frações de maior abundância encontradas na soja, constituindo em média 51% e 19% do total de proteína do grão (Murphy e Resurreccion, 1984). Devido à proximidade dos valores de pI das duas proteínas (5,20 para a glicinina e 4,95 para a β-conglicinina, Thiering *et al.*, 2001b) o pH do meio foi diminuído gradualmente e a separação das frações foi feita em diversas etapas. Os autores exploraram a diferença de solubilidade das

proteínas em relação ao pH para a realização do fracionamento. Em um outro trabalho, Thiering *et al.* (2001b) caracterizaram os precipitados gerados no processo de fracionamento das proteínas de soja por CO₂ e propuseram um processo contínuo para a recuperação da glicinina com 94% de pureza. Golubovic *et al.* (2005) investigaram condições de processo para o fracionamento de glicinina que resultaram em menor acidificação do extrato de soja com o CO₂, e obtiveram esta proteína com 98% de pureza.

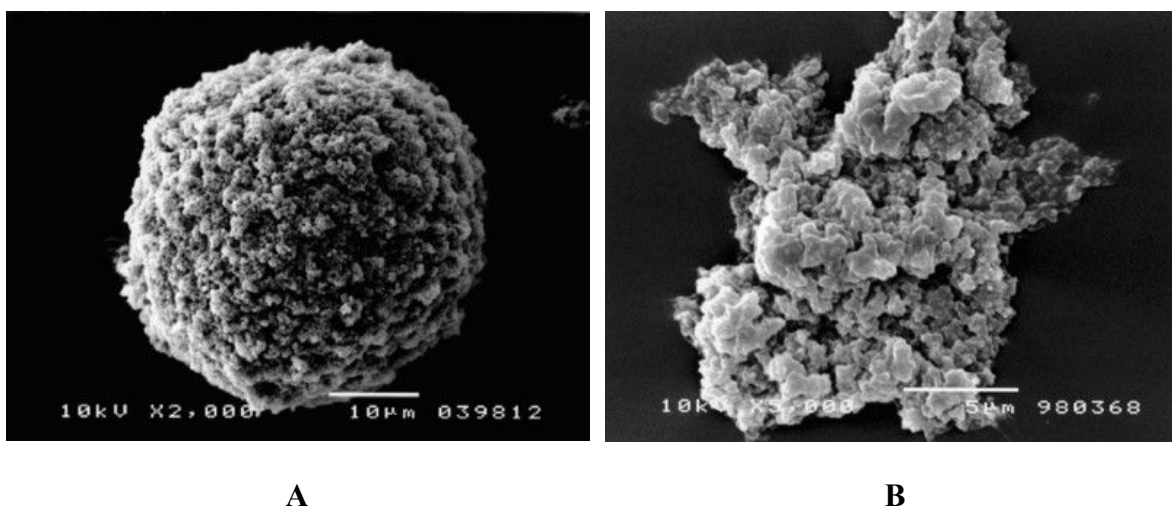


Figura 2.3 – Imagens de microscopia eletrônica dos precipitados de proteína de soja obtidos por (Hofland *et al.*, 2000): A – precipitação isoeletrica com CO₂; B – precipitação isoeletrica com ácido sulfúrico.

Khorshid *et al.* (2007) precipitaram proteínas de soja com o CO₂ e relataram diferentes proporções de glicinina e β-conglicinina nos precipitados obtidos nas pressões de 30 e 40 bar, indicando também o fracionamento das proteínas. Entretanto, os autores encontraram maiores rendimentos de recuperação de proteína em valores de pH afastados dos valores de pI das proteínas de soja, diminuindo à medida que o pH do sistema se aproximava dos valores de pI da glicinina e da β-conglicinina. Este resultado é oposto ao encontrado em trabalhos de precipitação isoeletrica de proteínas com ácidos e bases convencionais e com os resultados de rendimento relatados em outros trabalhos de precipitação isoeletrica com o CO₂.

Qi *et al.* (2004) estudaram a precipitação da albumina de soro bovino (BSA) em soluções de água e etanol com o dióxido de carbono sob pressão. Neste trabalho, diferentemente das montagens experimentais dos outros trabalhos, que utilizaram sensores de alta pressão para as medidas de pH, o pH do sistema sob pressão foi medido por um método colorimétrico. Nestas medições, um indicador ácido base foi adicionado à unidade de precipitação, feita de vidro e equipada com um espectrofotômetro. Assim, o espectro de coloração da solução medida pelo espectrofotômetro era relacionado ao pH do sistema. Verificou-se que a BSA possuía uma grande capacidade tamponante, mesmo em concentrações de 0,5%, e não foi possível precipitá-la com o CO₂ em solução aquosa, até a pressão de 75 bar. Este fato também é condizente com a grande solubilidade da BSA: segundo dados de Kozinski e Lightfoot (1972), a solubilidade da BSA em água no seu ponto isoelétrico (4,7) é de 585 mg/mL. No entanto, ao se adicionar quantidades crescentes de etanol ao sistema, o efeito de diminuição de pH foi se acentuando, e para proporções de etanol acima de 20%, a precipitação da BSA foi observada. A diminuição da constante dielétrica da água pela adição de etanol também deve ter contribuído para a precipitação da proteína (Akerlof, 1932; Bell *et al.*, 1983; Popello *et al.*, 1991; Suresh e Naik, 2002).

As atividades das enzimas celulase, α -amilase e protease ácida precipitadas em soluções de etanol e água pressurizadas com o CO₂ foram medidas por Yao *et al.* (2004). Os autores sugeriram que para a α -amilase, a pressão de CO₂ pode ser um fator chave para a perda de atividade da enzima, especialmente em temperaturas mais elevadas. Nos casos da celulase e da protease ácida, o efeito do CO₂ não foi significativo, mas em relação a temperatura e a concentração de etanol, a protease ácida foi a enzima que apresentou a menor perda de atividade.

Nota-se que a maioria dos trabalhos de precipitação isoelétrica de proteínas com o dióxido de carbono apresentados na literatura foi realizada com sistemas complexos de proteínas como os extratos de soja e o leite, o que dificulta a análise de interações entre os diversos componentes e o desenvolvimento de modelos termodinâmicos para este sistemas. Apenas os trabalhos de Qi *et al.* (2004) e Yao *et al.* (2004) utilizaram proteínas puras.

Em relação aos modelos termodinâmicos, apenas os trabalhos de Hofland *et al.* (1999, 2000) apresentaram um modelo para descrever o comportamento dos sistemas

estudados, mas os autores se limitaram ao cálculo do pH de equilíbrio das soluções de proteínas pressurizadas com dióxido de carbono. O modelo para o equilíbrio de fases de eletrólitos voláteis de Edwards *et al.* (1978) foi utilizado para o cálculo do pH do leite em equilíbrio com o CO₂ sob pressão (Hofland *et al.*, 1999). No entanto, o sistema complexo de proteínas e outros componentes do leite não foi incluído nas equações termodinâmicas do modelo. Os autores optaram por obter dados experimentais da capacidade tamponante do leite através de uma curva de titulação do leite com um ácido convencional e incluir estes dados no cálculo do pH do sistema através de uma correlação empírica. Metodologia similar foi aplicada às soluções de proteínas de soja (Hofland *et al.*, 2000).

2.3. Modelos termodinâmicos de eletrólitos voláteis

A termodinâmica de sistemas contendo eletrólitos voláteis em equilíbrio com uma fase aquosa tem sido estudada por diversos grupos de pesquisa, devido ao interesse que despertam na aplicação em processos da indústria química. Sobre este assunto, merecem destaque os trabalhos realizados por Edwards *et al.* (1975, 1978) pela abrangência dos modelos propostos e pelos bons resultados obtidos pelos autores.

O trabalho de Edwards *et al.* de 1978 apresentou uma melhoria significativa em relação ao trabalho anterior (Edwards *et al.*, 1975) devido à utilização do modelo de eletrólitos de Pitzer (1973), que será comentado no item 2.3.1 deste capítulo. Em seguida, dados relativos a sistemas de eletrólitos contendo o bicarbonato de sódio são apresentados devido à utilização deste sal juntamente com o CO₂ como sistema tamponante para os estudos de precipitação isoelétrica de insulina suína realizados neste trabalho.

2.3.1. Modelo de eletrólitos de Pitzer (1973)

Faz-se neste item uma breve introdução sobre os modelos termodinâmicos de eletrólitos, principalmente sobre o modelo de Pitzer (1973), pois este tem sido largamente aplicado a sistemas geotérmicos, de eletrólitos voláteis e a sistemas de interesse da indústria química. A grande aceitação e utilização do modelo de Pitzer fazem com que haja uma base

substancial de dados experimentais e de parâmetros do modelo disponíveis na literatura, o que o torna ainda mais versátil (Prausnitz *et al.*, 1999).

O modelo de eletrólitos de Pitzer (1973) foi desenvolvido com base no modelo teórico exato proposto por Debye e Hückel (1923) e em modificações semi-empíricas deste, que incluíram o efeito de interações binárias de curto alcance através do segundo coeficiente virial (Guggenheim, 1935, Scatchard, 1939). Utilizando conceitos bem estabelecidos da eletrostática clássica, Debye e Hückel obtiveram uma equação teórica exata para descrever o coeficiente de atividade γ_i de um íon de carga z_i em uma solução diluída de força iônica I (Prausnitz *et al.*, 1999). Debye e Hückel desenvolveram a seguinte expressão para o coeficiente de atividade de um eletrólito:

$$\ln \gamma_i = -A_\gamma z_i^2 \sqrt{I} \quad (2.1)$$

em que A_γ é dado por:

$$A_\gamma = \left(\frac{e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r RT} \right)^{3/2} \frac{N_A^2}{8\pi} (2\rho_s)^{1/2} \quad (2.2)$$

sendo e a carga elementar, ϵ_0 a permissividade no vácuo, ϵ_r a permissividade relativa ou constante dielétrica, R a constante universal dos gases, T a temperatura, N_A o número de Avogadro e ρ_s a densidade do solvente. A força iônica é dada pela equação:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i z_i^2 \quad (2.3)$$

em que m_i é a molalidade da espécie i . A equação 2.1 expressa o coeficiente de atividade de cada espécie iônica. Para um eletrólito $M_{\nu+}X_{\nu-}$, o coeficiente de atividade médio γ_{\pm} é dado por:

$$\ln \gamma_{\pm} = -A_\gamma |z_+ z_-| \sqrt{I} \quad (2.4)$$

A equação 2.4 é conhecida como a lei limitante de Debye-Hückel, uma lei teórica e exata para soluções de eletrólitos em baixas concentrações ($I < 0,01$ M, Prausnitz *et al.*, 1999). Porém, muitos fatores fazem com que a equação de Debye-Hückel não seja válida para altas concentrações de eletrólitos, como por exemplo, interações entre íons providas

de forças não eletrostáticas como as forças de van der Waals e dipolo-dipolo, de curto alcance, e interações dos íons com o solvente (Pitzer, 1973; Prausnitz *et al.*, 1999).

Uma das maneiras de se contornar a limitação é a adição de um segundo coeficiente virial, que representa o efeito de interações binárias de curto alcance entre os componentes presentes no sistema. Ao invés de utilizar um valor constante para o segundo coeficiente virial, Pitzer (1973) considerou a dependência deste coeficiente em relação à força iônica da solução. Utilizando dados experimentais de coeficientes osmóticos para eletrólitos, foi avaliada uma série de expressões teóricas para o ajuste do termo representando as interações eletrostáticas de longo alcance de Debye-Hückel, e outra série de expressões para o ajuste do segundo coeficiente virial, representando as interações de curto alcance. Então, as expressões que melhor correlacionaram os dados experimentais foram selecionadas e utilizadas para a obtenção da expressão de energia livre de Gibbs de excesso, que por sua vez, serviu de base para a obtenção dos coeficientes osmóticos. Com esta abordagem, Pitzer obteve a seguinte equação para o coeficiente de atividade de um íon em solução:

$$\begin{aligned} \ln \gamma_i = & \frac{1}{RT} \left(\frac{\partial G^{EX}}{\partial n_i} \right) = -A_\phi z_i^2 \left[\frac{\sqrt{I}}{1+b\sqrt{I}} + \frac{2}{b} \ln(1+b\sqrt{I}) \right] \\ & + 2 \sum_j m_j \left[\beta_{i,j}^0 + \beta_{i,j}^1 \frac{2}{\alpha^2 I} \left[1 - (1+\alpha\sqrt{I}) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \right] \\ & - \frac{z_i^2}{\alpha^2 I^2} \left[1 - \left(1 + \alpha\sqrt{I} + \frac{\alpha^2 I}{2} \right) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \left[\sum_j \sum_k m_j m_k \beta_{j,k}^1 + 3 \sum_j \sum_k m_j m_k \Lambda_{i,j,k} \right] \end{aligned} \quad (2.5)$$

em que A_ϕ é dado por:

$$A_\phi = \frac{1}{3} \sqrt{2\pi N_A \rho_s} \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 D k_B T} \right)^{3/2} \quad (2.6)$$

sendo D a constante dielétrica do meio, k_B , a constante de Boltzmann e α e b constantes do modelo. Os termos $\beta_{i,j}^0$ e $\beta_{i,j}^1$ são parâmetros de interação binários e $\Lambda_{i,j,k}$ é um parâmetro de interação ternário, ajustáveis aos dados experimentais. Os parâmetros são simétricos, ou seja, $\beta_{i,j} = \beta_{j,i}$ e $\Lambda_{i,j,k} = \Lambda_{j,i,k} = \dots = \Lambda_{k,j,i}$. Este modelo foi aplicado a uma grande quantidade

de eletrólitos, descrevendo o comportamento destes eletrólitos de modo satisfatório (Pitzer, 1973; Pitzer e Mayorga, 1973).

2.3.2. Modelo de eletrólitos voláteis de Edwards *et al.* (1975, 1978)

A modelagem termodinâmica de soluções aquosas em equilíbrio com eletrólitos voláteis tem recebido atenção considerável após os trabalhos de Edwards *et al.* (1975, 1978), que estudaram o equilíbrio químico e de fases de um conjunto de eletrólitos voláteis, entre eles o dióxido de carbono. Os autores tinham como objetivo descrever o equilíbrio líquido-vapor de componentes voláteis presentes em efluentes industriais, cujos limites permitidos de emissão começavam a ficar mais rigorosos e, no entanto, tais sistemas contavam com informações termodinâmicas limitadas.

Edwards *et al.* (1975) propuseram um modelo em que o equilíbrio de fases era determinado principalmente pelos eletrólitos na forma molecular, enquanto o equilíbrio químico na fase líquida era fortemente influenciado pelas reações químicas de ionização, caracterizadas pelas constantes de dissociação (Figura 2.4). Neste modelo, o equilíbrio de fases (setas verticais) era governado pela lei de Henry, enquanto o equilíbrio químico (setas horizontais) era governado pelas constantes de dissociação do eletrólito na fase líquida.

Para um eletrólito volátil ev se dissociando em íons ev_+ e ev_- em fase aquosa com os coeficientes estequiométricos ν_+ e ν_- , respectivamente, tinha-se a seguinte reação química:



A constante da reação química 2.5 foi determinada pela seguinte relação:

$$K_i = \frac{a_{ev_+}^{\nu_+} a_{ev_-}^{\nu_-}}{a_{ev}} \quad (2.8)$$

em que a_i representava a atividade do componente i , que é o produto de sua molalidade, m_i , pelo seu coeficiente de atividade γ_i :

$$a_i = m_i \gamma_i \quad (2.9)$$

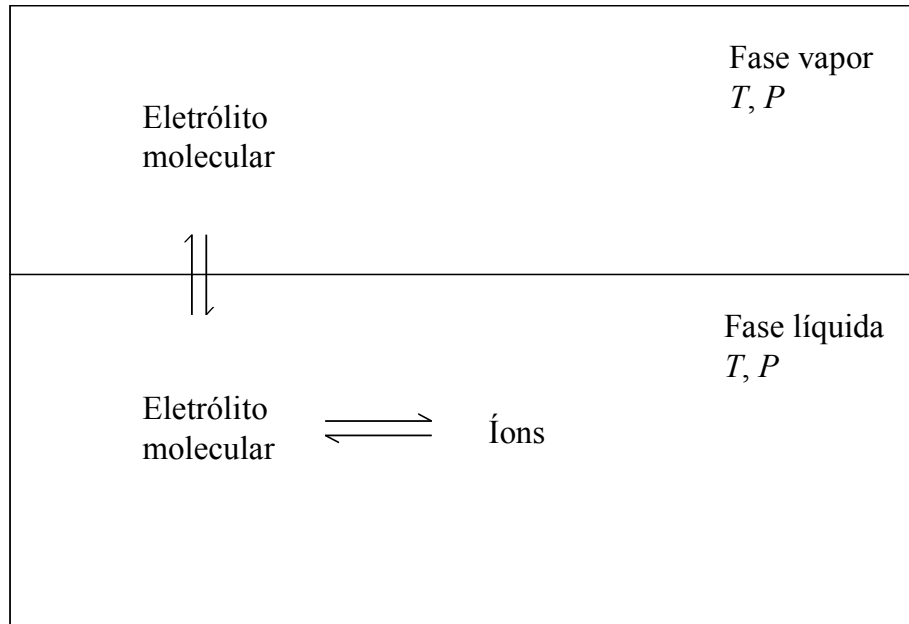


Figura 2.4 – Equilíbrio líquido-vapor de um sistema composto pela fase aquosa e um eletrólito volátil (Edwards *et al.*, 1975).

O coeficiente de atividade dos eletrólitos foi calculado pela equação de Debye-Hückel estendida, dada pela seguinte equação:

$$\ln \gamma_i = -\frac{2,303 A_\gamma z_i^2 \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} + 2 \sum_k \beta_{i,k} m_k \quad (2.10)$$

onde $\beta_{i,k}$ era o parâmetro de interação entre as espécies i e k . O modelo proposto apresentou resultados satisfatórios para os sistemas compostos por um ou mais eletrólitos voláteis na faixa de temperatura de 0 a 100°C e para valores de força iônica até 0,5 molal.

O trabalho foi aprofundado (Edwards *et al.*, 1978) e o modelo de Debye-Hückel estendido para o cálculo dos coeficientes de atividade foi substituído pelo modelo de eletrólitos de Pitzer (1973). Esta modificação resultou em um aumento considerável da faixa de validade do modelo termodinâmico para temperaturas de 0 até 170°C e valores de força iônica até 6 molal, apenas ajustando-se parâmetros de interação binários aos dados experimentais.

Beutier e Renon (1978) adotaram abordagem similar à utilizada por Edwards *et al.* (1975, 1978) e também utilizaram o modelo de eletrólitos de Pitzer (1973) para representar o equilíbrio líquido-vapor dos sistemas $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{S-H}_2\text{O}$, $\text{NH}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ e $\text{NH}_3\text{-SO}_2\text{-H}_2\text{O}$. Os autores obtiveram bons resultados ao incluir o terceiro coeficiente virial às equações do modelo, porém Edwards *et al.* (1978) ressaltaram a dificuldade de se obter parâmetros de interação ternários confiáveis e recomendaram cautela no ajuste destes parâmetros aos dados experimentais.

O sistema $\text{NH}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ recebeu atenção de uma série de outros trabalhos que utilizaram a metodologia termodinâmica proposta por Edwards *et al.* (1978) e tiveram como objetivo o aumento da precisão e da confiabilidade do modelo através da obtenção de uma maior quantidade de dados experimentais e de novas correlações para o modelo. Pawlikowski *et al.* (1982) determinaram o efeito da temperatura sobre os parâmetros de interação entre as espécies iônicas e moleculares formadas pela amônia e pelo dióxido de carbono em água e estudaram o efeito da adição de nitrato e de sulfato de potássio sobre o equilíbrio do sistema. Kawazuishi e Prausnitz (1987) apresentaram correlações para as constantes de Henry, para as constantes de dissociação dos eletrólitos e para os parâmetros de interação baseados em seus resultados experimentais somados aos resultados de trabalhos anteriores. Outros trabalhos estenderam a faixa de validade do modelo de Edwards *et al.* (1978) pela obtenção de dados experimentais adicionais, parâmetros de interação mais consistentes e pelo estudo da inclusão de sais não voláteis à fase aquosa (Tabela 2.1).

Bieling *et al.* (1995), Kurz *et al.* (1996) e Pérez-Salado Kamps *et al.* (2000) observaram a formação de precipitado sólido de NaHCO_3 em algumas condições experimentais e Kurz *et al.* (1995) observaram a precipitação de NH_4HCO_3 em alguns de seus experimentos, o que fez com que os autores incluíssem o produto de solubilidade destes sais para a modelagem do equilíbrio sólido-líquido-vapor estabelecido.

Tabela 2.2 – Estudos de equilíbrio líquido-vapor ou sólido-líquido-vapor de sistemas compostos por NH₃ e CO₂ em equilíbrio com uma fase aquosa utilizando o modelo de Edwards *et al.* (1978).

| Gases | T (K) | $P_{m\acute{a}x}$ ^a (bar) | Sais | Referência |
|-----------------------------------|-----------|--------------------------------------|--|---|
| CO ₂ e NH ₃ | 373 – 423 | 35 | KNO ₃ , K ₂ SO ₄ | Pawlikowski <i>et al.</i> , 1982 |
| CO ₂ e NH ₃ | 413 – 478 | 108 | – | Kawazuishi e Prausnitz, 1987 |
| CO ₂ e NH ₃ | 333 – 393 | 70 | – | Göppert e Maurer, 1988 |
| CO ₂ e NH ₃ | 333 – 473 | 90 | – | Bieling <i>et al.</i> , 1989 ^b |
| CO ₂ | 313 – 433 | 100 | Na ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ | Rumpf e Maurer, 1993 |
| CO ₂ | 313 – 433 | 100 | NH ₄ Cl | Rumpf e Maurer, 1994 |
| CO ₂ e NH ₃ | 313 – 393 | 30 | Na ₂ SO ₄ | Bieling <i>et al.</i> , 1995 |
| CO ₂ e NH ₃ | 310 – 470 | 7 | – | Kurz <i>et al.</i> , 1995 |
| CO ₂ e NH ₃ | 313 – 393 | 30 | NaCl | Kurz <i>et al.</i> , 1996 |
| CO ₂ | 313 – 353 | 27 | MDEA, AMP ^c | Silkenbäumer <i>et al.</i> , 1998 |
| CO ₂ | 313 – 433 | 100 | CH ₃ COONa, CH ₃ COONH ₄ | Xia <i>et al.</i> , 1999, 2000 |
| CO ₂ e NH ₃ | 313 – 393 | 7 | NH ₄ Cl, NH ₄ NO ₃ , NaNO ₃ | Pérez-Salado Kamps <i>et al.</i> , 2000 |

a. $P_{m\acute{a}x}$ é a pressão máxima investigada em cada trabalho.

b. Neste trabalho os autores realizaram um estudo de otimização dos parâmetros de interação, sem a obtenção de novos dados experimentais.

c. MDEA e AMP são as aminas N-metildietanolamina e 2-amino-2-metil-1-propanol, respectivamente, sujeitas a reações de ionização em fase aquosa.

2.3.3. Sistemas de eletrólitos contendo o bicarbonato de sódio

O íon bicarbonato é um dos mais importantes tampões para o controle de pH em fluidos biológicos juntamente com o CO₂ (Romero e Boron, 1999), e foi utilizado neste trabalho para o controle de pH nos estudos de precipitação isoelétrica da insulina suína. Por este motivo, é importante o estudo do comportamento termodinâmico deste sistema. Pitzer e Peiper (1980) determinaram experimentalmente os coeficientes de atividade do bicarbonato de sódio e utilizaram o modelo de Pitzer (1973) para obter os parâmetros de interação binários $\beta^{(0)}$ e $\beta^{(1)}$ para o sal. Os coeficientes de atividade foram determinados até a concentração de 1 M e, segundo Pitzer e Mayorga (1973), os coeficientes de interação ternários (ou terceiros coeficientes viriais) para esta faixa de concentração podem ser desconsiderados.

Os coeficientes de atividade e osmótico do bicarbonato de sódio foram determinados por Sarbar *et al.* (1982) em misturas aquosas de bicarbonato de sódio e de carbonato de sódio. Para a realização dos experimentos, as soluções de carbonato e de bicarbonato de sódio eram equilibradas com uma atmosfera de CO₂, de modo a reduzir a formação deste gás pelo bicarbonato em solução.

A termodinâmica de soluções aquosas de carbonato, bicarbonato e cloreto de sódio foi estudada extensivamente por Peiper e Pitzer (1982), que obtiveram coeficientes de atividade para o carbonato e para o bicarbonato de sódio entre 273 e 323 K, além das entalpias molares e capacidades caloríficas a 298 K. Os autores também ajustaram parâmetros de interação binários e ternários aos resultados experimentais.

A solubilidade do dióxido carbono e de outros gases presentes no gás natural em soluções aquosas de bicarbonato de sódio até a pressão de 580 bar e temperatura de 403 K foi estudada por Gao *et al.* (1997). Os autores relataram que, em reservas de gás encontradas no Mar do Sul da China, o principal sal encontrado na fase aquosa era o bicarbonato de sódio e que as solubilidades desses gases nas condições encontradas nessas reservas não haviam sido relatadas até então. A presença do gás na fase aquosa foi medida por um medidor de fluxo volumétrico após a despressurização de uma amostra da fase líquida. Devido às reações de dissociação na fase aquosa, as medidas de solubilidade do CO₂ apresentaram erros experimentais da ordem de 10%, mas mesmo assim foi possível

verificar o efeito de "salting-out" causado pelo aumento da concentração mássica de bicarbonato de sódio na fase líquida. Estas frações mássicas correspondem a concentrações de 0,24 e 0,83 M, respectivamente. Os dados experimentais foram correlacionados satisfatoriamente pela equação modificada de Patel-Teja (Zuo e Guo, 1991).

Wong *et al.* (2005) investigaram a solubilidade do dióxido de carbono em soluções aquosas de ácido clorídrico e de bicarbonato de sódio a pressão atmosférica entre as temperaturas de 278 a 298 K e obtiveram parâmetros de interação utilizando o modelo de Pitzer (1973).

2.4. Modelos para o equilíbrio de fases de sistemas contendo biomoléculas

2.4.1. Fundamentos de solubilidade

Essencialmente, a determinação do equilíbrio de fases de uma proteína no processo de precipitação em uma fase aquosa salina se resume à resolução de um equilíbrio sólido-líquido, ou em alguns casos, de um equilíbrio líquido-líquido. No caso mais comum, de equilíbrio sólido-líquido, pode-se definir o estado de equilíbrio da proteína pela determinação de sua solubilidade na fase aquosa em determinada condição de pressão, temperatura e composição.

A proteína se molda em um meio aquoso de modo a minimizar o contato dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos com as moléculas de água e maximizar o contato dos resíduos hidrofílicos polares e carregados. As forças que atuam para estabilizar a proteína em seu estado nativo provêm de pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e de interações com o solvente. Em fase aquosa, estas forças tendem a manter os resíduos hidrofóbicos no interior da proteína e os resíduos polares e carregados em sua superfície. Entretanto, apesar da atuação destas forças, a proteína geralmente contém uma parcela significativa de resíduos hidrofóbicos em sua superfície (Harrison *et al.*, 2003). Fatores como estrutura, tamanho, carga, hidrofobicidade e hidrofilicidade dos aminoácidos que compõem a proteína e características do solvente têm grande influência sobre sua solubilidade, sendo necessário considerá-los no estudo do equilíbrio de fases.

Termodinamicamente, o estado de um sistema em equilíbrio é definido pela temperatura, pressão e composição. A regra de fases determina que o número de graus de liberdade de um sistema, F , seja dado pela relação:

$$F = c - \pi + 2 \quad (2.11)$$

onde c é o número de componentes e π o número de fases. A temperatura e pressão fixas, a equação 2.11 se reduz a:

$$F = c - \pi \quad (2.12)$$

Considerando-se um sistema de três componentes contendo água, proteína e um sal a temperatura e pressão constantes, se houver duas fases no sistema e a composição do sal for mantida constante, o número de graus de liberdade do sistema será igual a zero e as composições das duas fases terão necessariamente que ser fixas, ou seja, a concentração da proteína na fase aquosa será independente da quantidade total de proteína no sistema. Segundo Arakawa e Timasheff (1985), esta é a definição da solubilidade. Entretanto, faz-se uma ressalva a esta afirmação. No caso de equilíbrio sólido-líquido, esta definição é válida, todavia, no caso onde um equilíbrio líquido-líquido seja estabelecido, o número de graus de liberdade também será igual a zero, porém, as composições de equilíbrio não serão independentes da quantidade total de proteína no sistema (Shih *et al.*, 1992). Apesar da relação 2.12 continuar totalmente válida e fixar a condição de equilíbrio, cada valor de quantidade total de proteína no sistema pode resultar em diferentes valores de composição para as fases líquidas. A definição de solubilidade de Arakawa e Timasheff (1985) é demonstrada pelos estudos de Butler (1940) sobre a solubilidade da quimotripsina, em que quantidades crescentes da proteína foram adicionadas a soluções de MgSO_4 . As concentrações de proteína em solução aumentaram linearmente com a adição da proteína até o aparecimento de uma nova fase sólida, mantendo-se constante a partir de então (Figura 2.5).

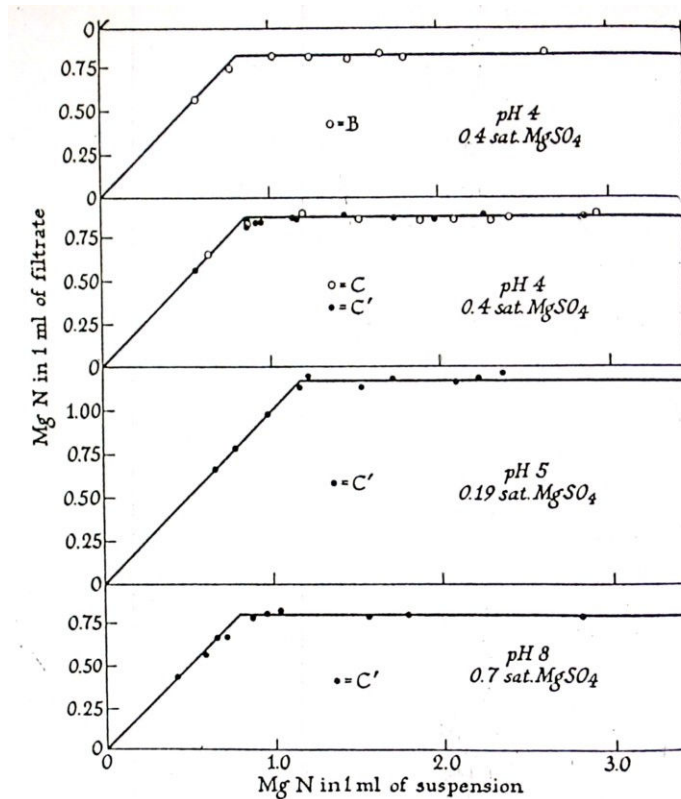


Figura 2.5 – Curvas de solubilidade de diferentes frações (B, C e C') de quimotripsina (Butler, 1940). Nota-se que Mg representa o elemento magnésio e a abreviação de miligramas nos eixos x e y da figura.

2.4.2 Modelos para o equilíbrio de fases de sistemas contendo aminoácidos

Como já dito anteriormente, as proteínas são compostas por aminoácidos, que são as suas unidades básicas. Os aminoácidos possuem algumas propriedades similares a das proteínas, como por exemplo o caráter anfotérico o que faz com que a sua carga global também seja dependente do pH do meio. Por esta propriedade, os aminoácidos são também chamados de "zwitterions", o que significa que são íons dipolares com capacidade de carregar tanto cargas positivas quanto negativas (Harris e Birch, 1930). Os estudos realizados com aminoácidos podem auxiliar na compreensão do comportamento das proteínas e peptídeos e possibilita a realização de comparações, ainda que com certa cautela, pois as proteínas e peptídeos são compostos muito mais complexos do que os aminoácidos (Edsall e Gutfreund, 1983).

A solubilidade de aminoácidos foi investigada por Pinho *et al.* (1994), que modelaram as solubilidades pelo método UNIFAC (Fredenslund *et al.*, 1977) combinado a um termo de Debye-Hückel, inserido diretamente na expressão da energia livre de Gibbs de excesso. Além do cálculo do coeficiente de atividade dos aminoácidos pelo modelo, também foram consideradas as reações químicas de dissociação de seus grupos ionizáveis em solução. O aminoácido na forma sólida foi considerado como uma fase sólida pura e a sua dissolução foi considerada como uma reação química caracterizada por uma constante. Dados experimentais de solubilidade em função da temperatura foram ajustados à constante de dissolução da fase sólida, que foi posteriormente utilizada com o modelo de coeficiente de atividade para estudar o efeito do pH do meio sobre o equilíbrio de fases dos sistemas. O modelo foi capaz de correlacionar bem o efeito do pH sobre as solubilidades dos aminoácidos (Figura 2.6). Segundo os autores, a dependência da solubilidade em relação ao pH do meio estava intimamente ligada às reações de ionização dos grupos ionizáveis dos aminoácidos incluídas no modelo. Porém, apenas aminoácidos contendo um grupo ácido e um grupo básico foram considerados.

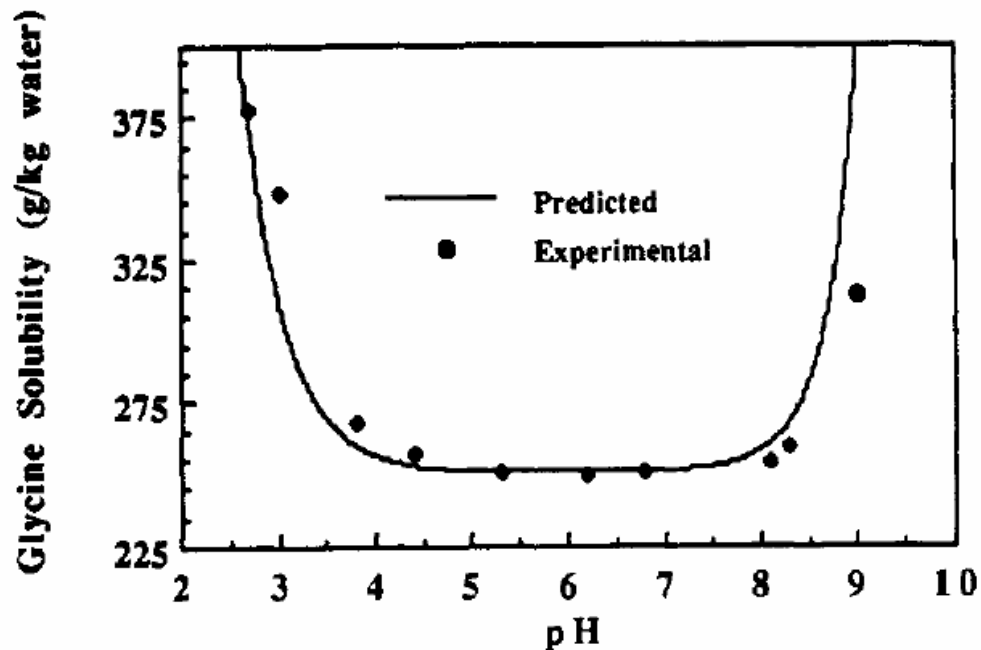


Figura 2.6 – Solubilidade experimental e calculada para a glicina a 298,15 K (Pinho *et al.*, 1994).

O efeito de ácidos e bases sobre as solubilidades dos aminoácidos glicina, DL-alanina, DL-valina e DL-serina foram estudados por Pradhan e Vera (1998) entre os valores de pH de 2,0 a 10,0. Foram utilizados os ácidos HCl e HNO₃ e as bases NaOH e KOH para o ajuste de pH. Não foram verificadas diferenças marcantes entre os valores de solubilidade em relação aos diferentes íons utilizados, fato que os autores atribuem às baixas concentrações destes íons para a faixa de valores de pH investigada. Os dados experimentais de solubilidade foram satisfatoriamente correlacionados por um modelo de coeficientes de atividade associado às constantes de dissociação dos grupos ionizáveis dos aminoácidos, com o ajuste de apenas um parâmetro.

Ninni e Meirelles (2001) associaram o modelo de UNIFAC-Larsen (Larsen et al., 1987) com a equação de Debye-Hückel para a modelagem da densidade, pH, atividade e solubilidade de soluções de aminoácidos. Entre os aminoácidos, os autores incluíram a arginina, que possui dois grupos básicos e um grupo ácido, e consideraram as reações químicas de ionização, balanço de massa e de cargas em solução. Bons resultados foram obtidos nos cálculos da solubilidade em função do pH em comparação com os valores experimentais.

2.4.3 Modelos para o equilíbrio de fases de sistemas contendo proteínas

Uma equação empírica comumente utilizada para se correlacionar a solubilidade de proteínas em soluções salinas é a equação de Cohn, dada pela seguinte expressão (Bell *et al.*, 1983):

$$\log S = \beta - K.I \quad (2.13)$$

em que S é a solubilidade da proteína, I é a força iônica e β e K são constantes. A constante β é essencialmente independente do sal, mas é fortemente dependente do pH, da temperatura e da proteína, usualmente passando por um mínimo no ponto isoelétrico. A inclinação da curva de solubilidade K , usualmente denominada de constante de "salting-out", independe do pH e da temperatura, mas varia com o sal e proteína envolvidos (Bell *et al.*, 1983).

De acordo com o tratamento teórico de Melander e Horvath (1977) o "salting-out" de proteínas pode ser descrito como um balanço entre o processo de "salting-in", devido a processos eletrostáticos, e o processo de "salting-out", devido a efeitos hidrofóbicos. Utilizando uma forma adimensional da equação de Cohn, os autores propuseram que a constante de "salting-out" pode ser expressa pela relação:

$$K = \Omega\sigma - \lambda \quad (2.14)$$

sendo $\Omega\sigma$ relacionado ao processo de "salting-out" devido a interações hidrofóbicas e λ relacionado ao "salting-in" devido a interações eletrostáticas. Em princípio, estas correlações empíricas para o processo de "salting-out" de proteínas são também aplicáveis à precipitação isoelétrica. Contudo, o termo β é sensível à mudança de pH e teria de ser ajustado a cada variação deste parâmetro, e há a limitação inerente aos modelos empíricos, que não explicam em termos fenomenológicos o que ocorre nos processos.

Em um estudo de precipitação de proteínas por "salting-out", Shih *et al.* (1992) verificaram que as concentrações iniciais de BSA e de α -quimotripsina afetavam a solubilidade aparente dessas proteínas em tampões e concluíram que a segunda fase formada no processo de precipitação era uma fase líquida densa. Neste caso, a condição de equilíbrio do sistema seria mais apropriadamente descrita por um coeficiente de partição líquido-líquido entre as fases do sobrenadante e do precipitado, ao invés da solubilidade. Os autores reforçaram ainda que definição de solubilidade deve ser usada apenas quando o soluto dissolvido em solução está em equilíbrio com uma fase sólida pura. O equilíbrio líquido-líquido de proteínas também foi relatado em estudos anteriores (van Megen, 1974, Tombs *et al.*, 1974, Ishimoto e Tanaka, 1977, Thomson *et al.*, 1987, Poppelo *et al.*, 1990, 1991, Taratura *et al.*, 1990, Chiew *et al.*, 1995).

Chiew *et al.* (1995) propuseram um modelo termodinâmico molecular para o processo de "salting-out" de proteínas, considerando-se o equilíbrio líquido-líquido entre uma fase aquosa com a proteína diluída e uma outra fase aquosa rica em proteína. A solução ternária composta de proteína, eletrólito e água foi considerada como um pseudo-componente contendo apenas um meio contínuo, a fase aquosa salina, e moléculas

globulares de proteínas. Os autores basearam o modelo em potenciais de força média entre as moléculas de proteínas e desenvolveram uma equação de estado para calcular os potenciais químicos da fase sobrenadante e da fase densa rica em proteína. No entanto, segundo os autores, o modelo apresentou apenas resultados “semi-quantitativos” em relação aos dados experimentais. Outras abordagens para o equilíbrio de fases de proteínas baseadas em potenciais de força média foram estudadas por Kuehner *et al.* (1996), Curtis *et al.* (2001), Kim e Bae (2003), Tavares *et al.* (2004) e Tavares e Prausnitz (2004).

Agena *et al.* (1997) utilizaram o modelo UNIQUAC (Abrams e Prausnitz, 1975) para representar o coeficiente de atividade de proteínas. Os coeficientes de atividade calculados pelo modelo foram comparados com os coeficientes de atividade obtidos a partir de dados experimentais de pressão osmótica, sendo que os valores calculados apresentaram boa concordância com os valores experimentais. Os autores consideraram as soluções aquosas salinas como um pseudo-solvente e obtiveram parâmetros para o método de contribuição de grupos a partir das seqüências de aminoácidos e identificação das estruturas da lisozima, albumina sérica, α -quimotripsina e β -lactoglobulina. Para cada sistema estudado constituído pela proteína e pela solução aquosa salina, foi necessário o ajuste de três parâmetros binários aos dados experimentais.

Um modelo de solubilidade de proteínas em soluções salinas tendo por base o modelo UNIQUAC (Abrams e Prausnitz, 1975) foi proposto por Agena *et al.* (1999), em que o comportamento não ideal da fase líquida era representado pelo coeficiente de atividade e a mudança de fases da proteína da fase sólida para a fase líquida era representada por uma constante de equilíbrio. A fase sólida foi considerada como uma fase cristalina pura. Efeitos de interações eletrostáticas de longo alcance foram desconsiderados, pois segundo Taratuta *et al.* (1990) e Kuehner *et al.* (1996), em sistemas com altos valores de força iônica, há um efeito de blindagem das cargas elétricas pelos íons de cargas opostas. Apesar dos bons resultados apresentados pelo modelo em relação aos dados experimentais de solubilidade obtidos (desvio médio de 5,8%), cada sistema composto por proteína, cátion, ânion e pseudo-solvente precisou de um grande número de parâmetros de

interação ajustáveis. Para alguns sistemas, até 12 parâmetros de interação foram determinados.

Coutinho e Pessoa (2004) modificaram o modelo UNIQUAC (Abrams e Prausnitz, 1975), incluindo um termo referente a interações eletrostáticas de longo alcance para o cálculo de coeficientes de atividade de proteínas. Neste modelo, a carga global da proteína foi utilizada como um parâmetro ajustável, que mostrou concordância com o valor de carga global calculada. Demonstrou-se que o termo de Debye-Hückel devido a interações eletrostáticas é um termo importante para o cálculo dos coeficientes de atividade. Houve boa concordância dos coeficientes de atividade calculados em relação aos valores experimentais. No entanto, os autores não calcularam as solubilidades das proteínas.

Poucos trabalhos estiveram diretamente relacionados com a modelagem do efeito do pH sobre a solubilidade das proteínas em fase aquosa. Fredericq e Neurath (1950) estudaram o efeito do pH sobre a solubilidade da insulina bovina zínica em soluções de cloreto de sódio (NaCl) e de tiocianato de potássio (KCNS) e suas misturas em concentrações totais de 0,1 M e verificaram que a curva de solubilidade é afetada pelo tipo de sal, apesar de preservarem o perfil típico em forma de U (Figura 2.7). Os autores propuseram uma equação empírica para o cálculo da solubilidade similar à equação de Cohn, porém, com dependência quadrática em relação ao pH:

$$\log S = \log S_0 - K(pH - pH_0)^2 \quad (2.15)$$

em que S é a solubilidade, pH_0 é o pI, valor de pH para o qual ocorre o mínimo de solubilidade (S_0) e K é uma constante. Pela análise dos resultados experimentais de solubilidade através da equação 2.15, os autores encontraram os valores de pI para a insulina de 5,15, 4,70 e 4,40 nas soluções de NaCl 0,1 M, NaCl 0,08 M – KCNS 0,02 M e NaCl 0,05 M – KCNS 0,05 M, respectivamente, sugerindo que o íon CNS^- pode causar o decréscimo da carga global da insulina pela interação com os grupos positivamente carregados da proteína.

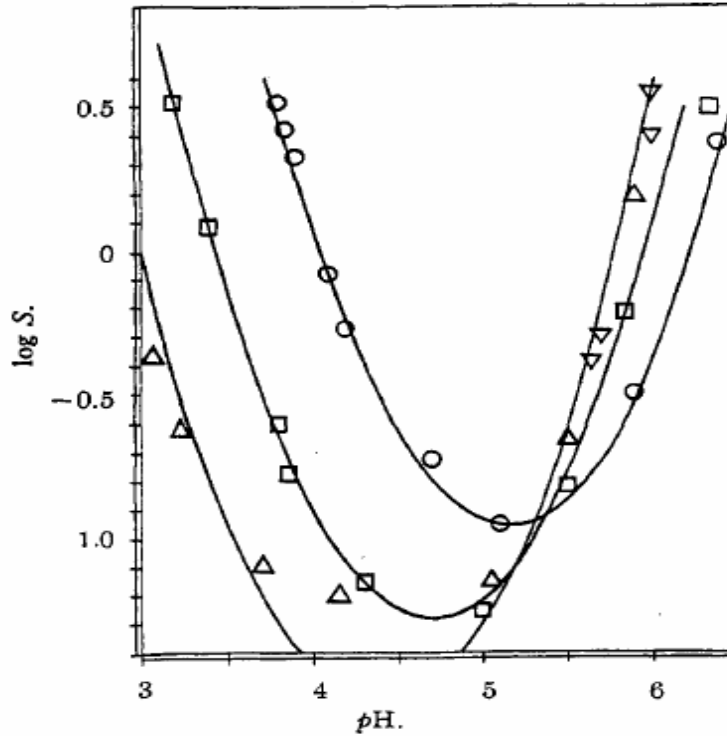


Figura 2.7 – Efeito do pH sobre o logaritmo da solubilidade da insulina a várias concentrações de NaCl e KCNS totalizando 0,1 M: (○) NaCl 0,1 M; (□) NaCl 0,08 M – KCNS 0,02 M; (△) NaCl 0,05 M – KCNS 0,05 M; (▽) KCNS 0,1 M. As curvas são os valores calculados pela equação 2.12 (Fredericq e Neurath 1950).

Tanford (1961) considerou as proteínas como polieletrólitos e tomando-se por base a teoria de Debye-Hückel e a igualdade das atividades da proteína em soluções saturadas, propôs uma expressão para o cálculo de sua solubilidade em soluções de sais diluídos a partir da solubilidade da proteína em água. A igualdade das atividades da proteína foi expressa por:

$$a_p = a_{p,w} \Rightarrow S_p \gamma_p = S_{p,w} \gamma_{p,w} \quad (2.16)$$

sendo a_p e $a_{p,w}$ as atividades da proteína na solução salina e em água, S_p e $S_{p,w}$ as solubilidades e γ_p e $\gamma_{p,w}$ os coeficientes de atividade. A equação para o coeficiente de atividade foi dada pela relação:

$$\ln \gamma_p = -\frac{z_p^2 e^2 N_A \kappa}{2DRT(1 + \kappa a)} \quad (2.17)$$

em que z é a carga da proteína, a é a soma dos raios iônicos da proteína e do raio médio dos íons que sustentam a proteína em solução e κ é definido pela seguinte equação:

$$\kappa = \sqrt{\frac{8\pi N_A e^2 I}{1000 D k_B T}} \quad (2.18)$$

Considerando-se o coeficiente de atividade da proteína em água igual à unidade devido ao valor de I próximo a zero e rearranjando-se a equação 2.16, chega-se a (Arakawa e Timasheff, 1985):

$$\ln \left(\frac{S_p}{S_{p,w}} \right) = \frac{z^2 e^2 N_A \kappa}{2DRT(1 + \kappa a)} \quad (2.19)$$

De acordo com esta equação, a solubilidade aumenta com a raiz quadrada da força iônica e deve apresentar um valor mínimo no ponto isoelétrico, em que a carga global da proteína é igual a zero (Tanford, 1961; Arakawa e Timasheff, 1985). Também se observa que a solubilidade deve ser qualitativamente proporcional ao quadrado de z (Tanford, 1961).

Entretanto, apesar de elucidativa em relação ao comportamento de solubilidade da proteína em relação a sua carga global e à força iônica da solução, a expressão 2.19 se baseia em uma aproximação da teoria de Debye-Hückel e apresenta as limitações inerentes a esta teoria, que é válida apenas para baixas concentrações de eletrólitos ($I < 0,01$ M, Prausnitz *et al.*, 1999). Além disso, Tanford (1961) considerou que no ponto isoelétrico, z^2 não era igual a zero em virtude de momentos de dipolo, quadrupolo, etc. presentes na molécula, que não desapareceriam mesmo com a carga global nula. Assim, a equação desenvolvida por Tanford (1961) não foi utilizada pelo autor para os cálculos de solubilidade, apenas para estudos qualitativos.

Bramaud *et al.* (1995) utilizaram a equação proposta por Tanford (1961) para o cálculo de solubilidade da α -lactalbumina em seu ponto isoelétrico, no entanto, os autores consideraram z^2 como um parâmetro ajustável que representava os momentos de dipolo da

proteína e encontraram um valor de 7,4. Este valor é alto para uma proteína em seu ponto isoelétrico e não pode realmente representar a sua carga global. Em um estudo sobre o fracionamento de α -lactalbumina, Bramaud *et al.* (1997) utilizaram a mesma metodologia para o cálculo da solubilidade da proteína, mas desta vez, encontraram um valor de 8,6 para z^2 no ajuste aos dados experimentais.

2.5. Insulina

A insulina é um hormônio peptídico produzido nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, que age como regulador do equilíbrio metabólico de glicose no sangue (Doyle e Egan, 2003). Os diversos tipos de insulina possuem massa molecular aproximada de 5,8 kDa, e na falta de uma definição clara em relação aos limites de tamanho de uma proteína, muitos autores a consideram como um polipeptídeo, enquanto outros a consideram como uma proteína. Neste trabalho, a insulina será considerada como uma proteína.

Sob condições fisiológicas normais, as células β no interior das ilhotas pancreáticas secretam a insulina na corrente sanguínea em função do processo de ingestão de nutrientes. A insulina é então levada pela corrente sanguínea para os tecidos alvo, os quais possuem receptores de insulina em suas superfícies celulares. Tecidos onde a insulina age incluem o fígado, músculos e tecido adiposo. A ligação da insulina aos receptores das células alvo induz a uma série de eventos intracelulares que culminam no aumento da captura celular da glicose circulante e de outros nutrientes, bem como no armazenamento do glicogênio como gordura, além de aumentar a expressão gênica e a síntese de proteínas (Shoelson, 2000).

Deficiências na produção de insulina resultam no desenvolvimento de diabetes mellitus (tipo 1), uma doença crônica caracterizada pela elevação dos níveis de glicose no sangue e pela presença de glicose na urina. A diabetes mellitus também resulta em um decréscimo na biosíntese de ácidos graxos e de proteínas. Esta doença é causada, na maioria dos casos, por danos irreversíveis às células produtoras de insulina, as células β . Os eventos moleculares que levam a tais danos ainda são pouco compreendidos, embora autoimunização, infecções virais e predisposição genética estejam entre as prováveis causas (Walsh e Headon, 1994).

Inicialmente, acreditava-se que o pâncreas tinha a função de regular os níveis de glicose no sangue. Nos experimentos de von Mering e Minkowski, em 1889, a remoção do pâncreas de um cachorro levou ao desenvolvimento de hiperglicemia. Somente em meados de 1920 foi demonstrado que uma secreção interna do pâncreas poderia ser isolada e utilizada para se diminuir os níveis elevados de glicose dos cães cujos pâncreas haviam sido extraídos (Eknayan, 2006).

Embora a insulina tenha sido reconhecida como uma proteína logo após a sua descoberta, a sua estrutura primária só viria a ser elucidada por Frederik Sanger em 1954 (Brandenburg, 1999). A insulina foi a primeira proteína a ter a sua estrutura primária inteiramente determinada e, por este feito, Frederik Sanger recebeu em 1959 o prêmio Nobel em Química (Shoelson, 2000).

Todas as moléculas de insulina conhecidas são compostas de duas cadeias polipeptídicas, denominadas cadeia A, com 21 aminoácidos, e cadeia B, com 30 aminoácidos. Nas insulinas humana, suína e bovina, as duas cadeias estão ligadas covalentemente por duas pontes dissulfeto, uma entre as cisteínas nas posições A7 e B7 e outra entre as cisteínas A20 e B19 (Figura 2.8). Ainda há uma ponte adicional na cadeia A, ligando as cisteínas A6 e A11. As estruturas primárias da insulina humana, suína e bovina são similares. A insulina suína difere da humana por apenas um aminoácido na posição B30: a insulina humana tem uma treonina nesta posição, enquanto a suína possui uma alanina. A insulina bovina difere da humana em três posições, A8, A10 e B30: nestas posições, a insulina humana possui treonina, isoleucina e treonina, respectivamente, enquanto a bovina possui alanina, valina e alanina (Shoelson, 2000).

A cadeia A da insulina possui duas regiões helicoidais, uma que envolve os aminoácidos A2 a A8 e outra de A13 a A20, que estão posicionadas aproximadamente de modo antiparalelo uma da outra, e que estão unidas por uma parte entendida da cadeia de A9 a A12 (Figura 2.9A). Na cadeia B, há uma parte central em conformação de α -hélice constituída dos aminoácidos B9 a B19, a partir da qual as cadeias N e C terminal se estendem em extremidades opostas. O arranjo das pontes dissulfeto que unem as cadeias A e B protege os resíduos apolares da molécula de insulina e faz com que ela tenha um interior hidrofóbico, importante na manutenção de sua estrutura (Blundell *et al.*, 1972).

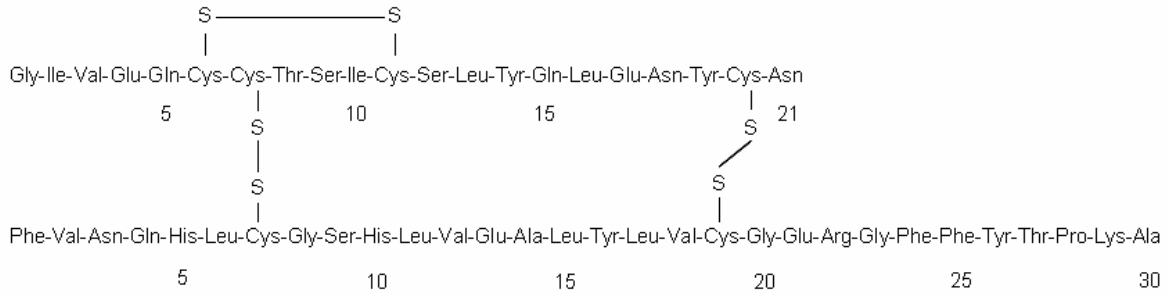


Figura 2.8 – Estrutura primária da insulina suína. A insulina possui duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto (adaptado de Berg *et al.*, 2002).

A molécula de insulina possui 23 resíduos polares que estão todos em sua superfície. Dos 16 grupos da cadeia A total ou parcialmente expostos na superfície da molécula de insulina, 11 são polares, enquanto na cadeia B, dos 28 grupos, 12 são polares (Blundell *et al.*, 1972). A molécula possui também grupos ionizáveis, que incluem dois ácidos glutâmicos e duas tirosinas na cadeia A e, na cadeia B, dois ácidos glutâmicos, duas tirosinas, duas histidinas, uma lisina e uma arginina, além dos resíduos N e C terminais das duas cadeias (Gursky *et al.*, 1992). A Figura 2.9B ilustra os tipos de resíduos de aminoácidos (hidrofóbicos, polares e ionizáveis) presentes na molécula de insulina suína.

Por muitos anos, pacientes com diabetes foram tratados com insulinas isoladas de pâncreas suíno e bovino e, até o início da década de 1980, as insulinas para propósitos terapêuticos provinham quase que exclusivamente por estas vias. Entretanto, alguns pacientes tratados com insulinas de fonte animal desenvolviam anticorpos contra a insulina, sugerindo que as diferenças nas estruturas primárias pudessem estimular estas respostas imunológicas (Shoelson, 2000).

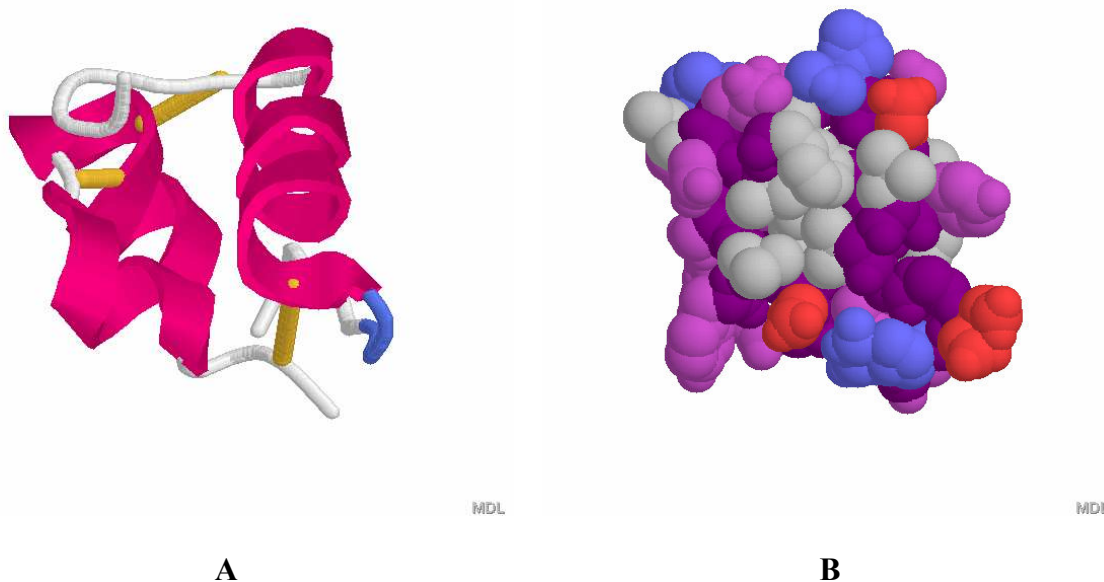


Figura 2.9 – Estruturas tridimensionais da insulina suína criadas a partir do arquivo 9INS.PDB (Gursky *et al.*, 1992) no programa Protein Explorer 2.80. (A) representação das estruturas helicoidais da molécula em rosa e das pontes dissulfeto em amarelo; (B) aminoácidos colorizados de acordo com a sua natureza: (■) hidrofóbicos; (■) polares; (■) ionizáveis com carga positiva (NH_x^+); (■) ionizáveis com carga negativa (COO^-); (■) estrutura da cadeia polipeptídica.

Avanços na tecnologia recombinante tornaram possível a produção comercial da insulina humana biosintética para propósitos terapêuticos em bactérias ou fungos. De fato, a produção biosintética da insulina pode ser vista como o protótipo para a indústria de biotecnologia. Estima-se que a demanda mundial anual de insulina nos anos de 1990 estava entre 15.000 e 25.000 kg e crescia a uma taxa anual de 5 a 6% (Harrison *et al.*, 2003). O processo de produção da insulina humana da Eli Lilly pela fermentação em bactérias recombinantes requer 31 etapas principais, das quais 27 estão associadas com a recuperação e a purificação do produto (Ladisch, 2001). Nas etapas finais de purificação, a insulina é concentrada pela precipitação gerando cristais de insulina zíncica. O procedimento consiste na adição de sais de amônio, cloreto de zinco e no ajuste do pH do meio para valores

próximos ao ponto isoelétrico da insulina, o que leva à formação de cristais que são recuperados subsequentemente por filtração (Ladisch, 2001; Harrison *et al.*, 2003).

As preparações terapêuticas de insulina podem ser divididas entre insulina de ação rápida, intermediária e lenta, dependendo da rapidez de sua resposta e tempo de duração de seu efeito. A preparação de ação rápida é composta pela insulina em solução, a intermediária por uma suspensão contendo uma mistura de precipitados amorfos e cristalinos e a de ação lenta é composta de cristais de insulina em suspensão (Shoelson, 2000).

O estado físico da insulina em variadas condições fisiológicas nas células β do pâncreas de várias espécies é a forma cristalina, e sabe-se que os cristais romboédricos de insulina contém zinco em sua estrutura (Blundell *et al.*, 1972). A primeira cristalização da insulina na forma romboédrica foi realizada por Abel (1926), mas o rendimento dos cristais era tão variável que havia muitas dúvidas em relação à identidade da insulina (Blundell *et al.*, 1972). A descoberta de que os cristais de insulina eram na realidade um complexo de zinco e insulina (Scott, 1934) e que a presença deste metal promovia a sua cristalização permitiu a produção comercial de insulina pelo crescimento de cristais a partir de extratos de tecido pancreático (Walsh e Headon, 1994). Em estudos voltados ao crescimento de cristais de insulina para o tratamento clínico de diabetes, Schlichtkrull (1956) descobriu que os cristais de insulina contêm dois átomos de zinco para cada seis moléculas de insulina, que compõem o hexâmero, a unidade básica do cristal de insulina.

É razoavelmente certo que o hexâmero encontrado em cristais é essencialmente o mesmo observado em soluções de insulina zíncica. Estudos cristalográficos da insulina contendo dois átomos de zinco por seis moléculas de insulina mostraram que o cristal hexamérico é constituído por três dímeros (Adams *et al.*, 1969; Blundell *et al.*, 1971). A simetria do cristal requer que o hexâmero esteja organizado em três dímeros equivalentes, sendo o dímero a unidade assimétrica do cristal (Figuras 2.10 e 2.11). A molécula de insulina tem uma grande face apolar que compõe a região de contatos entre dois monômeros, formando o dímero. Quase todos os resíduos que formam os contatos do dímero ficam protegidos do contato com as moléculas do solvente (Blundell *et al.*, 1972). Pocker e Biswas (1981) enfatizaram que dados experimentais e de cristalografia em raio-X

estabelecem inequivocamente que as interações hidrofóbicas desempenham um papel fundamental na formação do dímero de insulina. Em um estudo termodinâmico de cristalização, Bergeron *et al.* (2003) concluíram que a interação hidrofóbica é o fator de maior importância para a cristalização da insulina.

O modelo de formação do hexâmero de insulina a partir de três dímeros foi considerado em estudos como um processo de formação de um tetrâmero a partir de dois dímeros e em seguida pela adição de mais um dímero a este tetrâmero, o que gerou bons resultados em comparação com dados experimentais (Jeffrey e Coates, 1966; Goldman e Carpenter, 1974; Pocker e Biswas, 1981; Helmerhorst e Stokes, 1986, 1987). A Figura 2.12 esquematiza o processo de formação do hexâmero de insulina a partir do monômero e do dímero (Dunn, 2005).

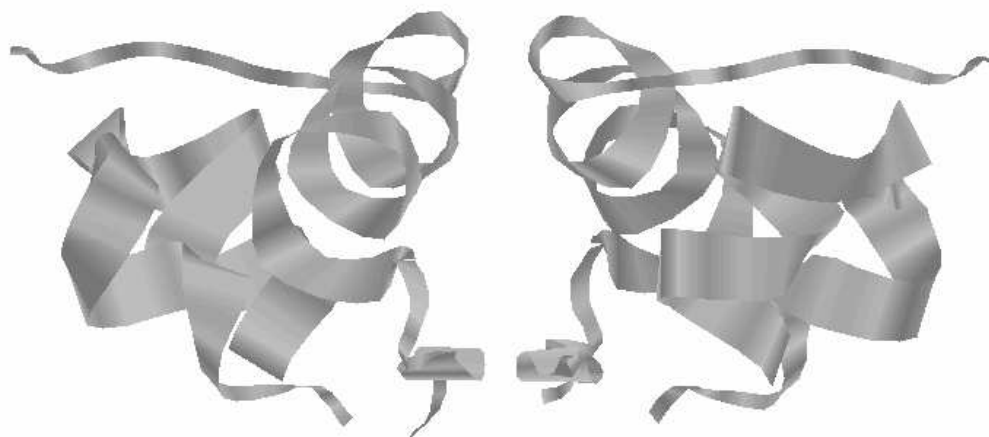


Figura 2.10 – Dímero de insulina suína. A estrutura foi criada a partir do arquivo 4INS.PDB (Baker *et al.*, 1988) no programa Rasmol 2.4.

As composições de aminoácidos das estruturas primárias das insulinas fazem com que elas apresentem o ponto isoelétrico na região ácida. Em experimentos de mobilidade elétrica com a insulina adsorvida em quartzo, Wintersteiner e Abramson (1932) determinaram que o ponto isoelétrico da insulina em acetato de sódio estava entre os valores de pH de 5,30 a 5,35. Entretanto, os autores não especificaram de que fonte

provinha a insulina. Kaarsholm *et al.* (1990) estudaram a titulação e o comportamento dos valores de pK_a das cadeias ionizáveis da insulina humana e verificaram o seu pI no valor de pH 5,26 em cloreto de guanidínio 6,0 M. Porém, em solução de KCl 0,1 M, o pI foi encontrado no pH 6,35. Os autores atribuíram a discrepância deste último resultado à inibição da ionização de um dos resíduos ácidos da molécula de insulina devido a interações entre monômeros, e concluíram que os valores de pI observados sob condições desnaturantes e não desnaturantes foram diferentes.

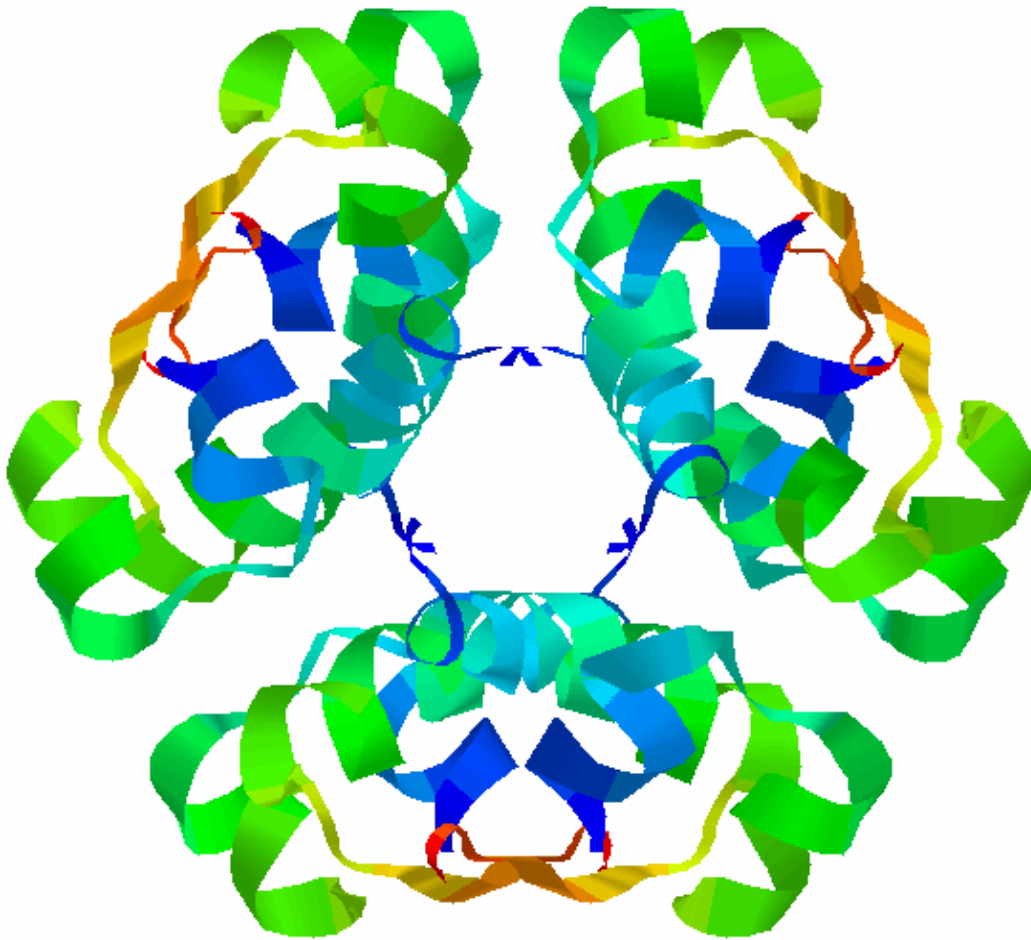


Figura 2.11 – Hexâmero de insulina humana. A estrutura foi criada a partir do arquivo 3AIY.PDB (O'Donoghue *et al.*, 2000) no programa Rasmol 2.4.

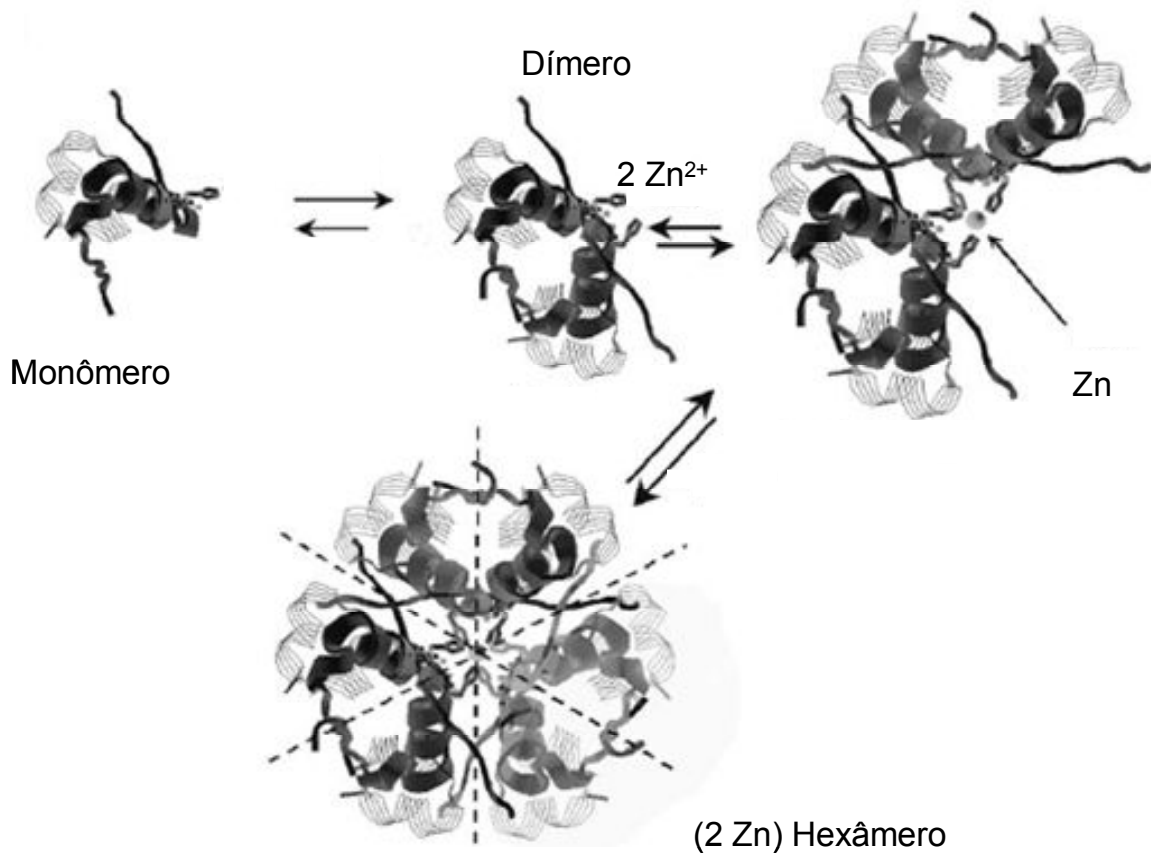


Figura 2.12 – Passos para a formação do hexâmero de insulina suína a partir das unidades monoméricas e diméricas (adaptado de Dunn, 2005). As estruturas foram criadas a partir do arquivo 4INS.PDB (Baker *et al.*, 1988).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

A insulina suína com 96,6% de pureza contendo 0,5% de Zn foi gentilmente doada pela Biobrás (Montes Claros, MG). A insulina humana (Humulin) utilizada neste trabalho como controle para os ensaios de atividade biológica, produzida pela Biobrás (Montes Claros, MG), foi adquirida do comércio local. O bicarbonato de sódio foi adquirido da J. T. Baker (México), o dióxido de carbono com pureza superior a 99,8% foi adquirido da White Martins Gases Industriais (Campinas, SP), o fosfato de sódio bibásico, as soluções tampão de pH 4,00 e 7,00 e o cloreto de sódio foram adquiridos da Merck (Alemanha) e o ácido fosfórico 85% foi adquirido da Ecibra (São Paulo, SP).

3.2. Equipamento para a precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis

O aparato experimental utilizado para a precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis (Figuras 3.1 a 3.4) foi especialmente projetado e construído para a realização deste trabalho juntamente com a Autic Automação e Instrumentação Industrial (Campinas, SP). O equipamento (Figuras 3.2 e 3.3) consiste de um vaso de pressão para a precipitação em aço inox 316 com volume interno de 340 mL, duas janelas de quartzo (Autoclave Engineers, EUA) para monitoramento visual da parte interna da unidade, sistema de agitação magnética e jaqueta térmica para controle de temperatura. O vaso de pressão, ou reator, tem capacidade para operar até a pressão de 300 bar a 20°C, de acordo com laudo do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT, São Paulo, SP). As janelas de quartzo resistem até a pressão de 413 bar a 238°C, segundo laudo do fabricante. A vedação do reator se dá pelo encaixe e compressão de dois cones metálicos, um deles na tampa e outro no corpo da unidade, e pelo fechamento feito por um sistema duplo de algema metálica e parafusos.



Figura 3.1 – Imagem do equipamento para a precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis.

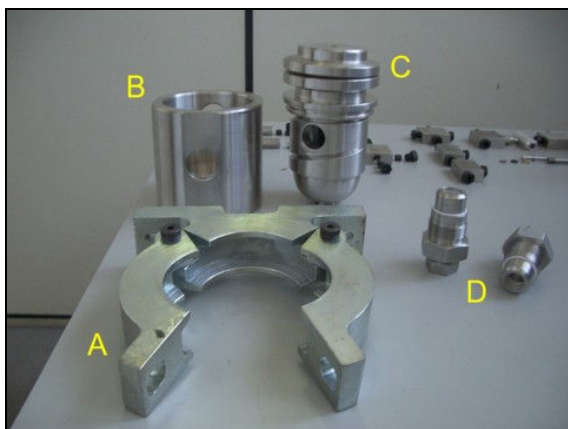


Figura 3.2 – Partes do equipamento: A: alga; B: jaqueta térmica; C: unidade de precipitação; D: janelas de quartzo acomodadas em peças de aço inox 316.

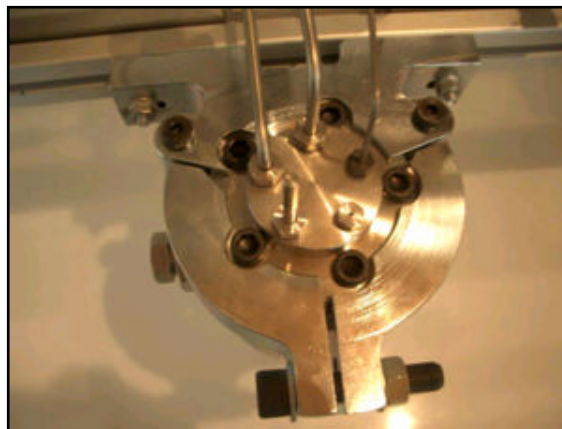


Figura 3.3 – Sistema combinado de fechamento da unidade de precipitação com a alga e parafusos.

O sistema de precipitação (Figura 3.4) foi projetado para a realização da precipitação isoelétrica com o CO₂ ou amônia (NH₃), para precipitação de proteínas de pI ácido ou básico, respectivamente, ou com os dois eletrólitos voláteis simultaneamente para a precipitação por "salting-out". Todavia, apenas o CO₂ foi utilizado neste trabalho, de modo que a descrição do processo incluindo a amônia é meramente conceitual, mas foi realizada no caso da precipitação isoelétrica por CO₂.

Os fluidos entram pelas tubulações L-01 e L-02 e passam pelas válvulas de retenção VR-01 e VR-02, respectivamente. As válvulas de retenção impedem o retorno dos fluidos para os cilindros. A pressão nas linhas é medida por manômetros de processo ZS (Zurich Indústria e Comércio, São Paulo, SP) de 0 a 100 kgf/cm² (0 a 98 bar) e 0 a 25 kgf/cm² (0 a 25 bar) para o CO₂ e o NH₃, respectivamente. A alimentação dos gases é feita após a abertura das válvulas micrométricas V-01 e V-02. Após a passagem por estas válvulas, os fluidos passam pelo filtro de linha FL-01 de 5 µm para então seguirem para o reator. As amostras da fase líquida são coletadas por diferença de pressão através da abertura da válvula micrométrica V-03. As amostras passam por uma tubulação de PEEK (poli-éter-éter-cetona, Upchurch Scientific, EUA) resistente a pressão de até 7000 psi (483 bar), com 1/16" (1,6 mm) de diâmetro externo e 0,020" (0,5 mm) de diâmetro interno (Figura 3.5). Um filtro de seringa Minisart 16534 de porosidade de 0,2 µm (Sartorius, Alemanha) é acoplado à extremidade da tubulação de PEEK e uma tubulação de borracha de 5 mm de diâmetro, que permanece imersa na solução aquosa, é acoplada ao filtro no interior do reator (Figura 3.6), de modo que os precipitados em solução são retidos pelo filtro antes de passarem pela despressurização na válvula V-03. A despressurização do sistema é feita pela abertura da válvula da fase vapor V-04.

Como já mencionado, neste trabalho apenas o CO₂ foi avaliado como agente precipitante. Neste caso, a válvula V-02 permaneceu sempre fechada, apenas abrindo-se a válvula V-01 para a alimentação do fluido (CO₂). A pressão do sistema foi ajustada por um regulador de pressão acoplado ao cilindro, modelo HPS4-1500 (Victor Specialty Products, EUA) com pressão máxima de entrada de 6000 psig (414 bar) e pressão máxima de saída de 1500 psig (103 bar).

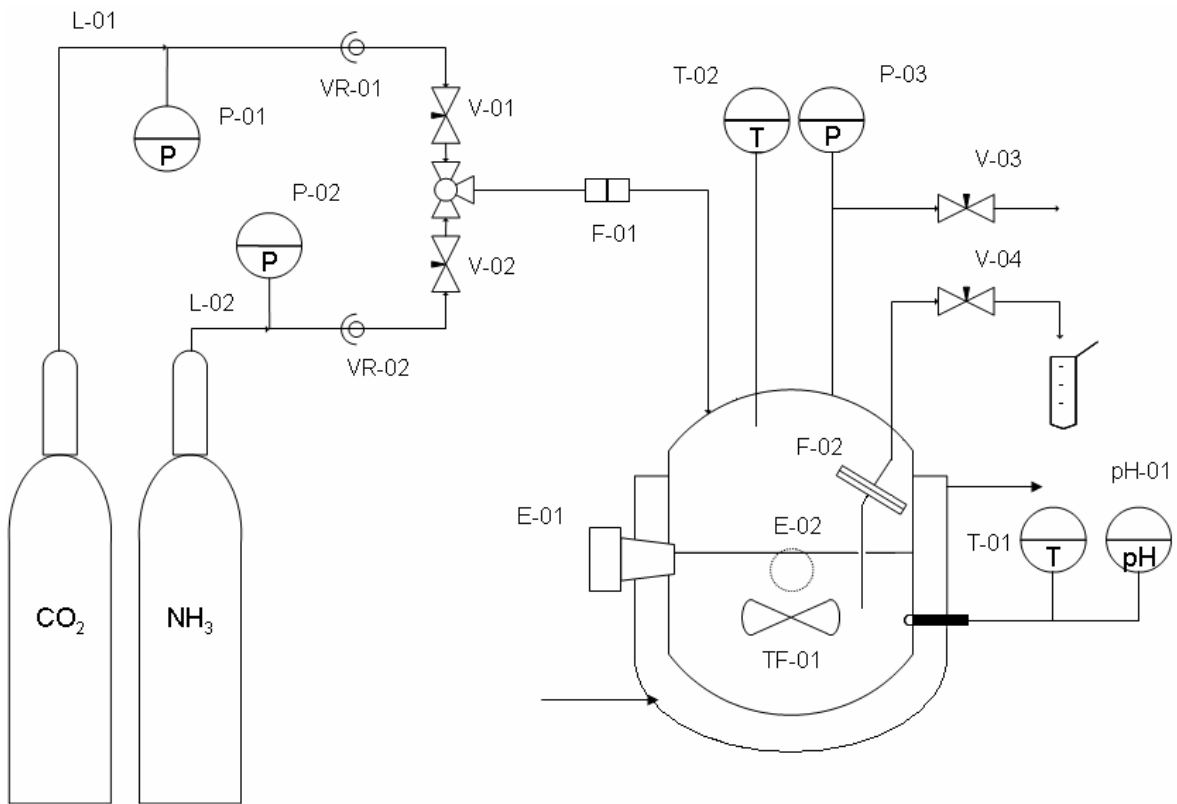


Figura 3.4 – Esquema do equipamento para a precipitação de proteínas por eletrólitos voláteis. L-01 e L-02: linhas de entrada de CO_2 e NH_3 , respectivamente; P-01 e P-02: manômetros das linhas de entrada; VR-01 e VR-02: válvulas de retenção; V-01 e V-02: válvulas micrométricas de entrada; F-01: filtro de linha; E-01 e E-02: janelas de quartzo para observação; TF-01: barra magnética recoberta por teflon para agitação da solução; F-02: filtro para amostragem da fase líquida; P-03: manômetro do reator; V-03: válvula micrométrica da fase vapor; V-04: válvula micrométrica da fase líquida; T-01 e T-02: termopares da fase líquida e da fase vapor; pH-01: sensor de pH do reator.

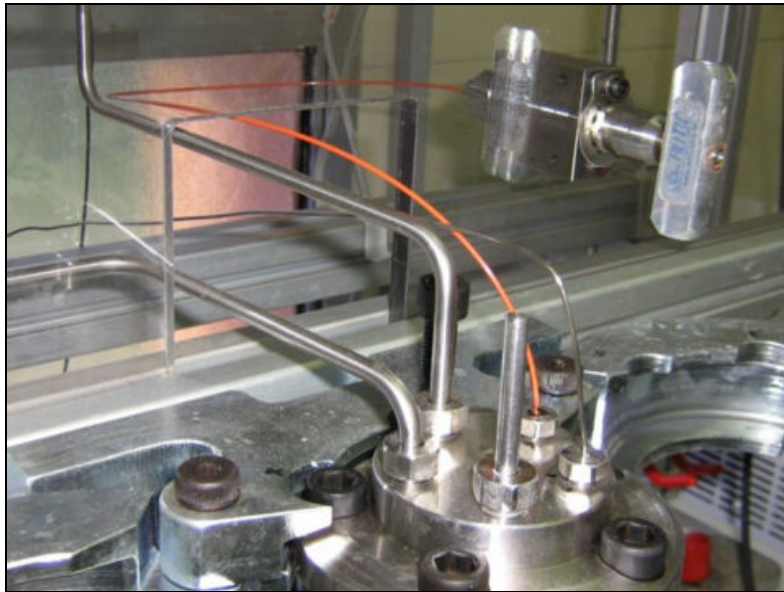


Figura 3.5 – Tubulação de PEEK de 1/16” (de cor laranja) para a retirada de amostras da fase líquida.

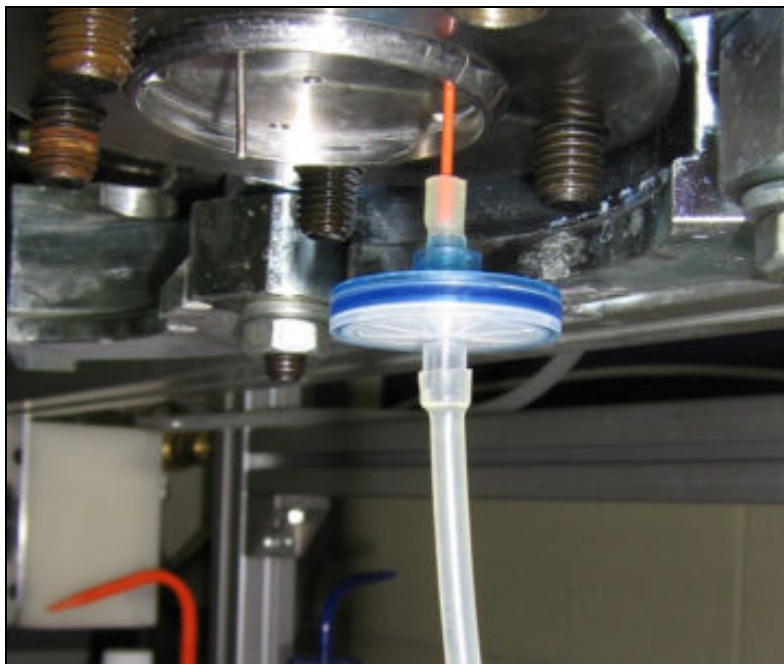


Figura 3.6 – Filtro de seringa de 0,2 µm para a retenção dos precipitados, acoplado ao tubo de PEEK na parte superior e a uma tubulação de borracha na parte inferior, que permanece imersa na fase líquida.

Para a realização dos experimentos, a unidade de precipitação era encaixada na jaqueta térmica (Figura 3.7). As janelas de quartzo e o sensor de pH também tinham a função de fixar e vedar a unidade de precipitação pelas laterais da jaqueta (Figura 3.8). A vedação era feita por anéis de teflon.



Figura 3.7 – Inserção da unidade de precipitação na jaqueta térmica.



Figura 3.8 – Fixação e vedação da unidade de precipitação pelo encaixe das janelas de quartzo e do sensor de pH.

A temperatura do reator era controlada (com precisão de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) pelo uso de uma jaqueta térmica, alimentada pelo banho termostatzado TE-2000 (Tecnal, Piracicaba, SP). A solução era agitada pela barra magnética, tendo a velocidade de agitação controlada (em $\pm 2,0\%$ para velocidades acima de 200 rpm) pela placa de agitação magnética Super-Nuova modelo SP131825 (Barnstead International, EUA). A barra magnética permanecia suspensa a 5 mm do fundo da unidade apoiada por uma estrutura de teflon (Figuras 3.9 e 3.10). A pressão no reator era medida com precisão de $\pm 0,15$ bar pelo transmissor de pressão digital PSI-420 (Zurich Indústria e Comércio, São Paulo, SP), operando na faixa de 0 a 60 bar, e indicada no painel de instrumentação PLN-2 (Zurich Indústria e Comércio, São Paulo, SP). O pH e a temperatura da solução eram medidos com precisões de $\pm 0,03$ e $\pm 1^{\circ}\text{C}$, respectivamente, pelo sensor TBX567 (ABB, EUA) e indicados no painel de instrumentação TB84PH (ABB, EUA). A temperatura da fase vapor era medida com precisão de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ por um termopar QJ-2 (Ecil, Piedade, SP) e indicada no painel de

instrumentação CLTV/2 (Digimec Automação Industrial, São Paulo, SP). A aquisição de dados dos painéis de instrumentação era feita por uma “webcam” modelo Creative Webcam Live! (Creative Labs, EUA) configurada para capturar imagens dos painéis de instrumentação em intervalos de tempo regulares (Figura 3.11). As imagens eram posteriormente analisadas e os dados tabulados em uma planilha. Uma imagem típica capturada dos painéis de instrumentação é ilustrada na Figura 3.12.



Figura 3.9 – Barra de agitação magnética apoiada em uma estrutura de teflon.



Figura 3.10 – Barra magnética posicionada na unidade de precipitação.

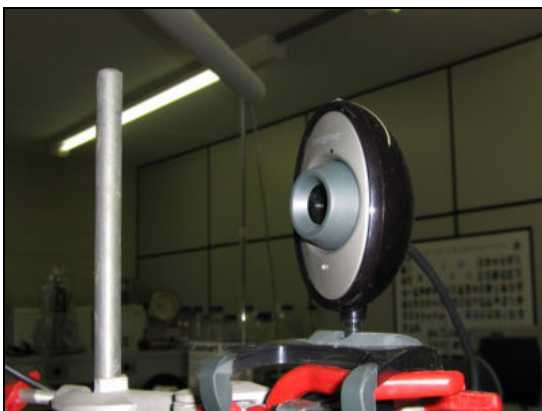


Figura 3.11 – “Webcam” utilizada para a aquisição de dados dos painéis de instrumentação.



Figura 3.12 – Imagem típica dos painéis de instrumentação capturada pela “webcam”.

3.3. Métodos experimentais

3.3.1 Preparação das soluções de insulina suína para os experimentos de precipitação

Para os experimentos de precipitação com CO_2 , a insulina suína foi pesada, colocada em um frasco Erlenmeyer juntamente com 250 mL de solução de NaHCO_3 e agitada por uma barra magnética por um período de 48 h devido à dissolução lenta da insulina. Após este período, a solução foi filtrada em filtros de seringa Minisart 16534 de porosidade de 0,2 μm (Sartorius, Alemanha) para a remoção de material particulado. Para os experimentos de precipitação com ácido fosfórico (H_3PO_4), a insulina suína foi dissolvida em solução de Na_2HPO_4 seguindo-se o mesmo procedimento de preparação para a precipitação com CO_2 .

3.3.2. Medidas de pH da água e de soluções de NaHCO_3 pressurizada por CO_2

O sensor de pH da unidade de precipitação foi calibrado com os tampões de pH 4,00 e 7,00 na temperatura do experimento a ser realizado. Em seguida, 250 mL de água ou de solução de NaHCO_3 em concentrações de 10 ou 50 mM foram alimentados à unidade de precipitação, que foi fechada mantendo-se a temperatura constante. Após a estabilização da temperatura, o ar remanescente foi substituído por CO_2 pela passagem contínua deste com vazão superior a 120 mL/min a 25°C e pressão atmosférica (1 bar) por 15 min. Para os experimentos a pressão atmosférica, após a remoção do ar, a passagem de CO_2 continuou com uma vazão baixa (< 10 mL/min) e com a válvula da fase vapor (V-03) aberta para a atmosfera. Para os experimentos a pressões superiores, a válvula da fase vapor foi fechada e o regulador de pressão ajustado até a pressão experimental. A agitação se iniciou logo que a pressão atingiu o valor experimental e manteve o valor constante de 720 rpm até o final do experimento. O tempo necessário para que o pH do sistema atingisse o equilíbrio foi de 2,5 h, ao final do qual as medidas de pH de equilíbrio foram registradas.

Para as medidas de vazão de CO_2 , uma mangueira de borracha foi acoplada à válvula de saída de CO_2 e a extremidade da mangueira foi imersa em um recipiente com água. A vazão de CO_2 na válvula de saída foi medida pelo borbulhamento do gás no recipiente, onde uma proveta graduada e com água foi imersa de modo invertido, com a

abertura desta sendo mantida abaixo do nível de água. Assim, as bolhas de CO₂ subiam pelo corpo da proveta e completavam o seu volume, que era medido a cada minuto.

3.3.3. Cinética da precipitação isoelétrica da insulina suína com o CO₂

Inicialmente, o sensor de pH foi calibrado com os tampões de pH 4,00 e 7,00 na temperatura do experimento a ser realizado. Em seguida, 250 mL de solução de insulina suína em NaHCO₃ 10 mM foram alimentados à unidade de precipitação, que foi fechada mantendo-se a temperatura constante. Após a estabilização da temperatura, o ar remanescente foi substituído por CO₂ pela passagem contínua deste gás com vazão superior a 120 mL/min por 15 min. Para os experimentos a pressão atmosférica, após a remoção do ar, a passagem de CO₂ continuou com uma vazão menor do que 10 mL/min, sendo que a válvula da fase vapor (V-03) permaneceu aberta para a atmosfera. Para os experimentos a pressões superiores, a válvula da fase vapor foi fechada e o regulador de pressão ajustado até a pressão experimental.

Os experimentos foram realizados sem agitação ou então com agitação de 480 rpm e os tempos necessários para que o pH atingisse o valor de equilíbrio foram determinados em ambos os casos. Nos experimentos realizados com agitação da solução, esta se iniciou logo que a pressão atingiu o valor experimental e se manteve constante até o final do experimento. Os registros de valores de pH eram realizados a cada 15 minutos a partir da “webcam”, configurada para a captura de imagens neste intervalo de tempo. As imagens eram posteriormente analisadas e os dados tabulados. As amostras da fase líquida eram retiradas em intervalos de tempo que variavam entre múltiplos de 1,5 e 3,0 h pela abertura da válvula V-04, por diferença de pressão, após passarem pelo filtro de 0,2 µm no interior da unidade de precipitação. Para os experimentos realizados a pressão atmosférica, as amostras da fase líquida eram retiradas por uma abertura na tampa da unidade de precipitação através de uma seringa, a qual era acoplada um filtro de 0,2 µm e uma tubulação de borracha para o acesso à fase líquida.

Previamente à coleta de amostras da fase líquida, um volume mínimo de 4,5 mL era purgado do sistema para a limpeza das tubulações e dos filtros. Em seguida, eram retirados volumes de 1,5 mL para cada amostra, coletadas em triplicata, as quais tinham a

concentração de insulina medidas por espectrofotometria em UV. Para medidas de concentração na fase sobrenadante, considerou-se que no processo de amostragem todo o precipitado havia sido retido pelo filtro de 0,2 μm e que a insulina medida correspondia apenas à proteína presente em solução. Em algumas medidas de concentração em condições experimentais abaixo do ponto isoelétrico da insulina, a despressurização durante a amostragem e a saída do CO_2 da fase líquida fizeram com que o pH da solução voltasse perto do ponto isoelétrico (conforme verificado por medidas experimentais) e causasse uma nova precipitação da insulina suína. Nestes casos, adicionou-se HCl 0,01 M para solubilização do precipitado formado para então se realizarem as medidas de concentração de insulina.

3.3.3.1. Determinação do pH de equilíbrio nos ensaios cinéticos

Para a determinação do pH de equilíbrio, os valores de pH das soluções em função do tempo de experimento foram ajustados por uma função de decaimento exponencial de segunda ordem utilizando-se o software Microcal Origin 6.0, dada pela seguinte expressão:

$$\text{pH} = \text{pH}_0 + A_1 \exp\left(\frac{-t}{t_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{t_2}\right) \quad (3.1)$$

em que os parâmetros pH_0 , A_1 , A_2 , t_1 e t_2 eram ajustados aos dados experimentais de pH e t era o tempo de experimento, dado em horas. Considerou-se que o pH do sistema estava em equilíbrio a partir do instante no qual a variação de pH em função do tempo era menor do que 0,01 unidade, ou seja:

$$|\text{pH} - \text{pH}_0| < 0,01 \quad (3.2)$$

o que significa que:

$$\left| A_1 \exp\left(\frac{-t}{t_1}\right) + A_2 \exp\left(\frac{-t}{t_2}\right) \right| < 0,01 \quad (3.3)$$

3.3.3.2. Determinação da concentração de equilíbrio de insulina

Para a determinação da concentração de equilíbrio de insulina, os valores experimentais de concentração de insulina na fase sobrenadante em função do tempo foram ajustados por uma função de decaimento exponencial de primeira ordem utilizando-se o software Microcal Origin 6.0, dada pela seguinte expressão:

$$C_{IS} = C_{IS_0} + A_1 \exp\left(\frac{-t}{t_1}\right) \quad (3.4)$$

em que os parâmetros C_{IS_0} , A_1 e t_1 eram ajustados aos dados experimentais de concentração de insulina, C_{IS} , e t era o tempo de experimento, dado em horas. Considerou-se que concentração na fase sobrenadante estava em equilíbrio a partir do instante no qual a variação de concentração em função do tempo era menor do que 0,001 unidade, ou seja:

$$|C_{IS} - C_{IS_0}| < 0,001 \quad (3.5)$$

o que significa que:

$$\left| A_1 \exp\left(\frac{-t}{t_1}\right) \right| < 0,001 \quad (3.6)$$

A partir do momento em que o equilíbrio era alcançado, os valores de C_{IS} eram considerados dados de solubilidade.

3.3.4. Solubilidade da insulina suína na precipitação isoelétrica com o CO₂

O procedimento experimental foi similar ao item 3.3.3, porém, a velocidade de agitação foi fixada em 480 rpm para todos os experimentos de solubilidade e a duração dos experimentos foi, em geral, de 24 h. Em alguns casos, os experimentos foram conduzidos por até 72 h para que a condição de equilíbrio fosse confirmada.

3.3.5. Precipitação isoelétrica da insulina suína com o CO₂ para os ensaios de atividade biológica

O procedimento experimental foi similar ao descrito no item 3.3.4, porém, as soluções de insulina suína foram preparadas em soluções de NaHCO₃ nas concentrações de 10, 20 ou 50 mM. Após o período de 24 h de experimento, a unidade de precipitação foi despressurizada e o precipitado de insulina suína suspenso na fase sobrenadante foi recuperado por centrifugação a 9000 rpm (10414 g) por 15 min na centrífuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Alemanha). Após a centrifugação, a fase sobrenadante foi descartada e os precipitados, coletados e ressolubilizados para os ensaios de atividade biológica em tampão de cloreto de sódio 0,145 M e fosfato de sódio dibásico 0,01 M, pH 7,1 ajustado com ácido fosfórico 85%.

3.3.6 Precipitação isoelétrica da insulina suína com ácido fosfórico para os ensaios de atividade biológica

Para os ensaios de precipitação com o ácido fosfórico, 250 mL de solução de insulina suína em solução de fosfato de sódio dibásico (a 10, 20 ou 50 mM) foram alimentados à unidade de precipitação, que foi mantida aberta a temperatura e velocidade de agitação constantes, a 25°C e 480 rpm. Foram então adicionados volumes de ácido fosfórico 2,0 M até que o pH da solução chegasse ao ponto isoelétrico da insulina, no pH 5,3. Após o ajuste do pH, a solução foi mantida a temperatura e agitação constantes por 24 h. Ao final deste período, o precipitado de insulina foi recuperado por centrifugação a 9000 rpm (10414 g) por 15 min na centrífuga Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Alemanha). Após a centrifugação, a fase sobrenadante foi descartada e os precipitados foram coletados e ressolubilizados para os ensaios de atividade biológica em tampão de cloreto de sódio 0,145 M e fosfato de sódio dibásico 0,01 M, pH 7,1 ajustado com ácido fosfórico 85%.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Medidas de concentração da insulina em solução

A concentração da insulina suína em solução foi determinada por absorvância no espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Instruments, EUA), seguindo-se a metodologia proposta por Gehle e Schügel (1984). As absorvâncias foram medidas em cubetas de quartzo a 280 e a 320 nm e a diferença entre as medidas foi utilizada para se eliminar o efeito de eventual turbidez da solução no cálculo das concentrações. As medidas de absorvância foram relacionadas com as concentrações de insulina suína de soluções preparadas em balões volumétricos. As massas de insulina suína foram determinadas em uma balança analítica. As soluções de insulina suína foram preparadas em HCl 0,01 M, em tampão de citrato/ácido cítrico 0,05 M, em NaHCO₃ 10 mM e NaHCO₃ 50 mM e curvas de calibração foram determinadas para cada um destes sistemas.

3.4.2. Medida da quantidade de Zn da insulina suína

O teor de Zn presente na insulina suína foi determinado por Carlo F. Sebok no Laboratório de Engenharia Ambiental da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Meuris Gurgel Carlos da Silva, por espectroscopia de absorção atômica no espectroscópio Perkin Elmer Aanalyst 100 com lâmpada para Zn (Perkin Elmer, EUA).

3.4.3. Análise dos precipitados por microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos precipitados de insulina suína foi analisada por Kelly R. P. Sousa e Andréa A. M. Shimojo no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura Leica LEO 440i (Carl Zeiss, Alemanha) à 5 kV e 50 pA. Previamente às análises, as amostras foram liofilizadas e recobertas com uma camada de ouro.

3.4.4. Análise de atividade biológica da insulina suína

Os ensaios de atividade biológica da insulina suína foram realizados em camundongos por Dennys E. Cintra e José R. Pauli no Laboratório de Sinalização Celular da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, coordenado pelo Prof. Dr. Lício A. Velloso. As amostras de insulina foram preparadas em concentrações de $3,6 \cdot 10^{-6}$ M em soluções tampão de cloreto de sódio 0,145 M e fosfato de sódio dibásico 0,01 M, pH 7,1 ajustado com ácido fosfórico 85%. Foram injetados 14,5 nmol de insulina por quilograma do camundongo (de 25 g de massa corpórea por camundongo, em média). Os ensaios foram realizados em duplicata para cada amostra de insulina, sendo que cada camundongo recebeu uma injeção de 100 μ L da solução de insulina ensaiada. Os níveis de glicemia de amostras de sangue foram medidos por aparelhos portáteis Accu-Check Advantage (Roche Diagnostics, Alemanha) utilizando fitas de coleta Accu-Check Advantage II (Roche Diagnostics, Alemanha) entre os tempos 0 e 30 min de injeção a cada intervalo de 5 min. A coleta de sangue para a dosagem de glicose foi feita através de um corte na extremidade da cauda do animal.

A atividade biológica foi medida pelo teste de tolerância à insulina (ITT, "insulin tolerance test") de acordo com as metodologias de Lundbaek (1962) e Bonora *et al.* (1987). Neste teste, o desaparecimento de glicose do plasma em função do tempo é ajustado na fase de decaimento linear após a injeção de insulina pelo método de mínimos quadrados (em escala semilogarítmica). Calcula-se então através do ajuste, o tempo necessário para que o nível de glicemia caia pela metade ($t_{1/2}$) em relação a determinado valor, e a partir deste tempo, calcula-se a taxa de desaparecimento de glicose, K_{itt} , pela seguinte equação (Lundbaek, 1962):

$$K_{itt} = 100 \times \frac{0,693}{t_{1/2}} \quad (3.7)$$

Os valores de K_{itt} das amostras de insulina suína obtidas pela precipitação isoelétrica foram comparadas com a atividade biológica de controles de insulina humana e suína através do teste-t de Student pelo software Microcal Origin 6.0. Para este teste, considerou-se que as populações eram independentes, normalmente distribuídas e determinou-se um intervalo de confiança de 95%.

3.5. Métodos estatísticos

3.5.1. Estimativa do erro experimental das medidas de solubilidade

O erro experimental de cada série de experimentos foi estimado a partir da combinação dos erros obtidos nas repetições em cada um dos níveis da variável de interesse. Por exemplo, se a solubilidade da insulina era determinada em diversas condições de pressão, cada valor de pressão em que a medida era realizada referia-se a um nível. Considerando-se que a variância de cada uma das repetições era igual para todos os níveis da variável investigada, estas variâncias foram combinadas para gerar uma estimativa com um número maior de graus de liberdade (Neto *et al.*, 2002). Se em cada nível i a repetição era realizada n_i vezes, o número de graus de liberdade da variância s_i era $v_i = n_i - 1$, e a estimativa da variância experimental calculada pela expressão (Neto *et al.*, 2002):

$$s^2 = \frac{\sum_i v_i s_i^2}{\sum_i v_i} \quad (3.8)$$

em que a variância amostral (s_i^2) no nível i é estimada por:

$$s_i^2 = \frac{1}{n_j - 1} \sum_j (y_j - \bar{y})^2 \quad (3.9)$$

e o desvio padrão (s_i) é estimado por:

$$s_i = \sqrt{\frac{1}{n_j - 1} \sum_j (y_j - \bar{y})^2} \quad (3.10)$$

sendo n_j o número de repetições realizadas no nível i , y_j o valor medido da amostra j e \bar{y} a média amostral dos n_j valores. Assim, a estimativa do erro experimental foi dada por:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i v_i s_i^2}{\sum_i v_i}} \quad (3.11)$$

3.5.2. Teste-t de Student para comparação entre populações

O teste-t de Student é um teste estatístico que verifica se as médias de duas populações normalmente distribuídas são iguais. Considerando-se duas populações de mesma variância, mas possivelmente duas médias diferentes, o teste-t de Student avalia se a diferença entre as médias é estatisticamente significativa (Press *et al.*, 1986).

Para a aplicação do teste-t, primeiramente, estima-se o desvio padrão da diferença entre as médias, s_D , a partir da variância combinada pela fórmula (Press *et al.*, 1986):

$$s_D = \sqrt{\frac{\sum_1 (x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_2 (x_j - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} \quad (3.12)$$

em que cada somatório da equação 3.6 é aplicado aos pontos de uma amostra, 1 ou 2 (referentes às populações 1 ou 2), x_i e x_j são valores pontuais das amostras 1 e 2, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 são as médias amostrais, e n_1 e n_2 são os números de pontos nas amostras 1 e 2, respectivamente.

Em seguida, o valor de t é computado pela expressão:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_D} \quad (3.13)$$

Por fim, avalia-se a significância do valor de t através da distribuição de Student com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade. A significância (p) é um número com valores entre 0 e 1 e é a probabilidade de que t possa ser significativo apenas por casualidade para distribuições com médias iguais. Então, um valor numérico pequeno para a significância, definido por $p < 0,05$ para um intervalo de confiança de 95%, indica que a diferença observada é estatisticamente significativa (Press *et al.*, 1986).

4. MODELO TERMODINÂMICO

O modelo termodinâmico para o equilíbrio de fases da proteína em solução de eletrólitos voláteis foi baseado no modelo de eletrólitos de Pitzer (1973). Para que este modelo pudesse ser aplicado à proteína, ela também foi considerada como um eletrólito em solução. No entanto, esta consideração requer adaptações ao modelo, como por exemplo, o cálculo da carga global da proteína presente na fase aquosa. A proteína não possui um único estado de ionização, como é o caso dos eletrólitos convencionais, mas ela pode ter cargas positivas, negativas ou então se encontrar em um estado global neutro, dependendo das condições da solução. Isto porque as proteínas possuem uma grande quantidade de aminoácidos com grupos ionizáveis, que podem adquirir cargas positivas ou negativas, e como resultado, a carga global da proteína será a soma das contribuições de carga de cada um destes grupos (Tanford, 1962).

As forças de interação eletrostáticas influenciam inequivocamente o comportamento dessa classe de biomoléculas. Este fato levou diversos autores a considerar as proteínas como moléculas coloidais capazes de se tornar eletricamente carregadas. Desta abordagem surgiram modelos de equações de estado baseados em potenciais de força média, que incluem potenciais de esfera rígida, de dispersão e eletrostático (Chiew *et al.*, 1995; Kuener *et al.*, 1996; Prausnitz, 2003; Tavares *et al.*, 2004). Tais abordagens trataram da resolução do equilíbrio de fases das proteínas considerando-as como moléculas dispersas em um meio contínuo, o solvente, sendo o potencial eletrostático referente ao trabalho necessário para se inserir a carga elétrica na molécula de proteína. É certo que a variação de pH do meio muda os estados de ionização da molécula de proteína, e que estas mudanças têm reflexos em seu equilíbrio de fases. Sendo a contribuição eletrostática a de maior importância sobre o

comportamento da proteína no fenômeno de precipitação isoeletrica, é razoável considerar e modelar a molécula de proteína como um eletrólito. Entretanto, uma fase sólida é necessariamente eletricamente neutra e deve estar em equilíbrio com moléculas com carga total nula, o que levaria à necessidade de cálculo da fração neutra do total de moléculas protéicas em solução. O grande número possível de estados de ionização em uma molécula protéica e a incerteza de qual estado corresponde efetivamente ao precipitado faz com que essa abordagem seja muito difícil de ser utilizada. Por essa razão, optou-se por considerar que as interações eletrostáticas constituem uma das contribuições ao coeficiente de atividade da molécula protéica, semelhantemente aos estudos previamente citados, mas mantendo o caráter molecular da abordagem – isto é, sem o cálculo de produtos de solubilidade.

A modelagem do sistema contendo o eletrólito volátil e a proteína foi dividida em duas etapas: modelagem do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$ e modelagem do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3/\text{insulina suína}$. Na primeira etapa, modelou-se o equilíbrio de fases do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$ utilizando-se o modelo de Edwards *et al.* (1978) para se calcular o pH de equilíbrio em função das condições de pressão, temperatura e composição. Em seguida, na segunda etapa, considerando-se que no fenômeno de precipitação da proteína se estabelecia um equilíbrio sólido-líquido, a proteína foi incluída no modelo.

4.1. Fundamentos termodinâmicos

O equilíbrio de um componente i entre duas fases α e β quaisquer é dado pelas condições de igualdade dos potenciais térmico (temperatura), mecânico (pressão) e químico do componente em cada uma das fases (Prausnitz *et al.*, 1999):

$$T_i^\alpha = T_i^\beta \quad (4.1)$$

$$P_i^\alpha = P_i^\beta \quad (4.2)$$

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta \quad (4.3)$$

Para uma substância pura, o potencial químico está relacionado a temperatura e a pressão pela equação diferencial (Tester e Modell, 1996):

$$d\mu_i = S_i dT + V_i dP \quad (4.4)$$

Derivando-se a expressão 4.4 a temperatura constante e substituindo-se a expressão do gás ideal, obtém-se:

$$\left(\frac{\partial \mu_i}{\partial P} \right)_T = V_i = \frac{RT}{P} \quad (4.5)$$

Rearranjando-se e integrando-se a expressão 4.5 a temperatura constante, chega-se a:

$$\partial \mu_i = \frac{RT}{P} \partial P \quad (4.6)$$

$$\mu_i - \mu_i^0 = RT \ln \frac{P}{P^0} \quad (4.7)$$

sendo μ_i^0 e P^0 o potencial químico e a pressão em um estado de referência. O potencial químico μ_i não tem um significado físico imediato nem é possível medi-lo, então é desejável expressá-lo em termos de uma função auxiliar que pode ser mais facilmente identificada com a realidade física. Gilbert N. Lewis definiu a função f , chamada fugacidade, relacionando uma mudança isotérmica para qualquer componente em qualquer sistema, sólido, líquido ou gasoso, puro ou em mistura, ideal ou não através da seguinte expressão (Prausnitz *et al.*, 1999):

$$\mu_i - \mu_i^0 = RT \ln \frac{f_i}{f_i^0} \quad (4.8)$$

sendo f_i^0 a fugacidade no estado de referência do componente i . Para um gás ideal puro, a fugacidade é igual a pressão. Lewis chamou de atividade a_i a razão f_i / f_i^0 . A atividade provê uma medida da diferença entre o potencial químico da substância no estado de interesse em relação a um estado de referência.

Uma maneira mais conveniente de se calcular as fugacidades em soluções líquidas é obtida pela definição de uma solução líquida ideal e em seguida pela descrição dos desvios do comportamento ideal em termos de funções de excesso. Estas funções geram o coeficiente de atividade, que dá uma medida quantitativa do afastamento do

comportamento ideal. O coeficiente de atividade γ_i é a razão da atividade a_i por alguma medida conveniente de concentração de i . No caso de soluções de eletrólitos, a medida mais conveniente é a molalidade, ou seja, a concentração expressa em mol de i por kg de solvente (Tester e Modell, 1996):

$$\gamma_i = \frac{a_i}{m_i} = \frac{f_i}{m_i f_i^0} \quad (4.9)$$

A relação entre a energia livre de Gibbs molar parcial de excesso e o coeficiente de atividade é obtida pela definição de fugacidade. A temperatura, pressão e composição dos componentes diferentes de i constantes, a energia livre de Gibbs molar parcial é obtida pela derivação da energia livre de Gibbs em relação à quantidade de i (Prausnitz *et al.*, 1999):

$$\bar{G}_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,P,n_j \neq i} = RT \ln f_i \quad (4.10)$$

Pela definição, funções de excesso são propriedades termodinâmicas de soluções que estão em excesso em comparação com uma solução ideal às mesmas condições de temperatura, pressão e composição (Prausnitz *et al.*, 1999):

$$\bar{G}_i^{EX} = \bar{G}_i(\text{real}) - \bar{G}_i(\text{ideal}) = RT [\ln f_i(\text{real}) - \ln f_i(\text{ideal})] \quad (4.11)$$

$$\bar{G}_i^{EX} = RT \ln \frac{f_i(\text{real})}{f_i(\text{ideal})} \quad (4.12)$$

Para uma solução ideal, todas as funções de excesso são nulas. As fugacidades das soluções real e ideal são dadas pelas seguintes expressões (Prausnitz *et al.*, 1999):

$$f_i(\text{real}) = \gamma_i m_i f_i^0 \quad (4.13)$$

$$f_i(\text{ideal}) = m_i f_i^0 \quad (4.14)$$

em que f_i^0 é a fugacidade de i no estado de referência. Substituindo-se as relações 4.13 e 4.14 em 4.12, chega-se à:

$$\bar{G}_i^{EX} = RT \ln \gamma_i \quad (4.15)$$

Para uma solução ideal, o coeficiente de atividade é igual à unidade e a atividade é igual à concentração.

4.2. Modelagem do equilíbrio do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$

A modelagem de sistemas de eletrólitos voláteis em equilíbrio com uma fase aquosa é complexa devido ao grande número de espécies presentes, tanto na forma iônica quanto na forma molecular. Devem-se satisfazer simultaneamente os equilíbrios químicos e de fases para o eletrólito volátil, os balanços de massa e a condição de eletroneutralidade dos íons positivos e negativos em solução (Edwards *et al.* 1975, 1978).

O sistema em estudo, composto pela solução aquosa de bicarbonato de sódio e pelo eletrólito volátil dióxido de carbono, é representado na Figura 4.1. As setas verticais indicam o equilíbrio de fases do eletrólito volátil na forma molecular, enquanto as setas horizontais indicam o equilíbrio químico estabelecido entre as espécies moleculares e iônicas em fase líquida. O critério geral de equilíbrio para um componente i entre as fases líquida e vapor é dado pelas relações 4.1 a 4.3. A igualdade dos potenciais químicos pode ser representada pela igualdade das fugacidades do componente i , f_i , em cada uma das fases:

$$f_i^\alpha = f_i^\beta \quad (4.16)$$

Para o dióxido de carbono na forma molecular, o equilíbrio entre as fases vapor (V) e líquida (L) é dado por:

$$f_{\text{CO}_2}^V = f_{\text{CO}_2}^L \quad (4.17)$$

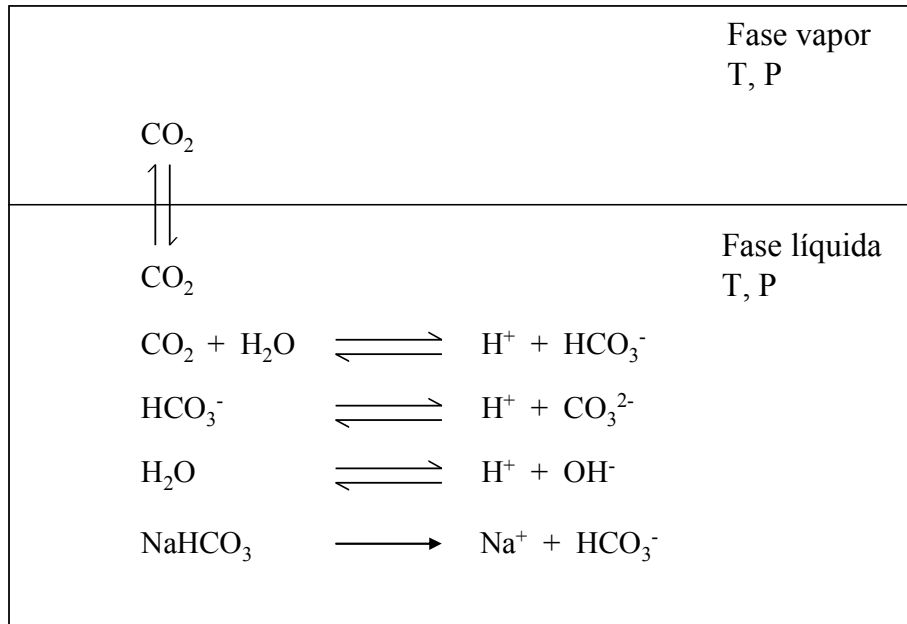


Figura 4.1 – Representação do equilíbrio líquido-vapor e dos equilíbrios químicos do sistema composto por CO_2 , H_2O e NaHCO_3 .

Relacionando a fugacidade da fase vapor ao coeficiente de fugacidade $\phi_{\text{CO}_2}^V$ e representando a fugacidade da fase líquida pela lei de Henry, as seguintes expressões são obtidas:

$$f_{\text{CO}_2}^V = y_{\text{CO}_2} \phi_{\text{CO}_2}^V P \quad (4.18)$$

$$f_{\text{CO}_2}^L = m_{\text{CO}_2} \gamma_{\text{CO}_2} H_{\text{CO}_2}(T, P) \quad (4.19)$$

sendo y_{CO_2} a fração molar de CO_2 na fase vapor, m_{CO_2} a molalidade (concentração em moles de CO_2 por kg de água), γ_{CO_2} o coeficiente de atividade e $H_{\text{CO}_2}(T, P)$ a constante de Henry do CO_2 em água. A constante de Henry é uma função da temperatura e, em menor grau, da pressão (Prausnitz *et al.*, 1999). A dependência da pressão é obtida pela equação de Krichevsky e Kasarnovsky (1935):

$$\ln H_i^{(P)} = \ln H_i^{(P^S)} + \frac{\bar{v}_i^\infty (P - P^S)}{RT} \quad (4.20)$$

em que $H_i^{(P^S)}$ é a constante de Henry avaliada na pressão de saturação do solvente (P^S), \bar{v}_i^∞ é o volume molar parcial do soluto i à diluição infinita e R a constante universal dos gases.

A pressões moderadas, o coeficiente de fugacidade da fase vapor pode ser calculado por uma equação virial. Considerando-se a fase vapor composta apenas de CO_2 puro (consideração válida para baixas temperaturas, em que a pressão de vapor da água seja muito menor do que a pressão parcial de CO_2), o seu coeficiente de fugacidade pode ser calculado pela equação:

$$\phi_i^V = \exp\left(\frac{B_i P}{RT}\right) \quad (4.21)$$

Em solução aquosa, o eletrólito sofre reações de dissociação, caracterizadas por uma constante de equilíbrio químico K . Considerando-se uma reação química genérica:



em que A e B são os reagentes e C e D são os produtos com os respectivos coeficientes estequiométricos ν_A , ν_B , ν_C e ν_D . A constante de equilíbrio químico da reação é dada por:

$$K = \prod_i a_i^{\nu_i} = \frac{a_C^{\nu_C} a_D^{\nu_D}}{a_A^{\nu_A} a_B^{\nu_B}} \quad (4.23)$$

em que a_i é a atividade do componente i . A atividade está relacionada ao coeficiente de atividade pela relação:

$$a_i = m_i \gamma_i \quad (4.24)$$

No sistema em estudo, as seguintes reações de dissociação são consideradas:



A condição de equilíbrio para cada reação é dada pelas equações 4.28 a 4.30:

$$K_1 = \frac{a_{H^+} a_{HCO_3^-}}{a_{CO_2} a_w} = \frac{m_{H^+} m_{HCO_3^-}}{m_{CO_2}} \cdot \frac{\gamma_{H^+} \gamma_{HCO_3^-}}{\gamma_{CO_2}} \cdot \frac{1}{a_w} \quad (4.28)$$

$$K_2 = \frac{a_{H^+} a_{CO_3^{2-}}}{a_{HCO_3^-}} = \frac{m_{H^+} m_{CO_3^{2-}}}{m_{HCO_3^-}} \cdot \frac{\gamma_{H^+} \gamma_{CO_3^{2-}}}{\gamma_{HCO_3^-}} \quad (4.29)$$

$$K_3 = \frac{a_{H^+} a_{OH^-}}{a_w} = \frac{m_{H^+} m_{OH^-} \gamma_{H^+} \gamma_{OH^-}}{a_w} \quad (4.30)$$

O coeficiente de atividade, obtido pela derivação da expressão de energia livre de Gibbs de excesso em relação à quantidade do componente i , foi calculado pelo modelo de eletrólitos de Pitzer (1973). Pitzer propôs a seguinte expressão para G^{EX} de uma solução de eletrólitos:

$$\frac{G^{EX}}{RTn_w M_w} = F(I) + \sum_i \sum_j m_i m_j \lambda_{i,j}(I) + \sum_i \sum_j \sum_k m_i m_j m_k \Lambda_{i,j,k} \quad (4.31)$$

sendo:

$$F(I) = -A_\phi \frac{4I}{b} \ln(1 + b\sqrt{I}) \quad (4.32)$$

$$A_\phi = \frac{1}{3} \sqrt{2\pi N_A \rho_s} \left(\frac{e^2}{4\pi \epsilon_0 D k_B T} \right)^{3/2} \quad (4.33)$$

$$\lambda_{i,j}(I) = \beta_{i,j}^0 + \beta_{i,j}^1 \frac{2}{\alpha^2 I} \left[1 - (1 + \alpha\sqrt{I}) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \quad (4.34)$$

n_w e M_w são o número de moles e a massa molecular do solvente, respectivamente, $F(I)$ representa a contribuição das forças coulômbicas ou de longo alcance e tem significado apenas para as espécies iônicas, eletricamente carregadas. Os demais termos da equação são as contribuições das interações de curto alcance, e apenas são significativos para concentrações elevadas dos eletrólitos. Os termos α e b são constantes do modelo e valem 1,2 e 2,0 (kg/mol)^{1/2}, respectivamente. A_ϕ é o termo de Debye-Hückel, que depende de N_A , o número de Avogadro, ρ_s , a densidade do solvente, e , a carga elétrica de um elétron, ϵ_0 , a

permissividade no vácuo, D , a constante dielétrica do meio e k_B , a constante de Boltzmann. Os termos $\beta_{i,j}^0$ e $\beta_{i,j}^1$ são parâmetros de interação binários e $\Lambda_{i,j,k}$ é um parâmetro de interação ternário, ajustáveis aos dados experimentais. Os parâmetros são simétricos, ou seja, $\beta_{i,j} = \beta_{j,i}$ e $\Lambda_{i,j,k} = \Lambda_{j,i,k} = \dots = \Lambda_{k,j,i}$. Os parâmetros de interação binários e ternários podem ser obtidos pelo ajuste a dados experimentais de coeficientes osmóticos, de medidas de potenciais em células eletroquímicas, (Pitzer e Mayorga, 1973; Pitzer e Peiper, 1980; Peiper e Pitzer, 1982), dados de equilíbrio de fases (Edwards *et al.*, 1978; Göppert e Maurer, 1988; Rumpf e Maurer, 1993; Kurz *et al.*, 1995) ou de espectroscopia de infravermelho (Lichtfers, 2000; Lichtfers e Rumpf, 2000).

Aplicando-se a definição dada pela equação 4.15 à expressão 4.31, chega-se ao coeficiente de atividade γ_i do modelo de Pitzer (1973):

$$\begin{aligned} \ln \gamma_i &= \frac{1}{RT} \left(\frac{\partial G^{EX}}{\partial n_i} \right) = -A_\phi z_i^2 \left[\frac{\sqrt{I}}{1+b\sqrt{I}} + \frac{2}{b} \ln(1+b\sqrt{I}) \right] \\ &+ 2 \sum_j m_j \left[\beta_{i,j}^0 + \beta_{i,j}^1 \frac{2}{\alpha^2 I} \left[1 - (1+\alpha\sqrt{I}) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \right] \\ &- \frac{z_i^2}{\alpha^2 I^2} \left[1 - \left(1 + \alpha\sqrt{I} + \frac{\alpha^2 I}{2} \right) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \left[\sum_j \sum_k m_j m_k \beta_{j,k}^1 + 3 \sum_j \sum_k m_j m_k \Lambda_{i,j,k} \right] \end{aligned} \quad (4.35)$$

A atividade do solvente é obtida pela equação de Gibbs-Duhem:

$$\begin{aligned} \ln a_w &= M_w \left[2A_\phi \frac{I\sqrt{I}}{1+b\sqrt{I}} - \sum_{i \neq w} \sum_{j \neq w} m_i m_j \left[\beta_{i,j}^0 + \beta_{i,j}^1 \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \right. \\ &\quad \left. - 2 \sum_{i \neq w} \sum_{j \neq w} \sum_{k \neq w} m_i m_j m_k \Lambda_{i,j,k} - \sum_{i \neq w} m_i \right] \end{aligned} \quad (4.36)$$

O balanço de massa de carbono também deve ser obedecido, levando-se em consideração que o íon bicarbonato (HCO_3^-) provêm de duas fontes, da dissociação do dióxido de carbono e do bicarbonato de sódio:

$$m_{\text{CO}_2}^T = m_{\text{CO}_2} + m_{\text{HCO}_3^-} + m_{\text{CO}_3^{2-}} \quad (4.37)$$

A condição de eletroneutralidade impõe a restrição de igualdade do número de cargas positivas e negativas em solução:

$$\sum z_+ m_+ = \sum z_- m_- \quad (4.38)$$

em que z_+ , m_+ , z_- e m_- representam a carga e a molalidade dos íons positivos e negativos, respectivamente. Segundo Edwards *et al.* (1978), o modelo é válido entre as temperaturas de 0 e 170°C para valores de força iônica de até 6 molal, que correspondem a concentrações totais entre 10 e 20 molal para eletrólitos fracos.

As equações do modelo devem ser aplicadas ao sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$ para a determinação da composição da fase líquida e do pH da solução. A determinação do equilíbrio termodinâmico requer a resolução simultânea das equações do equilíbrio de fases e do equilíbrio químico para cada uma dos componentes presentes no sistema e envolve cálculos iterativos. Por este motivo, foi desenvolvido um algoritmo computacional para a sua execução. O esquema deste algoritmo está ilustrado na Figura 4.2. O algoritmo, escrito em linguagem FORTRAN, foi direcionado para o cálculo da composição da fase líquida e do pH de equilíbrio, dadas as condições de temperatura, pressão e concentração de bicarbonato de sódio.

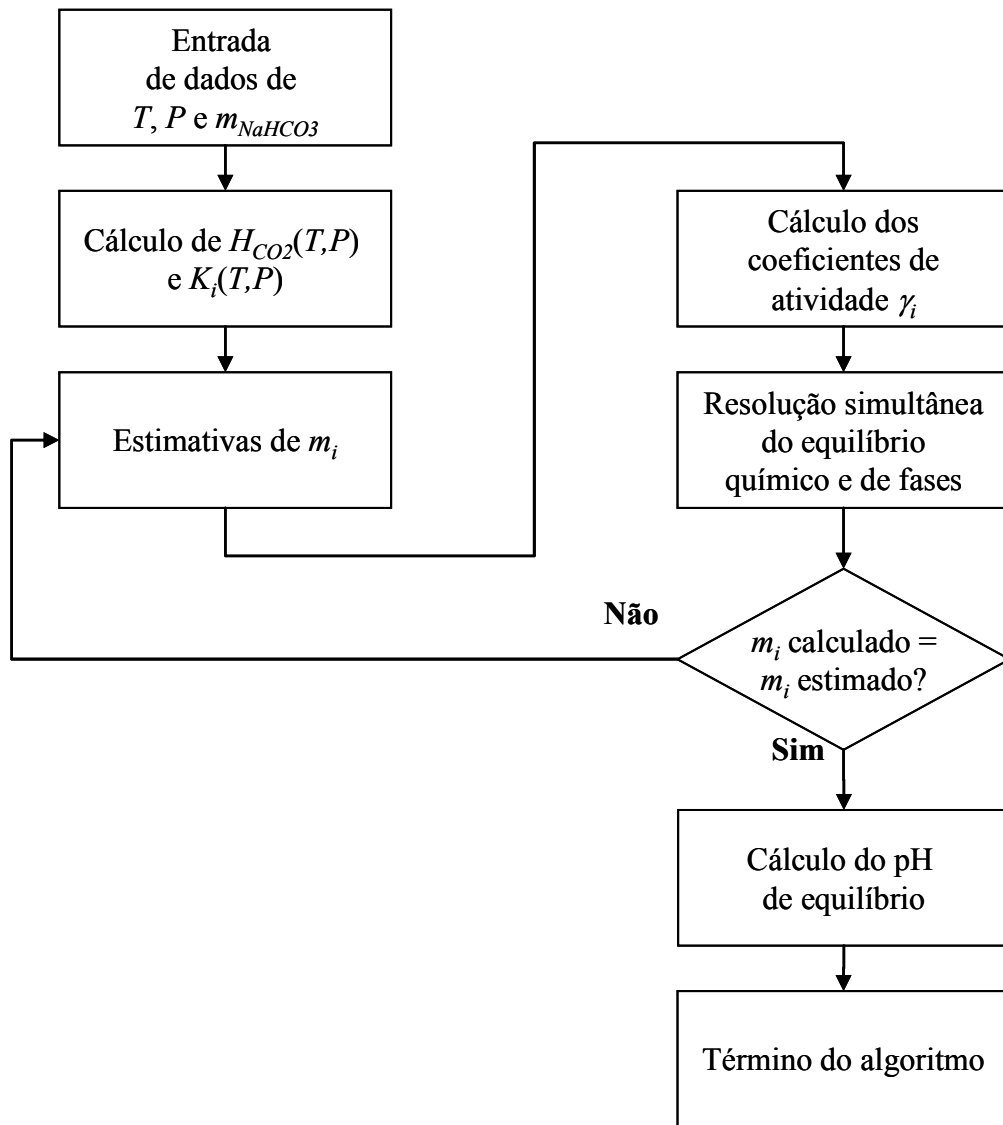


Figura 4.2 – Algoritmo para o cálculo das composições e do pH de equilíbrio na fase líquida do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$.

4.3. Modelagem do equilíbrio do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3/\text{insulina suína}$

4.3.1 Cálculo da solubilidade da proteína

Com a inclusão da proteína ao sistema de eletrólitos descrito anteriormente, torna-se necessário também acrescentar as equações que descrevem o seu comportamento para a resolução das condições e restrições adicionais de equilíbrio que se estabelecem. A proteína em solução em concentrações superiores à condição de saturação está sujeita à formação de uma fase sólida pelo processo de precipitação. Estabelece-se então um equilíbrio de fases sólido-líquido entre a proteína em solução e o seu precipitado. Este novo sistema constituído de proteína, neste caso a insulina suína, e eletrólitos em equilíbrio sólido-líquido-vapor é representado pela Figura 4.3.

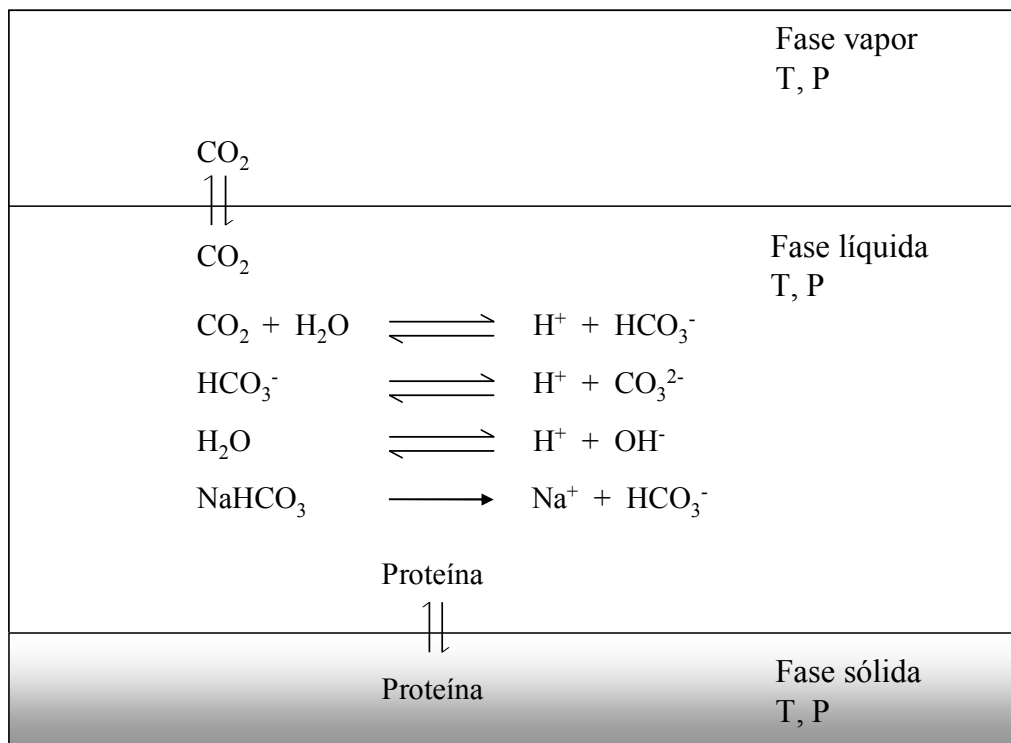


Figura 4.3 - Representação dos equilíbrios sólido-líquido-vapor e dos equilíbrios químicos do sistema composto por $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3/\text{proteína}$.

As mesmas condições de equilíbrio dadas pelas equações 4.1 a 4.3 se aplicam a este sistema, porém, com a formação de uma fase sólida, apresenta-se uma restrição. Em qualquer solução saturada em equilíbrio com uma fase sólida pura, cristalina ou não, o potencial químico do componente que esteja na fase sólida deverá ser necessariamente o mesmo em qualquer uma das fases (Edsall e Gutfreund, 1983; Arakawa e Timasheff, 1985). Considerando-se a fase sólida composta de proteína pura, a uma dada pressão e temperatura, o potencial químico da proteína em qualquer uma das fases deverá permanecer constante. A atividade também deverá permanecer a mesma, se todas as medidas forem tomadas em relação ao mesmo estado de referência do soluto (Edsall e Gutfreund, 1983). Aplicando-se esta condição ao equilíbrio sólido-líquido da proteína, determinando-se a atividade em apenas uma das fases, obtém-se a condição de equilíbrio da proteína no sistema em questão.

Proteínas são moléculas grandes, compostas de aminoácidos ligados em cadeias lineares por ligações peptídicas. Parte destes aminoácidos possui grupos laterais ionizáveis, o que faz com que a proteína em solução possua carga elétrica. Considerando-se que a proteína se comporta como um eletrólito em solução, o seu coeficiente de atividade pode ser estimado por um modelo de eletrólitos. Para se calcular a atividade da proteína na fase líquida, aplica-se a definição dada pela equação 4.24, ou seja, a atividade da proteína é igual ao produto de sua concentração pelo seu coeficiente de atividade. Porém, a inclusão da proteína a um modelo de eletrólitos como o de Pitzer (1973) requer algumas considerações especiais. Diferentemente dos eletrólitos convencionais, cujos íons possuem carga constante em solução, a proteína possui carga variável devido aos diferentes graus de ionização de seus grupamentos laterais, que podem carregar carga positiva ou negativa, dependendo de seu caráter ácido ou básico. O grau de dissociação desses ácidos e bases fracos é fortemente dependente da concentração de íons H^+ em solução e pode ser relacionado ao pH do meio pela equação de Henderson-Hasselbalch (Stryer, 1995; ver Apêndice C). Aplicando-se esta equação a todos os resíduos ionizáveis e somando-se a contribuição de carga de todos eles, chega-se à carga da proteína para um determinado valor de pH (Kamei *et al.*, 2002). Desse modo, a equação 4.35 pode ser aplicada ao cálculo do coeficiente de atividade e da atividade da insulina suína. Desconsiderando-se o termo de

interação ternário devido às baixas concentrações de proteína e de eletrólitos no sistema em estudo, o logaritmo natural da atividade da proteína (P) é expresso por:

$$\ln a_p = \ln m_p \gamma_p = \ln m_p + \ln \gamma_p = \ln m_p + \frac{1}{RT} \left(\frac{\partial G^{EX}}{\partial n_p} \right) \quad (4.39a)$$

$$\begin{aligned} \ln a_p = & \ln m_p - A_\phi z_p^2 \left[\frac{\sqrt{I}}{1+b\sqrt{I}} + \frac{2}{b} \ln(1+b\sqrt{I}) \right] \\ & + 2 \sum_j m_j \left[\beta_{P,j}^0 + \beta_{P,j}^1 \frac{2}{\alpha^2 I} \left[1 - (1 + \alpha\sqrt{I}) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \right] \\ & - \frac{z_p^2}{\alpha^2 I^2} \left[1 - \left(1 + \alpha\sqrt{I} + \frac{\alpha^2 I}{2} \right) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \sum_j \sum_k m_j m_k \beta_{j,k}^1 \end{aligned} \quad (4.39b)$$

Parte-se do pressuposto de que a atividade da proteína deverá permanecer constante enquanto existir o equilíbrio sólido-líquido. Todavia, apenas a equação 4.39b não é suficiente para a determinação do equilíbrio de fases da proteína. Afinal, a atividade permanecerá constante, mas poderá assumir infinitos valores gerando infinitas soluções, pois não se conhece o seu valor. A atividade da fase líquida poderia ser comparada com a atividade da fase sólida, o que requereria a definição de estados de referência para ambas as fases. Se para a proteína em fase sólida for utilizado um estado de referência na fase líquida, será necessário calcular todo o caminho do sólido até a referência – algo que não é possível fazer neste caso, pois a proteína pura não existe no estado líquido. Além disso, é muito difícil obter o potencial químico da proteína na fase sólida (Arakawa e Timasheff, 1985). Contudo, a atividade da proteína em solução a uma determinada condição x de temperatura e pressão, T_x e P_x , pode ser comparada com a atividade em solução a uma condição y , T_y e P_y . Havendo o equilíbrio sólido-líquido em ambas as condições, as atividades deverão ser iguais. Esta abordagem permite, a partir de um ponto de referência x , obter as atividades da proteína em toda a região de equilíbrio sólido-líquido e,

consequentemente, calcular as solubilidades da proteína. Neste caso, obtêm-se as seguintes relações entre as atividades:

$$\ln a_P^y = \ln a_P^{ref} \quad (4.40)$$

$$\ln a_P^y - \ln a_P^{ref} = 0 \quad (4.41)$$

em que o índice sobrescrito *ref* representa a condição de referência. Tomando-se o valor experimental de solubilidade a uma determinada condição de *T* e *P* e considerando-se este valor como a referência para o cálculo da atividade da proteína, torna-se possível resolver o equilíbrio de fases para a proteína. Resolvendo-se a equação 4.41, pode-se obter a solubilidade da insulina suína em qualquer condição *y* em equilíbrio sólido-líquido. Porém, não se pode ignorar que a proteína está inserida no sistema de eletrólitos, ou seja, as equações obtidas para a proteína somam-se às equações já obtidas para o sistema de eletrólitos da seção anterior, devendo obedecer às mesmas condições e restrições definidas anteriormente.

É necessário então definir uma condição de referência para o cálculo da atividade da proteína para que a equação 4.41 possa ser resolvida. Pode-se definir o valor experimental de solubilidade da proteína em seu pI como o valor de referência, uma vez que com a carga global nula, a proteína em solução estará teoricamente mais próxima da condição de idealidade e consequentemente, o coeficiente de atividade estará mais próximo da unidade. Substituindo-se a equação 4.39b em 4.41, obtêm-se a seguinte expressão:

$$\begin{aligned} & \ln m_P - A_\phi z_P^2 \left[\frac{\sqrt{I}}{1 + b\sqrt{I}} + \frac{2}{b} \ln(1 + b\sqrt{I}) \right] \\ & + 2 \sum_j m_j \left[\beta_{P,j}^0 + \beta_{P,j}^1 \frac{2}{\alpha^2 I} \left[1 - (1 + \alpha\sqrt{I}) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \right] \\ & - \frac{z_P^2}{\alpha^2 I^2} \left[1 - \left(1 + \alpha\sqrt{I} + \frac{\alpha^2 I}{2} \right) \exp(-\alpha\sqrt{I}) \right] \sum_j \sum_k m_j m_k \beta_{j,k}^1 - \ln a_P^{ref} = 0 \end{aligned} \quad (4.42)$$

No entanto, observa-se que a solubilidade m_P não pode ser resolvida explicitamente, pois não é possível isolá-la na expressão resultante. É necessário então a utilização de um

método numérico de busca de raízes para a resolução da solubilidade. Optou-se por utilizar o método de Muller para a resolução da solubilidade da proteína, que é baseado no método da secante, mas utiliza interpolação quadrática entre três pontos ao invés da interpolação linear entre dois (Press *et al.*, 1986).

4.3.2 Ajuste dos parâmetros de interação binários

Para se determinar os parâmetros de interação binários $\beta_{i,j}^0$ e $\beta_{i,j}^1$ que resultam no menor valor médio de erro entre os dados experimentais de solubilidade da proteína e os valores calculados pelo modelo termodinâmico, é necessário recorrer a um ajuste dos dados por um método de regressão não-linear. Para isto, utiliza-se um algoritmo de minimização de erros, definindo-se a seguinte função objetivo:

$$F_{obj} = \frac{\sum_{k=1}^n \left| \frac{m_p^{k,exp} - m_p^{k,calc}}{m_p^{k,exp}} \right|}{n} \quad (4.43)$$

em que n é o número de valores experimentais, $m_p^{k,exp}$ é o valor experimental de solubilidade da proteína no ponto k , e $m_p^{k,calc}$ o valor calculado pelo modelo. Os parâmetros ótimos obtidos são aqueles que resultam em um valor mínimo de F_{obj} . Para a minimização da função objetivo, optou-se por utilizar o método de Rosembroke (Bazaraa *et al.*, 1993; Pessoa Filho, 1998). O valor da função objetivo é uma medida do erro médio para a regressão dos dados experimentais. O esquema do algoritmo, também escrito em linguagem FORTRAN, está ilustrado na Figura 4.4.

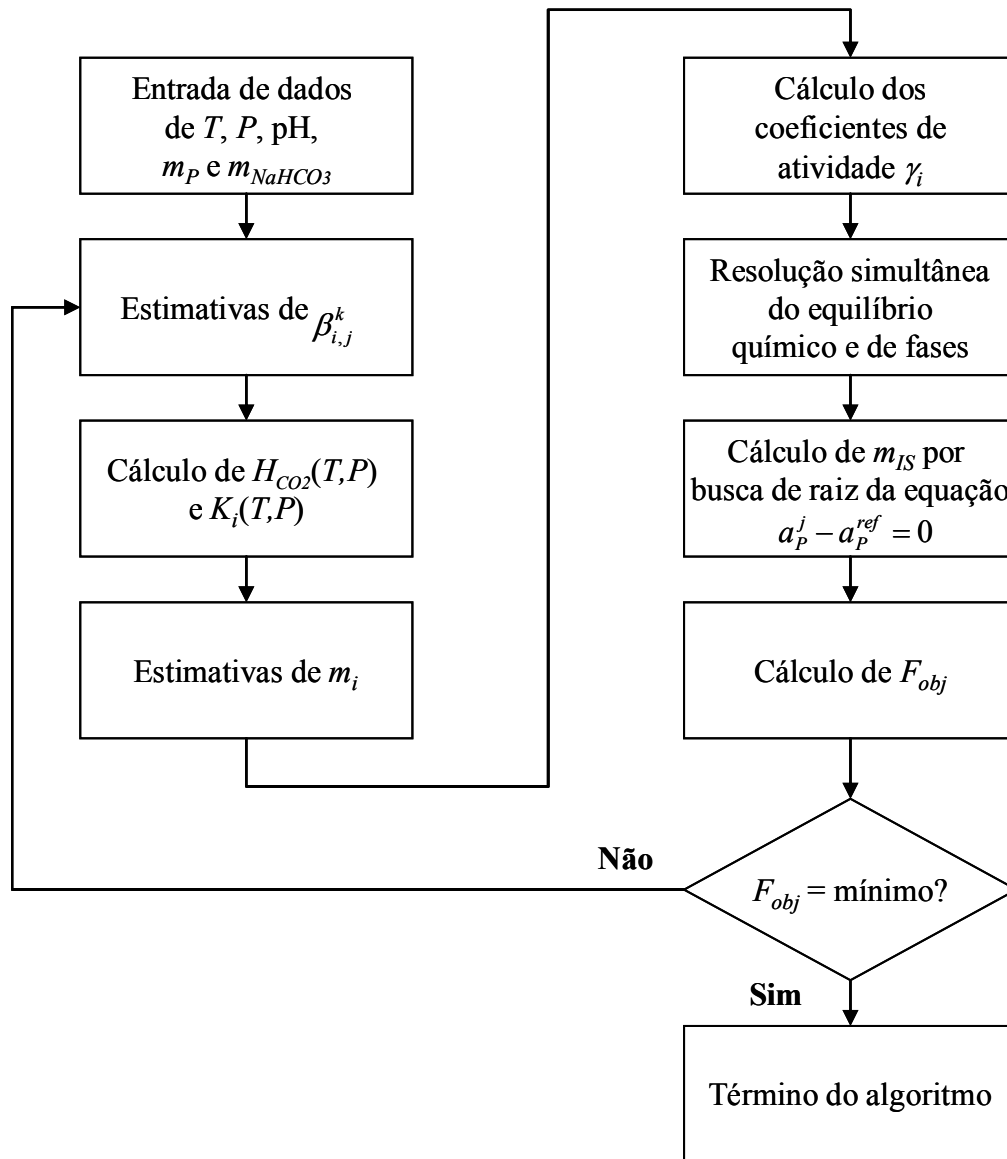


Figura 4.4 – Algoritmo para o cálculo do equilíbrio químico e de fases do sistema composto por $CO_2/H_2O/NaHCO_3/proteína$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO I – EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentados os resultados dos experimentos realizados neste trabalho. Inicia-se apresentando os resultados de cinética de precipitação da insulina suína com o CO₂ no item 5.1, em que são apresentados e discutidos os resultados dos ensaios de cinética de variação de pH das soluções de NaHCO₃ contendo insulina suína sob atmosfera de CO₂ e, a seguir, os resultados dos ensaios cinéticos de variação da concentração de insulina na fase sobrenadante em virtude do processo de precipitação. Estes ensaios serviram principalmente para a determinação dos tempos necessários para que o sistema entrasse em equilíbrio e para que as medidas de solubilidade pudessem ser realizadas. Em seguida, no item 5.2 são apresentados os resultados das medidas de pH de equilíbrio e de solubilidade da insulina suína em soluções de NaHCO₃ pressurizadas por CO₂ nas temperaturas de 5, 15 e 25°C e entre as pressões de 1 a 16 bar. Os resultados dos ensaios de atividade biológica das amostras de insulina suína precipitadas por CO₂ e por um ácido convencional, o H₃PO₄, são apresentados no item 5.3, onde também se faz uma comparação entre os dois processos de precipitação.

5.1. Estudos cinéticos da precipitação isoelétrica da insulina suína com o CO₂

Ao se colocarem duas fases em contato, há um processo de transferência de substâncias de uma fase a outra até que a composição de cada uma das fases atinja um valor constante. Quando este valor é atingido, considera-se que o sistema atingiu o equilíbrio (Prausnitz *et al.*, 1999). Em estudos experimentais de equilíbrio de fases, para se certificar que o sistema atingiu o equilíbrio, é necessário acompanhar a evolução do processo

transiente e determinar o tempo a partir do qual o processo de transferência se encerra, ou então que as mudanças sejam tão pequenas que possam ser desprezadas.

No sistema em estudo, composto por uma fase vapor contendo CO_2 e uma fase líquida aquosa contendo o bicarbonato de sódio e a insulina suína, a partir do momento em que as duas fases são postas em contato, inicia-se a transferência de CO_2 para a fase aquosa governada pela lei de Henry. A transferência da água da fase líquida para a fase vapor pode ser desprezada devido às baixas temperaturas utilizadas neste trabalho. Uma vez dissolvido em fase aquosa, as moléculas de CO_2 estão sujeitas à reação com as moléculas de água para formar o ácido carbônico, que por sua vez se dissocia em íons H^+ e HCO_3^- . Os íons H^+ em solução exercem uma forte influência sobre o processo de dissociação das cadeias ionizáveis da proteína e sobre a sua carga global. À medida que a concentração de íons H^+ no sistema aumenta, ocorre a acidificação da solução e diminuição do pH do meio, que se aproxima do ponto isoelétrico da proteína. A proteína passa então a ter as forças de repulsão eletrostática diminuídas e tendem a se agregar para formar uma nova fase sólida.

Então, é necessário determinar o momento em que o sistema atingiu o equilíbrio, o que inclui o equilíbrio de transferência de CO_2 da fase vapor para a fase líquida, o equilíbrio de dissociação do ácido carbônico e o equilíbrio de precipitação da fase sólida de insulina suína. Por este motivo, a cinética da precipitação isoelétrica da insulina suína com o CO_2 foi estudada.

5.1.1. Cinética de variação do pH da solução pela acidificação com o CO_2

Segundo Peiper e Pitzer (1982) e Hofland *et al.* (2003), no processo de acidificação de uma solução aquosa por CO_2 , a transferência de massa do CO_2 para a fase líquida e a formação de ácido carbônico são as etapas limitantes. Uma vez formado o ácido carbônico molecular, as etapas de dissociação são relativamente rápidas. Para se verificar a influência da agitação sobre o tempo de acidificação da solução e também se o pH de equilíbrio era afetado pelo caminho cinético do sistema, duas soluções de NaHCO_3 10 mM a 25°C contendo 0,62 e 0,61 mg/mL de insulina suína foram postas em contato com o CO_2 : a

primeira solução sem agitação e a segunda sob agitação de 480 rpm por um período de 72 h.

Observou-se inicialmente uma queda acentuada do pH das soluções logo que estas foram colocadas em contato com a atmosfera de CO₂, sendo que taxa de queda diminuiu à medida que o tempo de experimento avançava. As duas soluções atingiram valores próximos de pH de equilíbrio, porém, como era de se esperar, a solução sem agitação demorou mais tempo para atingir o equilíbrio (Figura 5.1). O pH de equilíbrio da solução sem agitação foi de 5,75, enquanto o da solução agitada foi de 5,71. Em ambos os casos foi verificada a precipitação da proteína.

Para se estimar os tempos necessários para que os valores de pH atingissem o equilíbrio, os perfis de queda de pH em função do tempo foram ajustados pela equação de decaimento exponencial de segunda ordem. Por este ajuste, verificou-se que os tempos necessários para que a variação do pH do sistema em função do tempo fosse menor do que 0,01 unidade para os experimentos realizados sem agitação e com agitação de foram de 25,4 h e 3,2 h, respectivamente. Observa-se assim uma influência significativa da agitação sobre o processo de transferência de massa do CO₂ da fase vapor para a fase líquida. Porém, em ambos os casos, o pH de equilíbrio atingiu patamares similares, de 5,75 e 5,71, respectivamente, o que indica que o nível de agitação não afeta a condição de equilíbrio de pH do sistema. Pode-se considerar que estes dois valores são estatisticamente iguais, uma vez que a precisão do sensor de pH é de $\pm 0,03$. Quando esta precisão é utilizada para a comparação dos valores medidos de pH de 5,75 e 5,71, verifica-se que estes se sobrepõem.

As concentrações de H⁺ em função do tempo foram obtidas através dos valores de pH, visto que este é calculado pelo $-\log a_{H^+}$, o que resulta na seguinte relação para a concentração do íon:

$$m_{H^+} = \frac{10^{-pH}}{\gamma_{H^+}} \quad (5.1)$$

O valor do coeficiente de atividade do íon H⁺ calculado pelo modelo de Pitzer (1973) para a força iônica de 0,01 (solução de NaHCO₃ 10 mM) é de 0,9 e o cálculo deste coeficiente permite a determinação das concentrações de H⁺ em função do tempo (Figura 5.2).

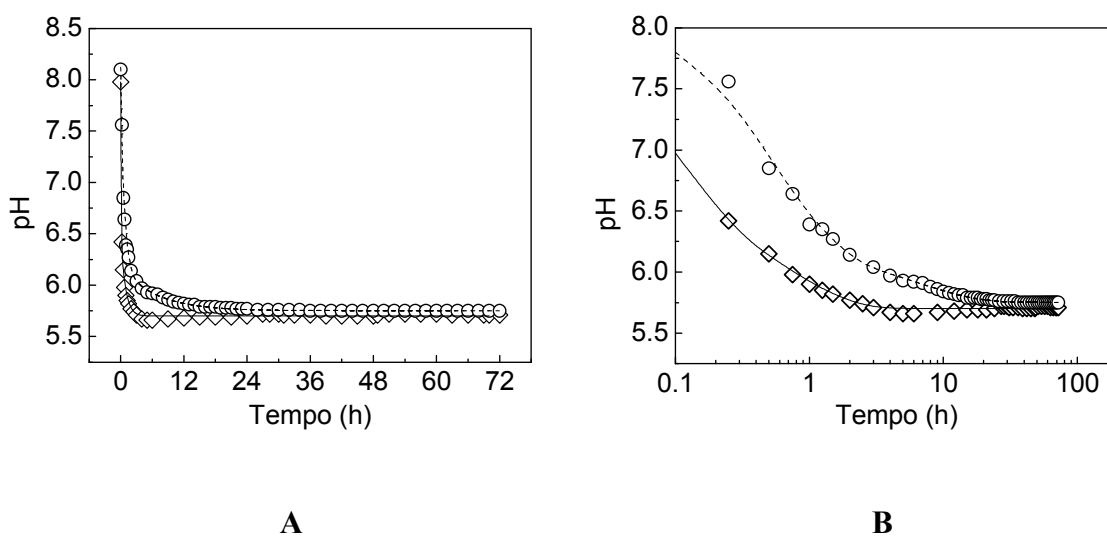


Figura 5.1 – Valor de pH em função do tempo da solução de NaHCO₃ 10 mM a 25°C sob CO₂ a 1 bar. (A) em escala linear; (B) em escala logarítmica: (○) dados experimentais e (---) valor ajustado da solução de 0,62 mg/mL de insulina suína sem agitação; (◇) dados experimentais e (—) valor ajustado solução de 0,61 mg/mL de insulina suína sob agitação de 480 rpm.

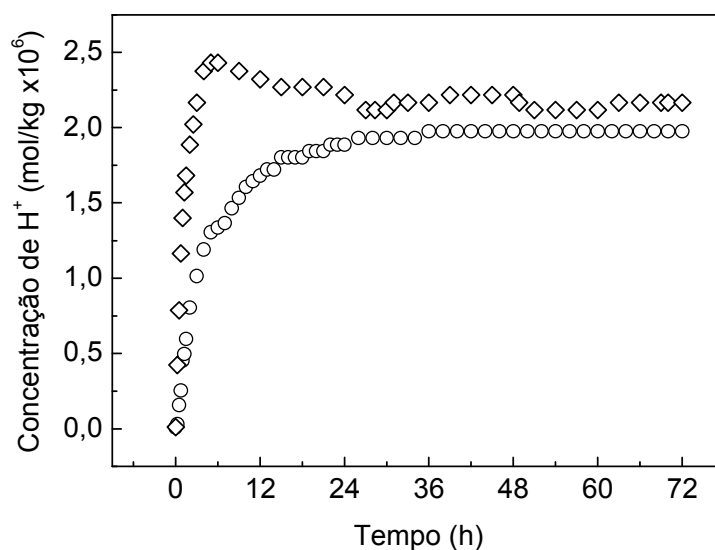


Figura 5.2 – Concentração de íons H⁺ em função do tempo na solução de NaHCO₃ 10 mM a 25°C sob CO₂ a 1 bar: (○) solução de 0,62 mg/mL de insulina suína sem agitação; (◇) solução de 0,61 mg/mL de insulina suína sob agitação de 480 rpm.

Os estudos cinéticos da variação de pH sob velocidade de agitação de 480 rpm foram estendidos para outros valores de pressão de CO₂ e resultados similares de perfil de pH em função do tempo em relação aos observados na Figura 5.1 foram obtidos. As pressões de CO₂ utilizadas foram de 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 9,0 e 16,0 bar a temperatura de 25°C. Os valores de pH medidos experimentalmente foram também ajustados às funções de decaimento exponencial de segunda ordem (Apêndice E). Os ajustes apresentaram excelentes resultados, demonstrando que esta função é adequada para representar o comportamento cinético de variação de pH devido ao aumento da concentração de CO₂ em solução (alguns dos ensaios com os respectivos ajustes são ilustrados nas Figuras 5.3 a 5.4). Observam-se perfis similares de queda de pH para todas as pressões, porém, quanto maior a pressão, menor o pH final da solução devido a maior concentração de CO₂ em solução e ao maior efeito de acidificação pelo ácido carbônico.

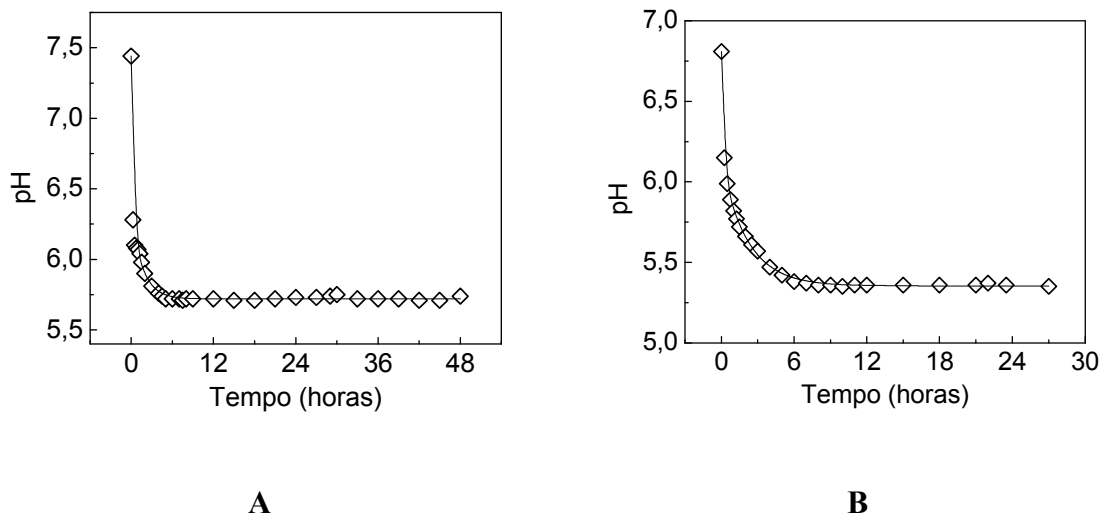


Figura 5.3 – Valores de pH em função do tempo das soluções de insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 25°C sob pressão de CO₂ e sob agitação de 480 rpm: (◇) dados experimentais; (—) ajuste pela função de decaimento exponencial de segunda ordem. (A) Pressão de CO₂ de 1,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,96 mg/mL; (B) pressão de CO₂ de 2,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,85 mg/mL.

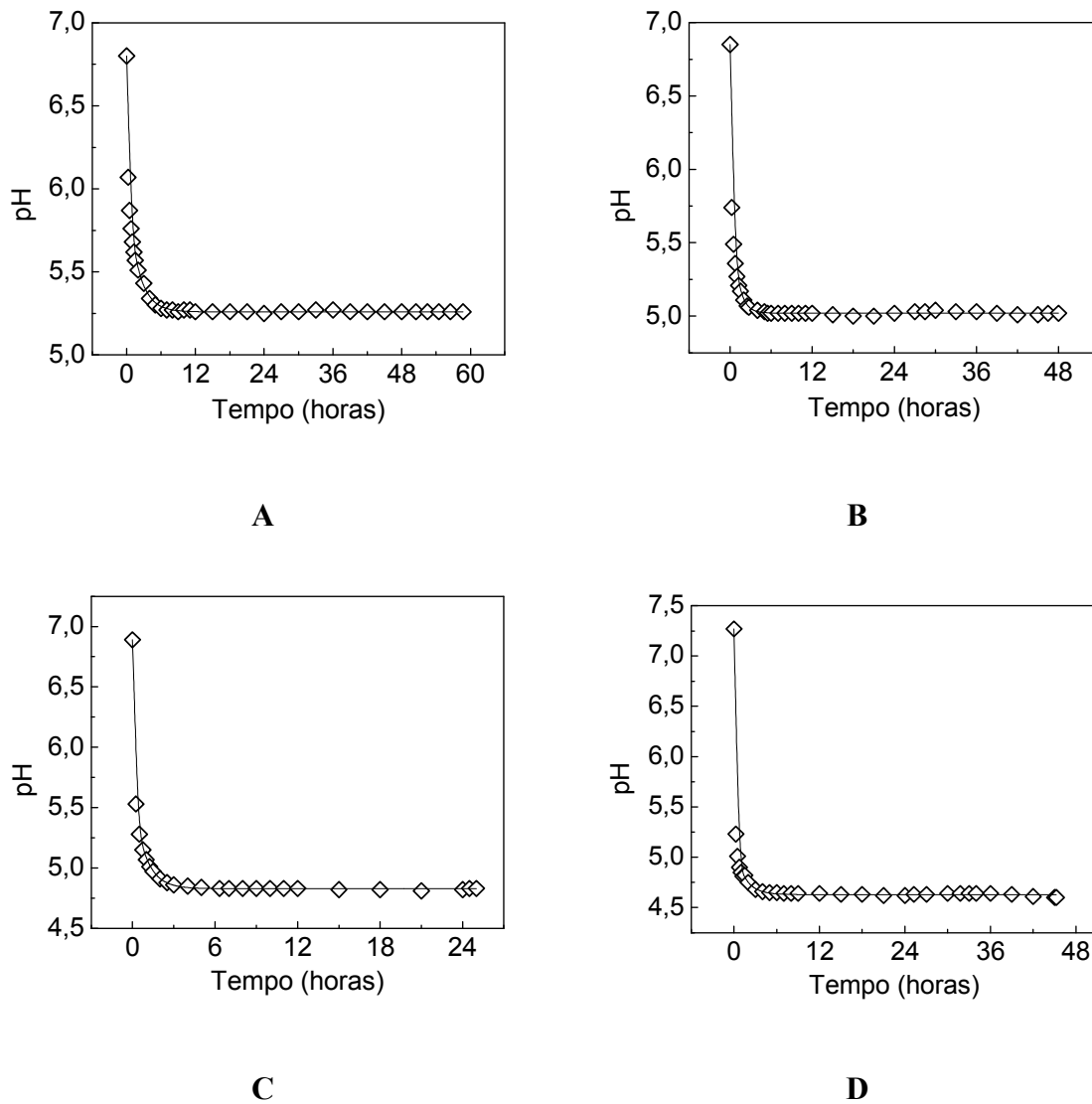


Figura 5.4 – Valores de pH em função do tempo das soluções de insulina suína em NaHCO_3 10 mM a 25°C sob pressão de CO_2 e sob agitação de 480 rpm: (\diamond) dados experimentais; (—) ajuste pela função de decaimento exponencial de segunda ordem. (A) Pressão de CO_2 de 3,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,94 mg/mL; (B) pressão de CO_2 de 5,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,87 mg/mL; (C) pressão de CO_2 de 9,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,79 mg/mL; (D) pressão de CO_2 de 16,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 1,27 mg/mL.

A estimativa de erro experimental das medidas de pH foi de $\pm 0,02$, menor do que a precisão do sensor, de $\pm 0,03$. Este erro é pouco significativo e não é mostrado nos gráficos. O tempo médio para que a variação de pH das soluções fosse menor do que 0,01 foi de 5,5 horas, com desvio padrão de $\pm 2,2$ horas.

5.1.2. Cinética de precipitação de insulina suína pelo CO₂

A cinética de precipitação da insulina suína pelo CO₂ foi estudada através das medidas de concentração da proteína na fase sobrenadante. A diminuição da concentração da insulina na fase sobrenadante indicava que a proteína estava saindo de solução e formando uma nova fase pelo fenômeno de precipitação. Este fenômeno também podia ser verificado pela observação da turvação da solução no interior da unidade de precipitação, através das janelas de quartzo (E-01 e E-02, Figura 3.4). As cinéticas de precipitação foram estudadas juntamente com as cinéticas de variação de pH devido à acidificação pelo CO₂, tendo sido utilizados os mesmos experimentos para ambos os casos. Então, a cinética de precipitação da insulina suína foi avaliada sob pressões de CO₂ de 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 9,0 e 16,0 bar em soluções de NaHCO₃ 10 mM a 25°C sob velocidades de agitação de 480 rpm.

Os valores medidos de concentração de insulina suína em função do tempo foram ajustados por funções de decaimento exponencial de primeira ordem, que também apresentaram excelentes resultados (Figuras 5.5 e 5.6; Apêndice E). Verificou-se a queda de concentração em relação aos valores iniciais em todos os experimentos, indicando o fenômeno de precipitação. No experimento realizado a 3,0 bar, o pH final ficou bem próximo ao pI da insulina, alcançando o valor médio de 5,25. No entanto, observa-se que nos experimentos realizados a 5,0, 9,0 e 16,0 bar, nas primeiras horas de experimento também houve queda das concentrações de insulina e em seguida uma pequena elevação, até que as concentrações se estabilizaram em um patamar de equilíbrio. Isto ocorreu porque o valor de equilíbrio de pH para estas pressões está abaixo do pI da insulina. Durante o processo de acidificação, o pH cai e passa pelo pI, quando então a solubilidade da proteína passa pelo ponto de mínimo. À medida que o pH diminui para valores abaixo do pI, a proteína passa a adquirir carga global positiva e a solubilidade volta a se elevar. Os valores

médios de pH finais para estas pressões foram de 5,04, 4,83 e 4,63, respectivamente. O efeito foi mais pronunciado para a pressão de 16 bar, em que o pH final estava mais afastado do pI (Figuras 5.6D).

A estimativa de erro experimental das medidas de concentração de insulina foi de $\pm 0,028$. Este erro é mostrado nos gráficos por barras de erros juntamente com os valores medidos experimentalmente. O tempo médio para que a variação de concentração de insulina suína das soluções de NaHCO_3 sob pressão de CO_2 fosse menor do que 0,001 foi de 5,8 horas, com desvio padrão de $\pm 3,3$ horas.

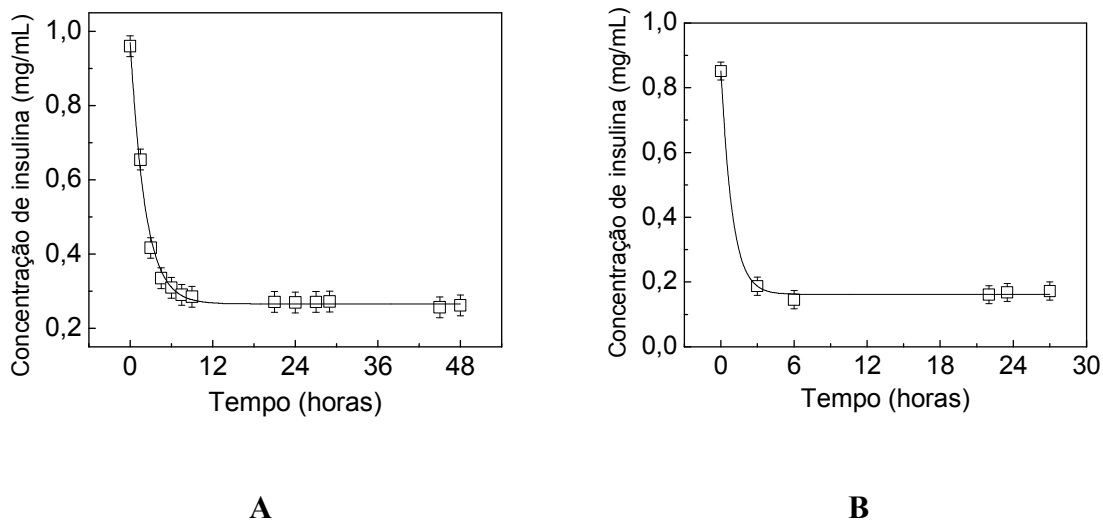


Figura 5.5 – Concentração de insulina suína em função do tempo em soluções de NaHCO_3 10 mM a 25°C sob pressão de CO_2 e sob agitação de 480 rpm: (\square) dados experimentais com barras de erro; (—) ajuste pela função de decaimento exponencial de primeira ordem. (A) Pressão de CO_2 de 1,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,96 mg/mL; (B) pressão de CO_2 de 2,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,85 mg/mL.

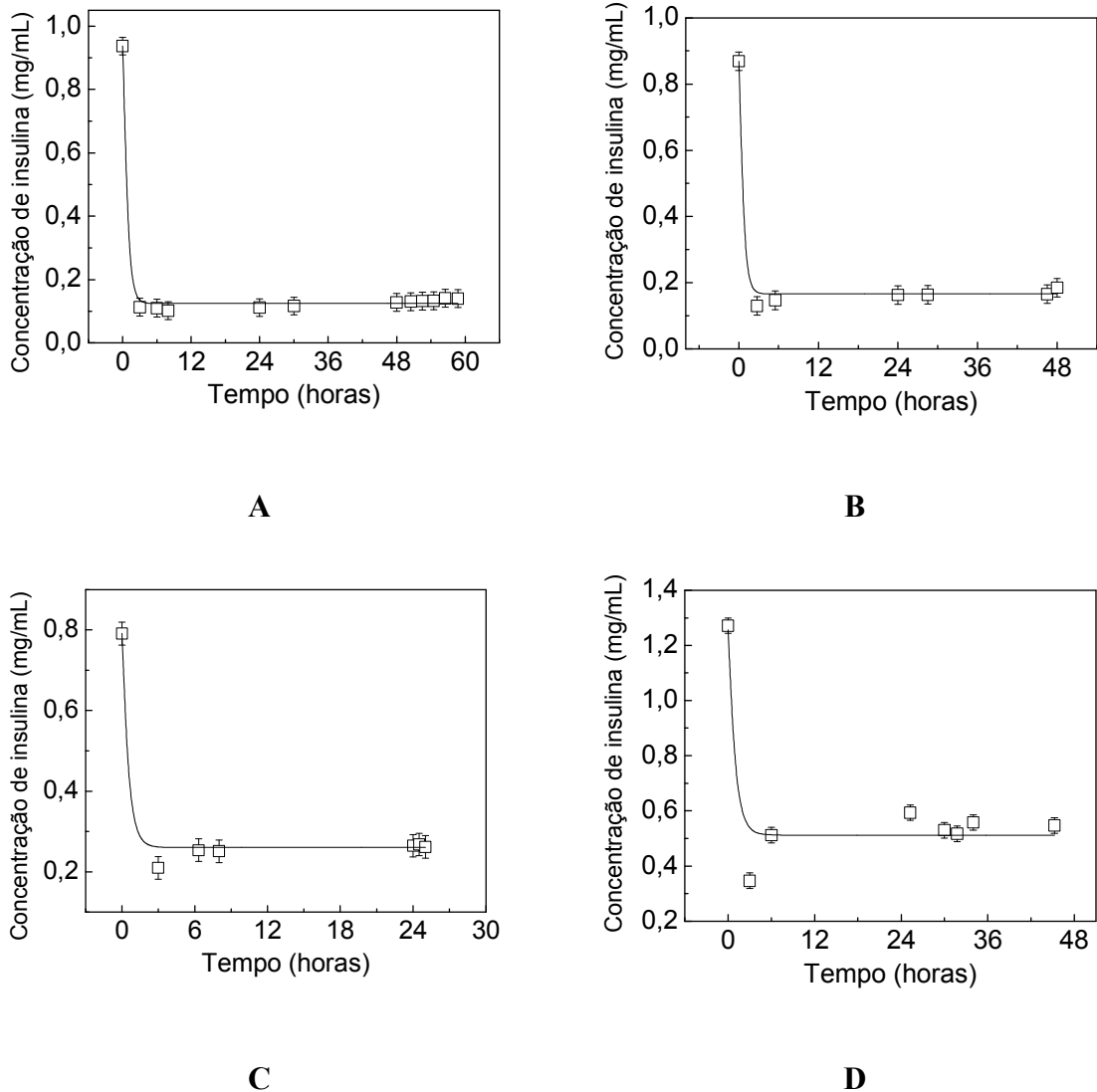


Figura 5.6 – Concentração de insulina suína em função do tempo em soluções de NaHCO_3 10 mM a 25°C sob pressão de CO_2 e sob agitação de 480 rpm: (\square) dados experimentais com barras de erro; (—) ajuste pela função de decaimento exponencial de primeira ordem. (A) Pressão de CO_2 de 3,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,94 mg/mL; (B) pressão de CO_2 de 5,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,87 mg/mL; (C) pressão de CO_2 de 9,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 0,79 mg/mL; (D) pressão de CO_2 de 16,0 bar e concentração inicial de insulina suína de 1,27 mg/mL.

5.1.3. Influência da concentração inicial de insulina

As concentrações iniciais de insulina suína em solução foram variadas para se investigar se as concentrações de equilíbrio eram independentes das quantidades totais de proteína do sistema, o que confirmaria que a proteína estabelece um equilíbrio sólido-líquido e descartaria a possibilidade de equilíbrio líquido-líquido, conforme relatado por Shih *et al.* (1992). Mantendo-se constantes as concentrações das soluções de NaHCO₃ em 10 mM, temperatura de 25°C e agitação de 480 rpm, variou-se a concentração inicial de insulina suína para se verificar o efeito desta variável sobre o pH e a concentração de equilíbrio após a precipitação. Assim, foram avaliados os experimentos de precipitação em diferentes níveis de concentração inicial de insulina suína nas pressões de CO₂ de 1,0, 2,0, 3,0 e 9,0 bar (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Valores de concentração inicial de insulina suína para os experimentos de precipitação por CO₂ em soluções de NaHCO₃ a 25°C sob agitação de 480 rpm.

| <i>P</i> (bar) | C_{IS}^i (mg/mL) |
|----------------|--------------------|
| 1,0 | 0,61 |
| 1,0 | 0,84 |
| 1,0 | 0,96 |
| 2,0 | 0,52 |
| 2,0 | 0,85 |
| 3,0 | 0,80 |
| 3,0 | 0,94 |
| 9,0 | 0,79 |
| 9,0 | 0,91 |

C_{IS}^i é a concentração inicial de insulina suína.

Os valores de pH de equilíbrio não evidenciaram dependência em relação às concentrações iniciais de insulina, o que pode ser um reflexo da baixa solubilidade e da baixa capacidade tamponante da molécula de insulina em solução (Figura 5.7; Apêndice E). Também não foi observada influência da concentração inicial de insulina sobre as concentrações de equilíbrio de insulina na fase sobrenadante, o que demonstra que o equilíbrio de fases estabelecido para a insulina suína neste sistema é sólido-líquido (Figura 5.8, Apêndice E).

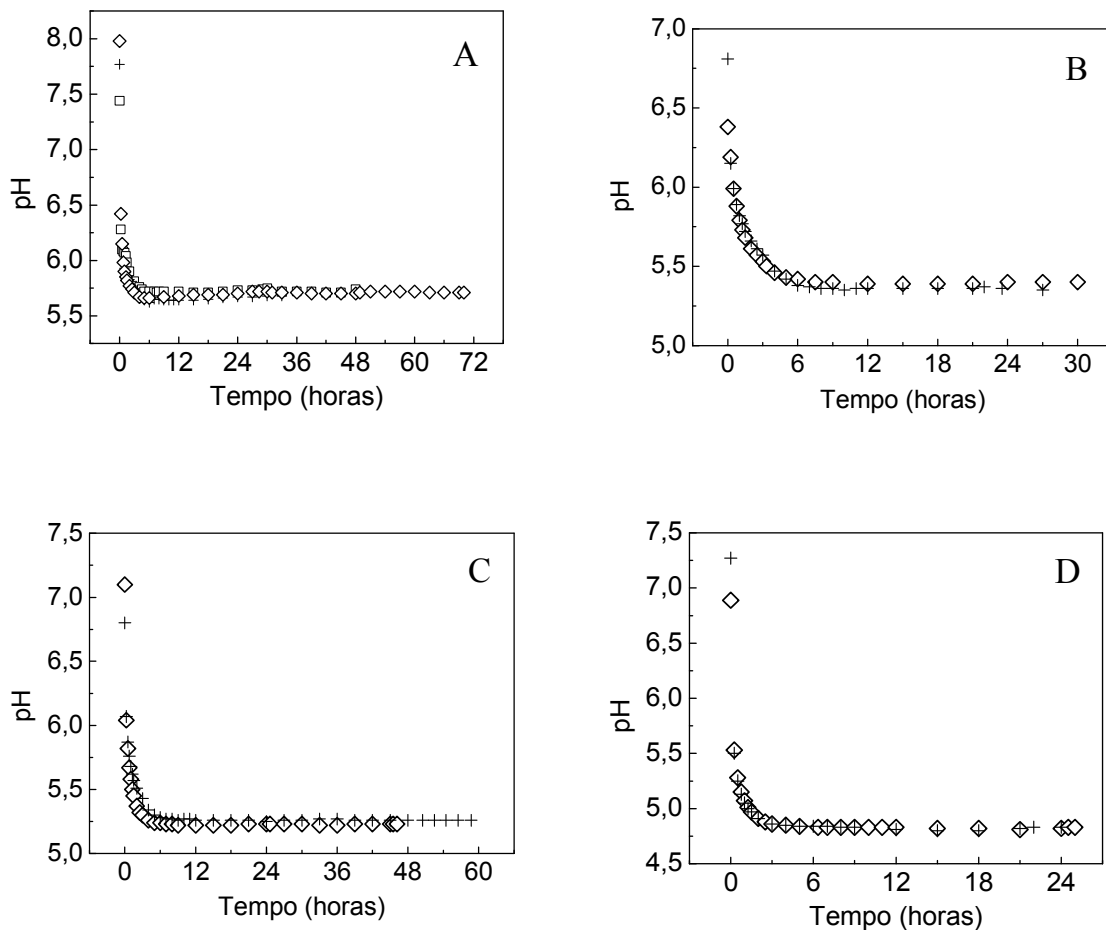


Figura 5.7 – Valores de pH das soluções de insulina suína em função do tempo em soluções de NaHCO_3 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm e sob variadas condições de pressão de CO_2 e concentrações iniciais de insulina suína. (A) 1 bar: (\diamond) 0,61 mg/mL; (+) 0,84 mg/mL; (\square) 0,96 mg/mL; (B) 2 bar: (\diamond) 0,52 mg/mL; (+) 0,85 mg/mL; (C) 3 bar: (\diamond) 0,78 mg/mL; (+) 0,94 mg/mL; (D) 9 bar e (\diamond) 0,79 mg/mL; (+) 0,81 mg/mL.

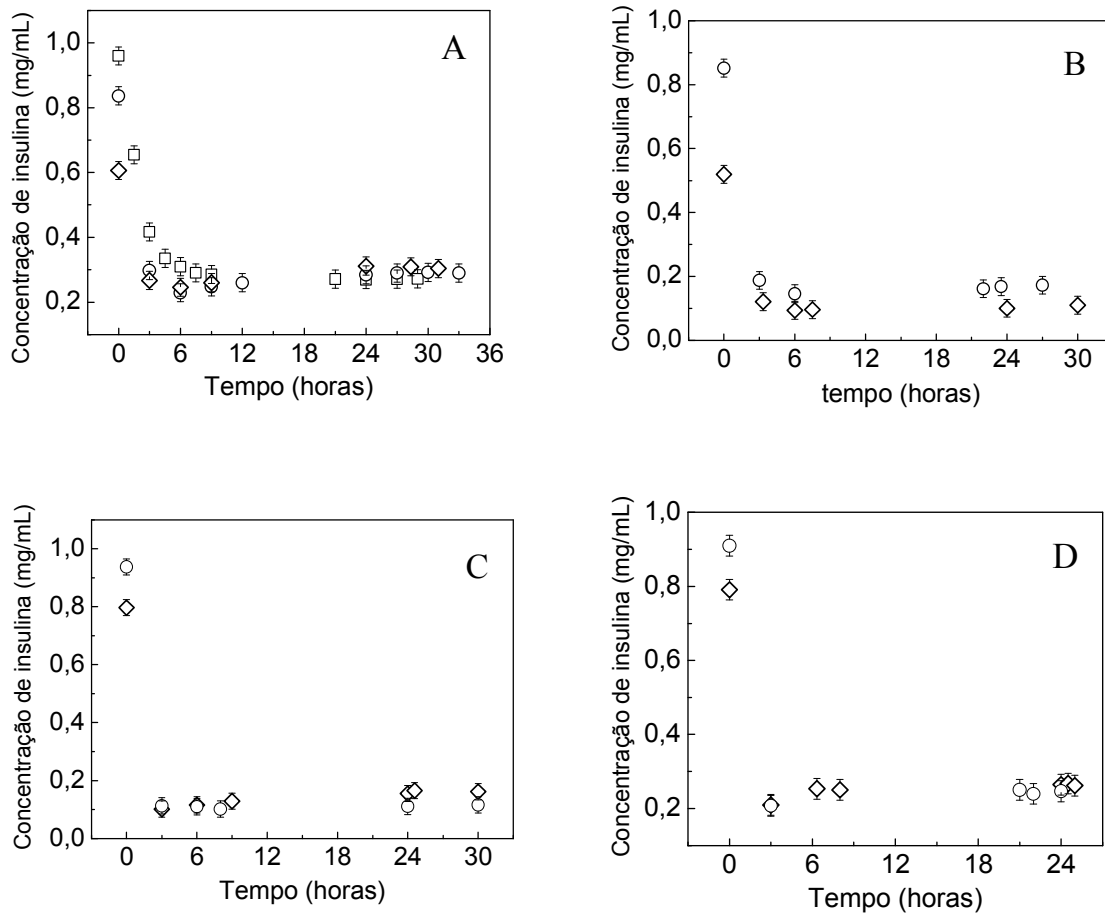


Figura 5.8 – Concentrações de insulina suína em função do tempo em soluções de NaHCO₃ 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm e sob variadas condições de pressão de CO₂ e concentrações iniciais de insulina suína. (A) 1 bar: (◇) 0,61 mg/mL; (○) 0,84 mg/mL; (□) 0,96 mg/mL; (B) 2 bar: (◇) 0,52 mg/mL; (○) 0,85 mg/mL; (C) 3 bar: (◇) 0,78 mg/mL; (○) 0,94 mg/mL; (D) 9 bar e (◇) 0,79 mg/mL; (○) 0,81 mg/mL.

5.2. Solubilidade da insulina suína na precipitação isoeletrica com o CO₂

A análise dos resultados dos experimentos de cinética permitiram verificar que o tempo de experimento superior a 6 horas sob agitação de 480 rpm seria suficiente para garantir que as condições de equilíbrio de pH e de precipitação de insulina suína com o CO₂ fossem alcançadas. Porém, para garantir a condição de equilíbrio e facilitar a padronização dos experimentos, todos os dados de solubilidade foram coletados após 24 h do início do experimento. Concluiu-se também que o equilíbrio estabelecido entre a insulina suína em solução e o precipitado é um equilíbrio sólido-líquido, pois variando-se as concentrações iniciais de insulina suína chegava-se sempre a patamares similares de solubilidade, cujas diferenças atribuem-se a erros experimentais. Caso o equilíbrio fosse líquido-líquido, o aumento da quantidade de insulina total no sistema provocaria mudanças nas composições de equilíbrio das fases líquidas, mudanças estas que poderiam ser detectadas pelas medições de concentração de proteína da fase sobrenadante (Shih *et al.*, 1992).

Os estudos de solubilidade da insulina em função da pressão de CO₂ foram realizados com as medidas de pH de equilíbrio e as solubilidades da insulina suína em soluções de NaHCO₃ 10 mM a 5, 15 e 25°C na faixa de pressão de 1 a 16 bar (Figura 5.9, Apêndice F). As estimativas de erro experimental das medidas de pH são listadas na Tabela 5.2. Os erros a 15 e a 25°C foram menores do que 0,03 e ficam ocultos pelos símbolos dos gráficos, então eles foram suprimidos. Foi verificado que os erros experimentais aumentaram com a diminuição da temperatura. Observou-se que, para uma mesma pressão, o pH das soluções a temperaturas menores foi também menor, o mesmo comportamento observado para as soluções contendo apenas os eletrólitos. A solubilidade do CO₂ na fase aquosa aumenta com a diminuição da temperatura, o que causa um maior efeito de acidificação e abaixamento do pH. Contudo, o efeito da temperatura não foi tão expressivo quanto o efeito da pressão. Verificou-se, para a faixa de pressões investigada, um forte efeito da pressão sobre o pH das soluções. Comparando-se as curvas de pH da solução de insulina suína em NaHCO₃ sob atmosfera de CO₂ com as curvas de pH da solução de NaHCO₃, observa-se um pequeno efeito da presença da proteína sobre os valores de pH. Para a temperatura de 5°C, os valores de pH das soluções com a proteína foram maiores do que os da solução de sal, para a temperatura de 15°C, foram menores e para a temperatura de 25°C, o pH da solução com a proteína ficou praticamente inalterado.

Tabela 5.2 – Estimativas de erro experimental das medidas de pH em soluções de insulina suína em NaHCO_3 sob pressão de CO_2 .

| Temperatura (°C) | Erro, s |
|------------------|---------|
| 5 | 0,08 |
| 15 | 0,03 |
| 25 | 0,02 |

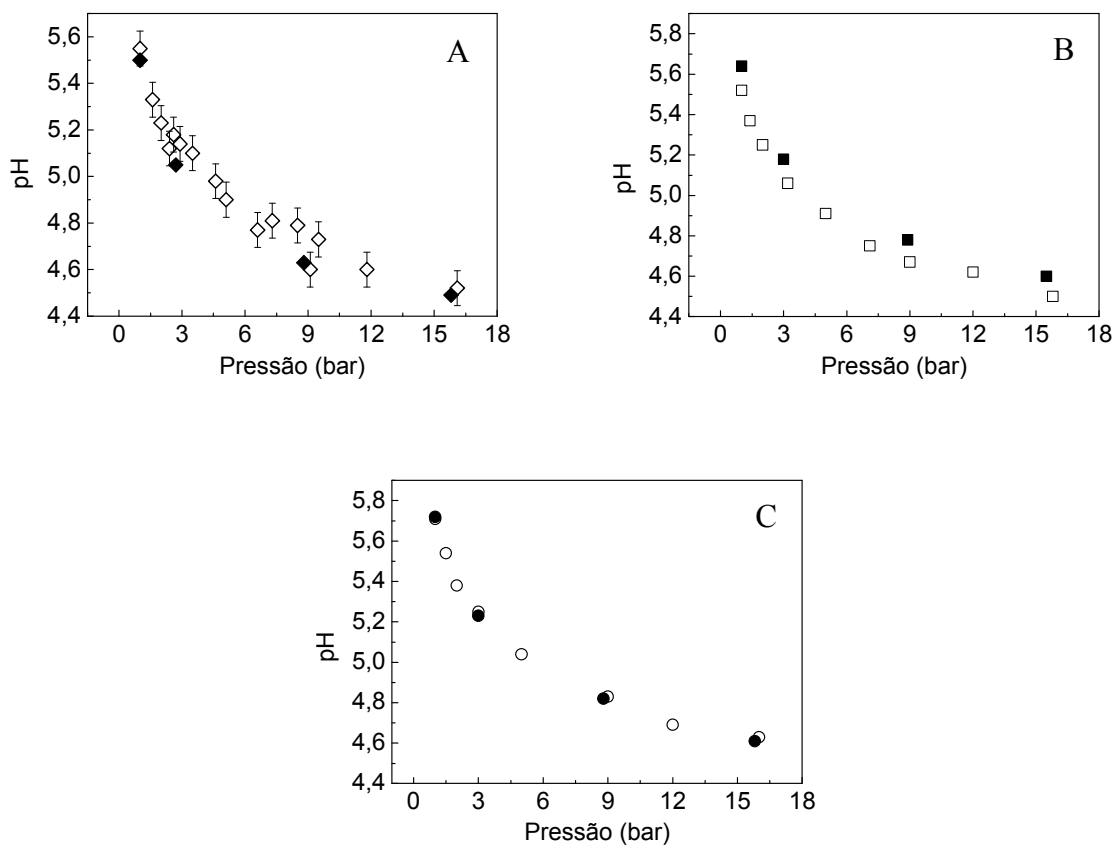


Figura 5.9 – Valores de pH das soluções em função da pressão de CO_2 . (A) temperatura de 5°C: (\diamond) soluções de insulina suína em NaHCO_3 10 mM; (\blacklozenge) solução de NaHCO_3 10 mM; (B) temperatura de 15°C: (\square) soluções de insulina suína em NaHCO_3 10 mM; (\blacksquare) solução de NaHCO_3 10 mM; (C) temperatura de 25°C: (\circ) soluções de insulina suína em NaHCO_3 10 mM; (\bullet) solução de NaHCO_3 10 mM.

Uma possível explicação para a diferença entre as medidas de pH em soluções com e sem a insulina é que os valores de pK_a dos grupos ionizáveis variam com a temperatura e estas variações têm um efeito sobre o pH da solução. A proteína em solução está sujeita a reações de ionização, liberando ou recebendo íons H^+ de acordo com o pH do meio e com os valores de pK_a das cadeias laterais ionizáveis dos aminoácidos. Conforme a cadeia lateral capture ou libere H^+ , o pH da solução terá maior ou menor valor quando comparada a uma solução sem a proteína. No entanto, as diferenças são pequenas, o que evidencia novamente a baixa capacidade tamponante da molécula de insulina.

Em relação à solubilidade da insulina suína em função da pressão de CO_2 e do pH, os seus valores foram determinados a 5, 15 e 25°C. As estimativas de erros experimentais de solubilidade são listadas na Tabela 5.3. Observou-se que os erros experimentais aumentaram com a diminuição da temperatura, de modo similar ao que foi observado com as medidas de pH. No caso das medidas de solubilidade, a diferença de temperatura das amostras coletadas no meio externo em relação à temperatura no interior da unidade de precipitação pode ser uma explicação para este comportamento. Na tentativa de minimizar os erros, foi feito o isolamento térmico da unidade de precipitação com camadas de isopor.

Tabela 5.3 – Estimativas de erro experimental das medidas de solubilidade de insulina suína em $NaHCO_3$ sob pressão de CO_2 .

| Temperatura (°C) | Erro (mg/mL) | Erro (mol/kg) |
|------------------|--------------|----------------------|
| 5 | 0,236 | $4,08 \cdot 10^{-5}$ |
| 15 | 0,102 | $1,77 \cdot 10^{-5}$ |
| 25 | 0,028 | $0,48 \cdot 10^{-5}$ |

Verificou-se o mínimo de solubilidade para as isotermas a 5, 15 e 25°C nas proximidades do pI, em torno do pH de 5,3, conforme esperado (Figuras 5.10 a 5.13, Apêndice F). Este efeito ficou mais evidente para a isoterma de 25°C, em que é possível observar mais claramente o aumento de solubilidade ao se afastarem os valores de pH das proximidades do pI. Nas isotermas a 5 e 15°C, no menor valor de pressão estudado, 1 bar, o pH já estava próximo ao pI, deixando menos evidente o efeito de maior solubilidade em

valores de pH acima do pI. No entanto, para os valores de pH abaixo do pI, houve significativo aumento de solubilidade para todas as isothermas investigadas. O efeito do pH é na verdade dependente do efeito da pressão de CO₂ no sistema, pois à medida em que a pressão aumenta, a presença do CO₂ em solução aumenta também, elevando a quantidade de íons H⁺ presentes em solução e abaixando o pH.

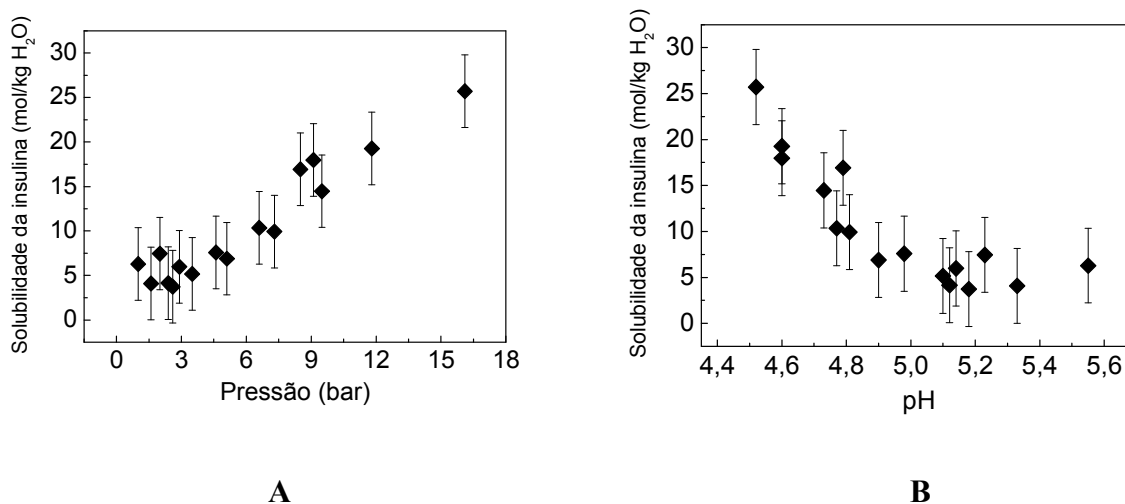


Figura 5.10 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 5°C: (A) solubilidade em função da pressão de CO₂; (B) solubilidade em função do pH de equilíbrio.

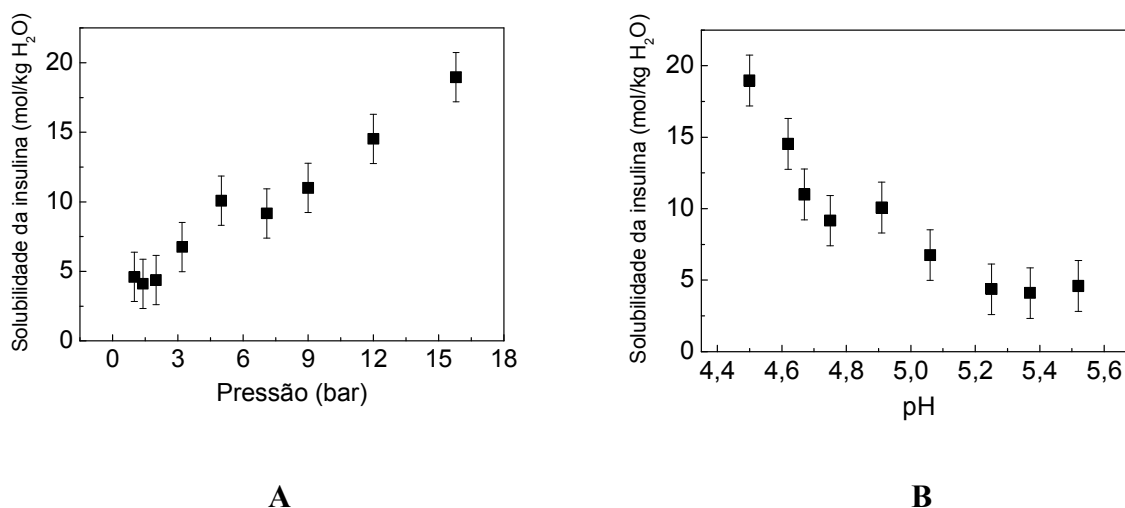


Figura 5.11 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 15°C: (A) solubilidade em função da pressão de CO₂; (B) solubilidade em função do pH de equilíbrio.

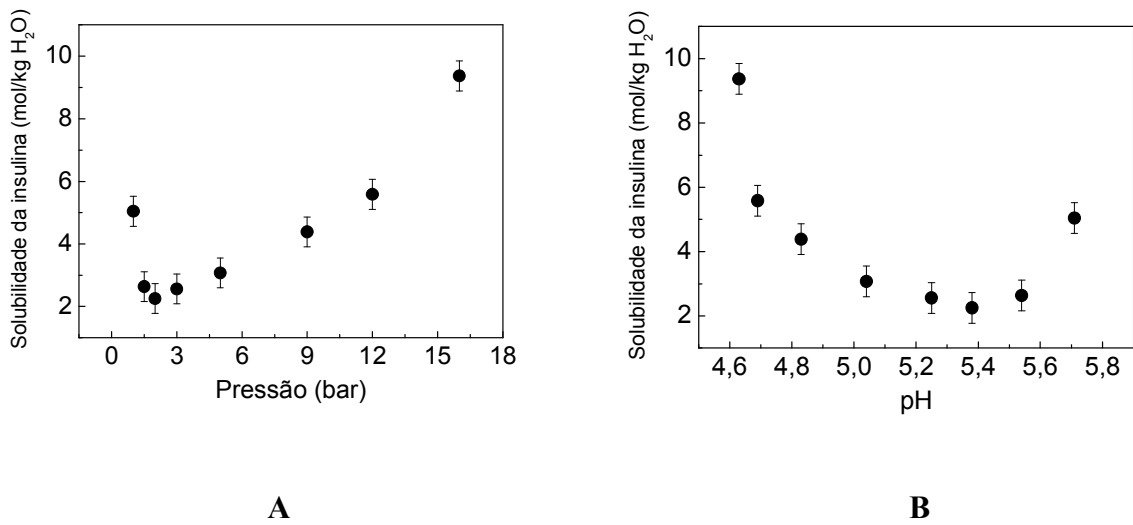


Figura 5.12 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 25°C: (A) solubilidade em função da pressão de CO₂; (B) solubilidade em função do pH de equilíbrio.

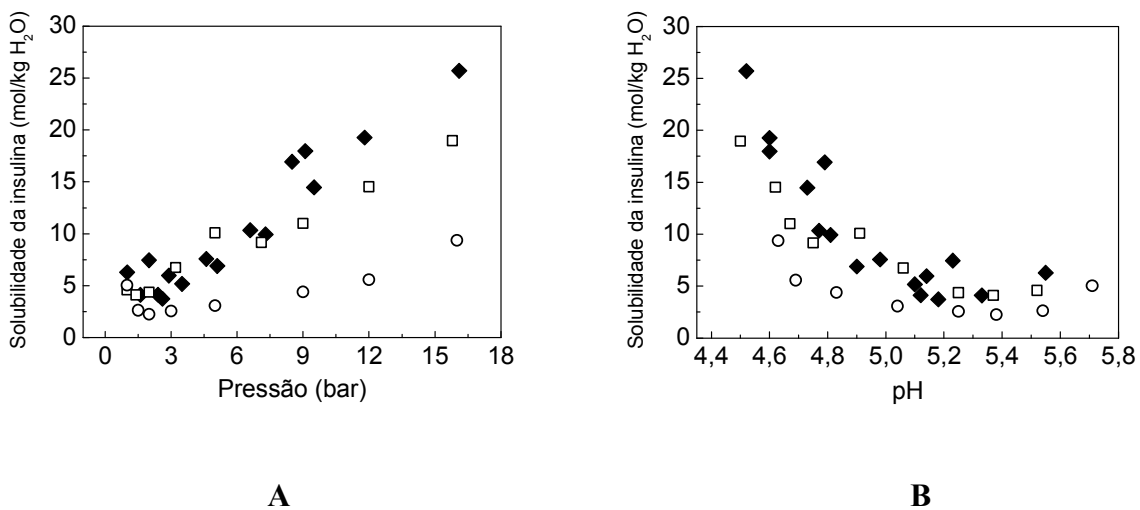


Figura 5.13 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a (♦) 5°C, (□) 15°C e (○) 25°C: (A) solubilidade em função da pressão de CO₂; (B) solubilidade em função do pH de equilíbrio.

Observou-se o comportamento retrógrado da solubilidade da insulina suína, ou seja, com o aumento da temperatura houve diminuição da solubilidade (Figura 5.13). Este comportamento já havia sido observado por Bernardo *et al.* (2004) para a insulina suína. Feeling-Taylor *et al.* (1999) também observaram solubilidade retrógrada para cristais de carbomoxi-hemoglobina C, e ajustando a entalpia de cristalização à equação de Van't Hoff para a análise termodinâmica da solubilidade, encontraram um valor positivo de entalpia de cristalização de 155 kJ/mol, o que resulta em solubilidade retrógrada. Esta análise foi aprofundada por Vekilov *et al.* (2002), que concluíram que a entalpia positiva significa cristalização endotérmica, ou seja, calor é consumido durante a cristalização. Os autores aplicaram a equação da variação da energia livre de Gibbs à cristalização, dividindo as contribuições da proteína e do solvente ao termo entrópico:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = \Delta H^0 - T(\Delta S_{proteína}^0 + \Delta S_{solvente}^0) \quad (5.2)$$

Para que o processo de cristalização seja termodinamicamente possível, o valor de ΔG^0 deve ser negativo, ou seja, $T\Delta S^0 > \Delta H^0$. A partir de dados de cristalografia, da carbomoxi-hemoglobina C, os autores sugeriram que a liberação de moléculas de água ligadas à proteína na formação do cristal forneceria um alto valor positivo de entropia ($\sim 600 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), permitindo o processo de cristalização. Aplicando-se uma análise similar ao processo de precipitação da insulina suína com o CO_2 , pode-se inferir que a entalpia da precipitação seja positiva, o que resultaria em precipitação endotérmica e, conseqüentemente, em solubilidade retrógrada. No entanto, com esta suposição, torna-se necessário que o valor de $T\Delta S^0$ para a insulina suína seja positivo e maior do que ΔH^0 para que a precipitação seja termodinamicamente possível. Sabe-se que a insulina em solução sofre reações de associação, nas quais são formados multímeros da unidade molecular (Fredericq, 1956; Jeffrey e Coates, 1966; Milthorpe *et al.* 1977; Helmerhorst e Stokes, 1987) e segundo Blundell *et al.* (1972), a agregação dos monômeros ocorre com a exclusão do solvente, que pode contribuir com o aumento do termo de entropia, favorecendo a agregação. Como os agregados de insulina formam a fase sólida, muito provavelmente composta de hexâmeros, esta exclusão do solvente, no caso, a água, poderia justificar o alto valor de entropia necessário para a cristalização.

Análises por microscopia óptica e eletrônica de varredura demonstraram que os precipitados de insulina suína obtidos nas condições experimentais avaliadas são amorfos (imagem típica ilustrada pela Figura 5.14), mas pode-se estender a análise termodinâmica para precipitados sólidos amorfos, o que validaria a análise feita em relação aos cristais.

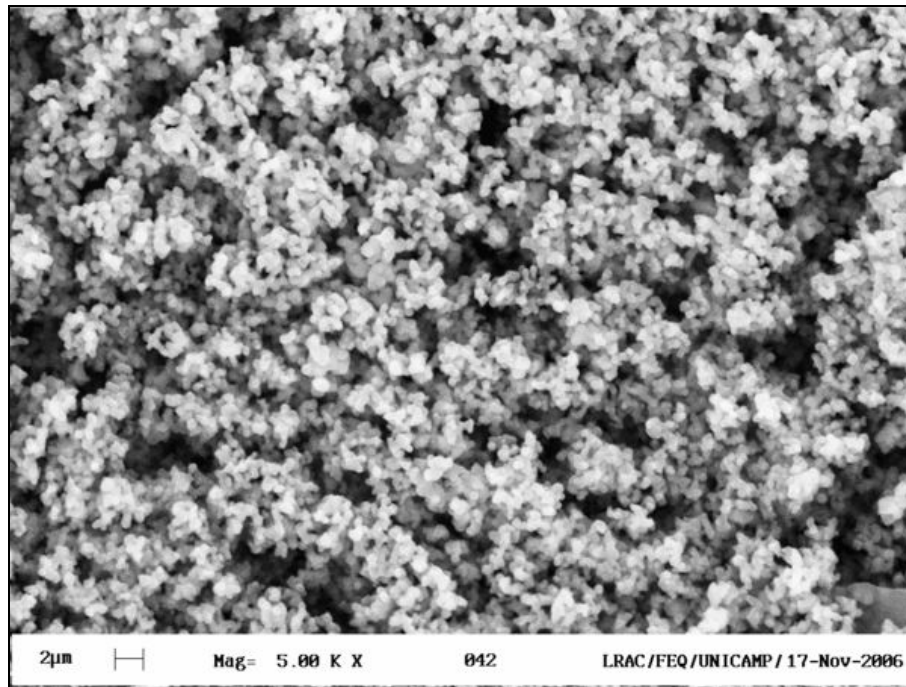


Figura 5.14 – Fotomicrografia dos precipitados de insulina suína obtidos a 5°C em NaHCO₃ 10 mM, 1,6 bar de CO₂ e pH de equilíbrio 5,37. Ampliação de 5.000 x por microscopia eletrônica de varredura.

5.3. Atividade biológica da insulina suína obtida por precipitação isoelétrica

O processamento de moléculas biológicas tem como desafio a recuperação destas com a manutenção da integridade molecular e atividade biológica, característica essencial de muitos bioprodutos. Em se tratando de proteínas, em muitos casos não basta apenas a preservação da estrutura molecular, ou seja, da estrutura primária da molécula. Frequentemente, a atividade biológica destas moléculas está associada às estruturas superiores, que são as estruturas secundária, terciária ou quaternária, que dependem não só da sequência de aminoácidos que as compõem, mas também da disposição espacial e de

interações intermoleculares que se formam entre os aminoácidos. Muitas vezes, a perda de estruturas superiores causa a desnaturação e perda de atividade biológica da molécula, podendo até mesmo inutilizá-la. Assim, o desenvolvimento de processos de precipitação isoelétrica com o dióxido de carbono deve, além de ser eficiente em termos de recuperação mássica da proteína, ser também eficiente na preservação da atividade biológica da molécula em questão. No caso da insulina, a principal atividade desta molécula é a manutenção dos níveis de glicemia no sangue (Doyle e Egan, 2003).

Visando-se avaliar o efeito de diferentes condições de precipitação com o CO₂ sobre a atividade biológica da insulina suína, foram realizados ensaios de precipitação em variadas condições experimentais. Os precipitados obtidos tiveram a atividade biológica medidas por ensaios de queda de glicemia em camundongos após a injeção de amostras de insulina. A partir destes ensaios, foi calculada a taxa de desaparecimento de glicose, K_{itt} . Estes resultados foram comparados com ensaios de atividade biológica de precipitados de insulina suína obtidos por um ácido convencional, o H₃PO₄.

5.3.1. Atividade biológica da insulina suína precipitada por CO₂

Com o intuito de avaliar o efeito da precipitação por CO₂ sobre a atividade biológica da insulina suína, foram realizados experimentos em variadas condições de pressão e concentração de NaHCO₃. Para que todas as amostras fossem precipitadas nas proximidades do pI, o modelo de Edwards *et al.* (1978) foi utilizado para se estimar a pressão a ser utilizada em cada concentração de NaHCO₃ (Figura 5.15). A Tabela 5.4 lista as amostras de insulina avaliadas e as condições experimentais em que elas foram obtidas. Observa-se pelos resultados de pH calculados pelo modelo, um expressivo efeito tamponante na solução devido ao aumento da concentração de NaHCO₃. Enquanto na solução de NaHCO₃ 10 mM é possível atingir o pI da insulina a pressão de CO₂ de 3 bar, em NaHCO₃ 50 mM, este valor só é alcançado a pressão de 16 bar. Em relação ao comportamento cinético, a queda de pH foi similar à obtida em experimentos anteriores (Figura 5.16), sendo que o processo de precipitação foi conduzido por um período de 24 h para cada amostra.

Tabela 5.4 – Condições experimentais de precipitação da insulina suína por CO₂ para realização de ensaios biológicos.

| Amostra | T (°C) | P (bar) | NaHCO ₃ | pH final |
|---------|----------|-----------|--------------------|----------|
| A | 25 | 3,0 | 10 mM | 5,26 |
| B | 25 | 6,0 | 20 mM | 5,22 |
| C | 25 | 16,0 | 50 mM | 5,31 |

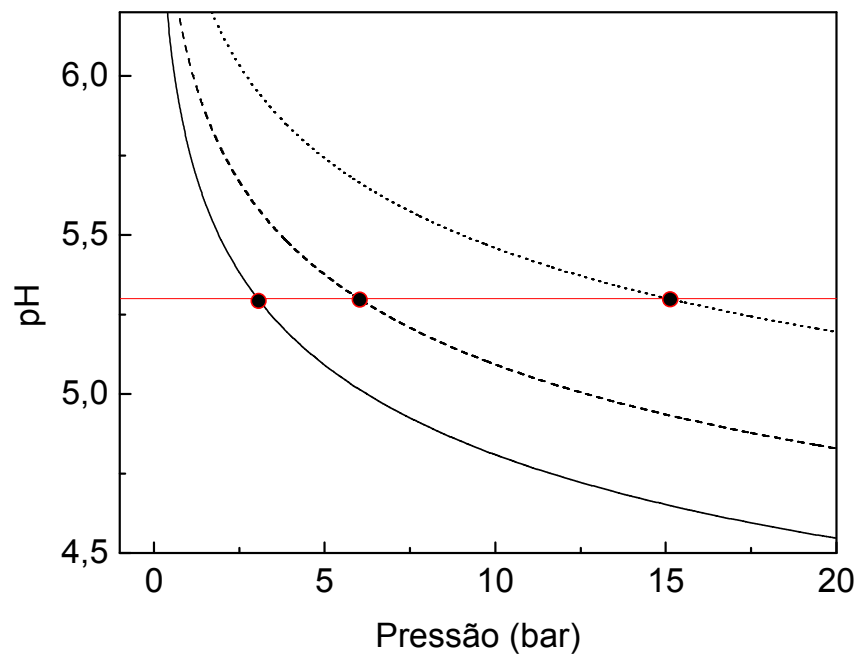


Figura 5.15 – Estimativas de pH em função da pressão para soluções de NaHCO₃ a 25°C nas concentrações: (—) 10 mM; (---) 20 mM; (···) 50 mM NaHCO₃. Os pontos de intersecção das curvas com a linha paralela ao eixo x indicam o pI da insulina suína.

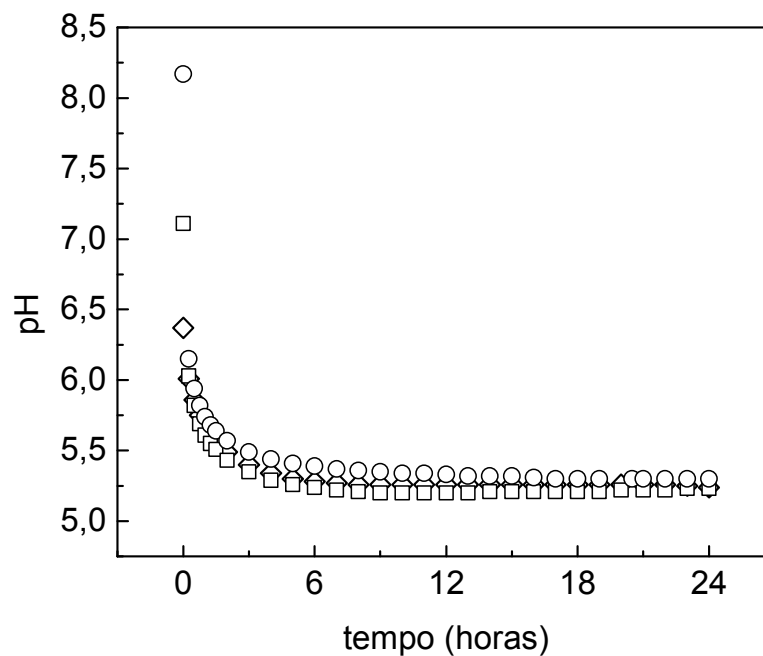


Figura 5.16 – Variação de pH em função do tempo das soluções de insulina suína a 25°C nas condições experimentais: (◇) NaHCO₃ 10 mM, 3 bar de CO₂; (□) NaHCO₃ 20 mM, 6 bar de CO₂; (○) NaHCO₃ 50 mM, 16 bar de CO₂.

Na Tabela 5.5 são listadas as médias e desvios padrões dos ensaios de glicemia. Observa-se que os desvios padrões entre as medidas realizadas em duplicatas são altos em alguns casos, resultado dos diferentes níveis iniciais de glicemia entre os camundongos e também pelo fato dos ensaios terem sido realizados apenas em duplicatas. Os desvios podem ser reduzidos aumentando-se o número de repetições do ensaio, elevando-se também a confiabilidade dos resultados.

Tabela 5.5 – Resultados do nível de glicemia dos camundongos como medida de atividade biológica da insulina precipitada por CO₂.

| Tempo (min) | Controle de insulina humana | | Controle de insulina suína | | Amostra A* | | Amostra B* | | Amostra C* | |
|-------------|-----------------------------|---------|----------------------------|---------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| | Média | DP | Média | DP | Média | DP | Média | DP | Média | DP |
| | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) |
| 0 | 93 | 4 | 100 | 5 | 139 | 37 | 102 | 29 | 126 | 23 |
| 5 | 99 | 11 | 95 | 4 | 129 | 47 | 100 | 46 | 117 | 11 |
| 10 | 64 | 4 | 62 | 4 | 101 | 56 | 77 | 59 | 105 | 4 |
| 15 | 32 | 6 | 37 | 1 | 56 | 32 | 52 | 40 | 71 | 0 |
| 20 | 22 | 2 | 24 | 3 | 35 | 18 | 32 | 28 | 54 | 0 |
| 25 | 17 | 4 | 18 | 2 | 30 | 21 | 27 | 11 | 46 | 3 |
| 30 | 8 | 11 | 14 | 3 | 21 | 30 | 24 | 7 | 45 | 5 |

Médias e desvios padrões (DP) de duas medidas.

* Amostras definidas na Tabela 5.4.

A Figura 5.17 ilustra os resultados médios de queda de glicemia dos controles de insulina humana e de insulina suína e a Tabela 5.6 lista os valores de K_{itt} . Estes controles foram utilizados na comparação de atividades biológicas com as demais amostras. Pela análise estatística realizada através do teste-t os valores de K_{itt} não diferem significativamente, mostrando que para os camundongos não há diferença em relação à atividade biológica entre os dois tipos de insulina. Então, apenas a insulina suína foi utilizada como controle para os demais experimentos.

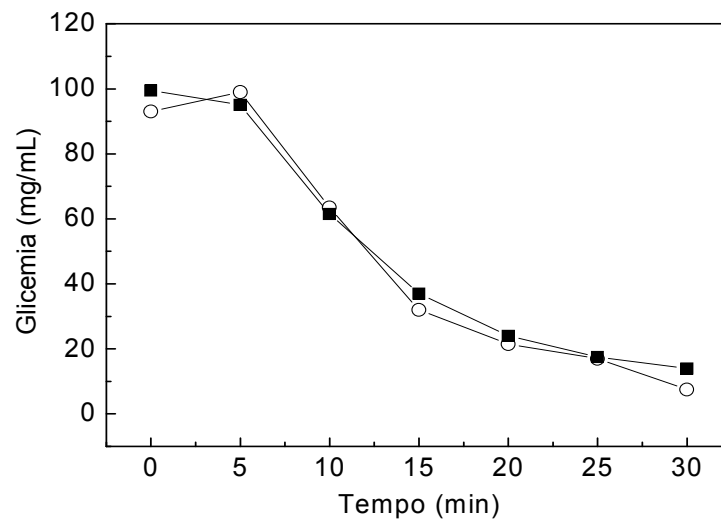


Figura 5.17 – Curvas de queda de glicemia em camundongos em função do tempo após a injeção de insulina: (—○—) controle de insulina humana; (—■—) controle de insulina suína.

Tabela 5.6 – Valores de K_{itt} e dados da análise estatística para os controles de insulina humana e suína.

| Controle | K_{itt}^a (%/min) | DP ^b (%/min) | t | p |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|
| Insulina humana | 10,5 | 1,5 | -1,1090 | 0,3829 |
| Insulina suína | 9,3 | 0,5 | | |

a. Valor médio de K_{itt} .

b. Desvio padrão de K_{itt} .

Os gráficos das Figuras 5.18 e 5.19 ilustram as médias de queda de glicemia causadas pela insulina suína e pelas amostras precipitadas por CO₂ em valores absolutos e relativos, respectivamente. Todas as amostras apresentaram atividade biológica. Porém, pela análise t-test dos valores de K_{itt} em um intervalo de confiança de 95%, a atividade biológica da amostra precipitada por CO₂ a 16 bar em NaHCO₃ 50 mM apresenta atividade significativamente menor em relação aos controles (Tabela 5.7). Isto pode ter sido ocasionado pelo processo de despressurização, que a 16 bar produz muito mais espuma do que a 3 e a 6 bar. A maior parte da insulina recuperada após o processo provém desta espuma e pode ter sofrido desnaturação (pelo próprio processo de formação de espuma; Maa e Hsu, 1996). Pela mesma análise estatística, não há diferença entre as atividades biológicas dos padrões e das amostras precipitadas a 3 bar em NaHCO₃ 10 mM e a 6 bar em NaHCO₃ 20 mM.

No experimento realizado a 16 bar, aproximadamente 50% do volume da solução saiu da unidade de precipitação na forma de espuma. Então, sugere-se que os processos de precipitação isoelétrica de proteínas com o CO₂ sejam realizados nas pressões mais baixas possíveis ou então que o precipitado seja separado da solução antes do processo de despressurização. Uma outra alternativa possível seria a despressurização lenta do sistema.

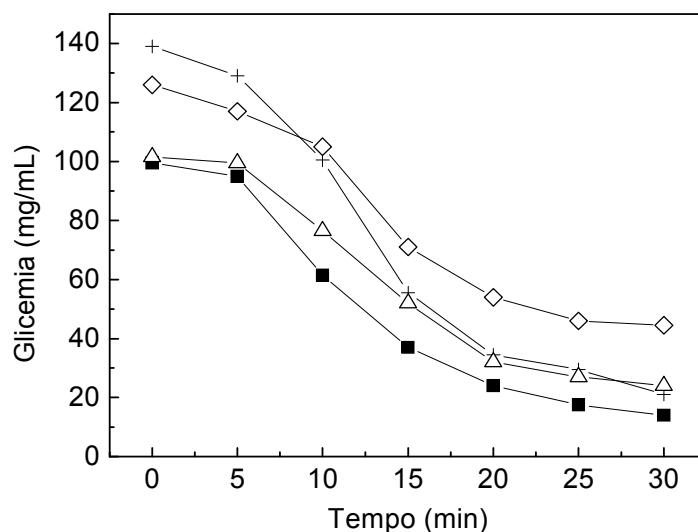


Figura 5.18 – Curvas de queda de glicemia em camundongos: (—■—) controle de insulina suína; amostras precipitadas por CO₂ a 25°C nas condições: (—+—) 3 bar e NaHCO₃ 10 mM; (—Δ—) 6 bar e NaHCO₃ 20 mM; (—◇—) 16 bar e NaHCO₃ 50 mM.

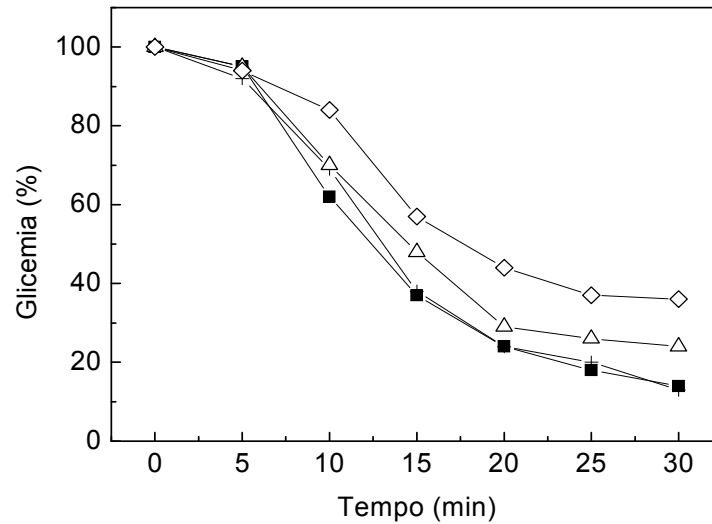


Figura 5.19 – Curvas de queda percentual de glicemia: (—■—) controle de insulina suína; amostras precipitadas por CO₂ a 25°C nas condições: (—+—) 3 bar e NaHCO₃ 10 mM; (—△—) 6 bar e NaHCO₃ 20 mM; (—◇—) 16 bar e NaHCO₃ 50 mM.

Tabela 5.7 – Valores de K_{itt} e dados da análise estatística para as amostras de insulina suína precipitadas por CO₂.

| Controle | K_{itt}^a (%/min) | DP ^b (%/min) | t | p |
|------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|
| Amostra A* | 9,3 | 1,0 | 0,0537 | 0,9619 |
| Amostra B* | 8,7 | 3,3 | -0,2392 | 0,8332 |
| Amostra C* | 5,4 | 0,7 | -6,7269 | 0,0214 |

a. Valor médio de K_{itt} .

b. Desvio padrão de K_{itt} .

* Amostras definidas na Tabela 5.4.

5.3.2. Atividade biológica da insulina suína precipitada por H_3PO_4

Para se comparar a eficiência do processo de precipitação isoelétrica da insulina suína com dióxido de carbono em relação a um ácido convencional, foram realizados ensaios de precipitação isoelétrica utilizando-se como agente precipitante o ácido fosfórico 2,0 M. Foram comparadas a cinética de queda de pH e a atividade biológica dos precipitados de insulina suína. A Tabela 5.8 lista as condições de precipitação.

Tabela 5.8 – Condições experimentais de precipitação da insulina suína por H_3PO_4 2,0 M.

| Amostra | T (°C) | Na_2HPO_4 | pH final | Volume* (mL) | Taxa** (mL/min) |
|---------|--------|-------------|----------|-----------------|--------------------|
| A' | 25 | 10 mM | 5,30 | 6,2 | 0,4 |
| B' | 25 | 20 mM | 5,28 | 2,5 | 0,3 |
| C' | 25 | 50 mM | 5,26 | 1,3 | 0,3 |

* Volume de H_3PO_4 2,0 M adicionado.

** Taxa de adição de H_3PO_4 .

Como o ácido fosfórico, que é um ácido forte, foi adicionado à solução de insulina suína em Na_2HPO_4 na forma líquida, a cinética de queda de pH dependeu apenas da velocidade em que o ácido foi adicionado à solução. Uma vez adicionadas as quantidades necessárias de ácido para que o sistema atingisse o ponto isoelétrico da insulina suína, o sistema rapidamente chegou ao pH de equilíbrio (Figura 5.20). Na Tabela 5.9 são listadas as médias e desvios padrão dos ensaios de glicemia.

Os gráficos das Figuras 5.21 e 5.22 ilustram as variações dos níveis de glicemia causadas pelo controle de insulina suína e pelas amostras precipitadas por CO_2 em valores absolutos e relativos, respectivamente. Todas as amostras apresentaram atividade biológica, porém, pela análise t-test dos valores de K_{III} em um intervalo de confiança de 95%, a atividade biológica da amostra precipitada em Na_2HPO_4 10 mM foi significativamente

menor do que a do controle de insulina suína. Não se encontrou uma explicação para este fato, a não ser a taxa de adição do ácido um pouco superior em relação às demais amostras.

Tabela 5.9 – Resultados do nível de glicemia dos camundongos como medida de atividade biológica da insulina precipitada por H_3PO_4 2,0 M.

| Tempo (min) | Controle de insulina suína | | Amostra A’* | | Amostra B’* | | Amostra C’* | |
|----------------|-------------------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|
| | Média (mg/dL) | DP (mg/dL) | Média (mg/dL) | DP (mg/dL) | Média (mg/dL) | DP (mg/dL) | Média (mg/dL) | DP (mg/dL) |
| 0 | 100 | 5 | 133 | 37 | 194 | 20 | 137 | 6 |
| 5 | 95 | 4 | 108 | 42 | 156 | 45 | 119 | 23 |
| 10 | 62 | 4 | 66 | 40 | 99 | 11 | 74 | 14 |
| 15 | 37 | 1 | 50 | 19 | 61 | 5 | 51 | 8 |
| 20 | 24 | 3 | 40 | 18 | 46 | 9 | 35 | 6 |
| 25 | 18 | 2 | 28 | 11 | 39 | 7 | 27 | 2 |
| 30 | 14 | 3 | 17 | 16 | 29 | 8 | 17 | 5 |

Médias e desvios padrão (DP) de duas medidas.

* Amostras definidas na Tabela 5.6.

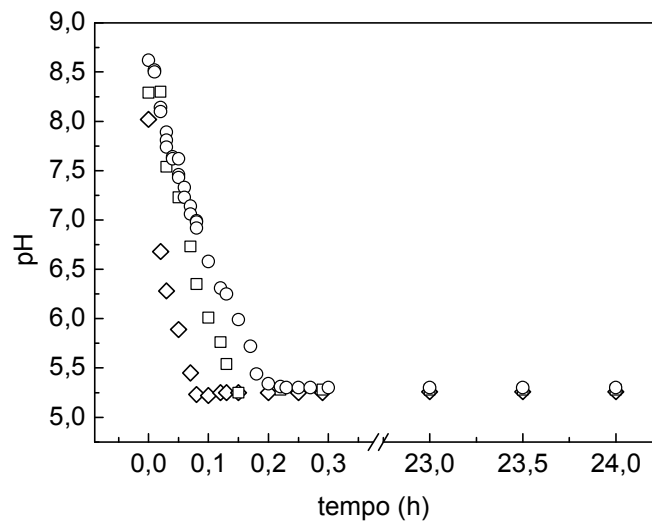


Figura 5.20 – Variação de pH em função do tempo das soluções de insulina suína a 25°C no processo de precipitação isoeletrica com H_3PO_4 2,0 M nas seguintes concentrações de Na_2HPO_4 : (\diamond) 10 mM; (\square) 20 mM; (\circ) 50 mM.

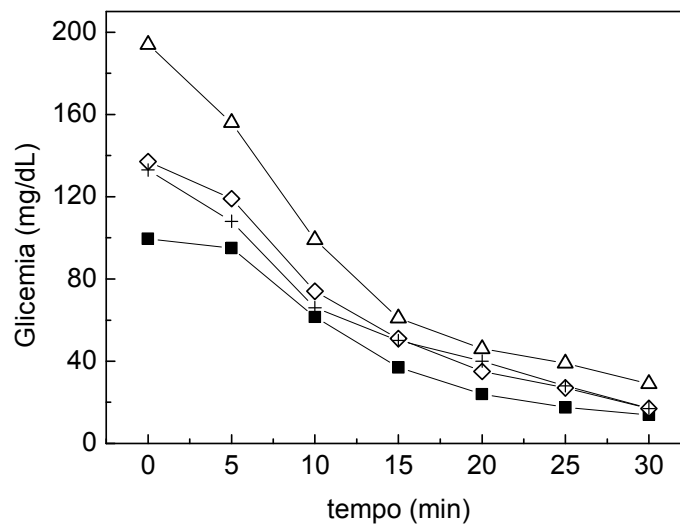


Figura 5.21 – Curvas de queda de glicemia dos camundongos do controle de insulina suína (-■-) e das amostras de insulina suína precipitadas por H_3PO_4 2,0 M a 25°C em: Na_2HPO_4 10 mM (-+-); Na_2HPO_4 20 mM (-Δ-); Na_2HPO_4 50 mM (-◇-).

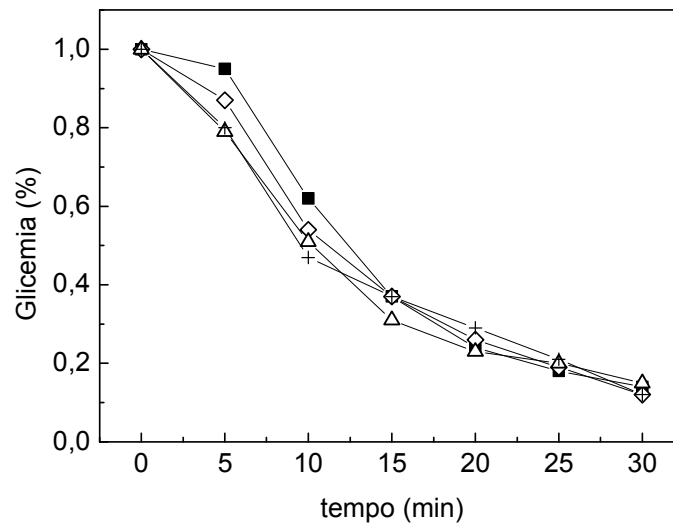


Figura 5.22 – Curvas de queda percentual de glicemia dos camundongos do controle de insulina suína (■) e das amostras de insulina suína precipitadas por H_3PO_4 2 M a $25^\circ C$ em: Na_2HPO_4 10 mM (+); Na_2HPO_4 20 mM (Δ); Na_2HPO_4 50 mM (◇).

Tabela 5.10 – Valores de K_{itt} e dados da análise estatística para as amostras de insulina suína precipitadas por CO_2 .

| Controle | K_{itt}^a (%/min) | DP ^b (%/min) | t | p |
|------------------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|
| Amostra A [*] | 6,5 | 0,1 | -7,9422 | 0,0155 |
| Amostra B [*] | 8,3 | 0,6 | -1,8622 | 0,2036 |
| Amostra C [*] | 8,0 | 0,3 | -3,2332 | 0,0838 |

a. Valor médio de K_{itt} .

b. Desvio padrão de K_{itt} .

* Amostras definidas na Tabela 5.8.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO II – MODELO TERMODINÂMICO

Neste capítulo são apresentados os resultados dos estudos de modelagem termodinâmica. Estes resultados são apresentados em duas partes, primeiramente os resultados do modelo de eletrólitos no item 6.1, utilizado para o cálculo das composições e do pH de equilíbrio do sistema composto pela solução aquosa de NaHCO_3 e pelo eletrólito volátil, o CO_2 , e em seguida os resultados do modelo com a inclusão da proteína no item 6.2. Ressalta-se que o modelo de eletrólitos foi desenvolvido e utilizado antes da realização de experimentos, pois através dele foram estimadas as condições experimentais a serem investigadas, mas para uma melhor organização do texto, ele é apresentado no presente capítulo.

6.1. Modelagem do equilíbrio do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$

O modelo de eletrólitos voláteis de Edwards *et al.* (1978) foi aplicado para os sistemas contendo CO_2 em equilíbrio com uma fase aquosa. Primeiramente, o modelo foi utilizado para o caso mais simples, com o CO_2 em equilíbrio com a fase líquida contendo apenas água pura. Em seguida, o modelo foi aplicado ao sistema tampão utilizado neste trabalho, contendo o CO_2 em equilíbrio com uma solução aquosa de NaHCO_3 . Ensaios de pH de equilíbrio foram realizados para se comparar os resultados experimentais com os obtidos pelo modelo e assim avaliar a sua validade.

Dados de pH de equilíbrio foram obtidos para o sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ a 25°C e comparados com dados obtidos a 32°C por Meyssami *et al.* (1992), Hofland *et al.* (2000) e com o modelo de Edwards *et al.* (1978) a 25°C (Figura 6.1). Os resultados obtidos neste

trabalho foram similares aos dados de Hofland *et al.* (2000) a 25°C e de Meysami *et al.* (1992) a 32°C.

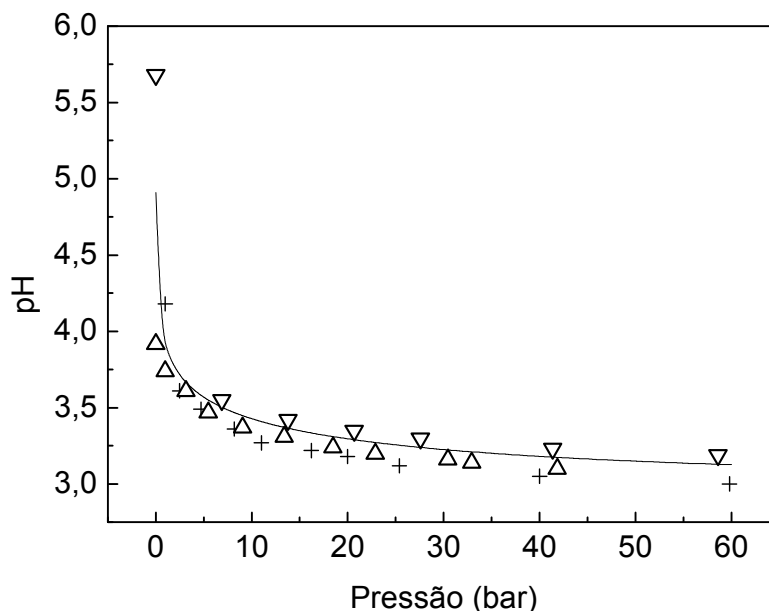


Figura 6.1 – pH de equilíbrio da água em função da pressão de CO₂. (+) Dados experimentais deste trabalho a 25°C; (∇) dados de Meysami *et al.* (1992) a 32°C; (Δ) dados de Hofland *et al.* (2000) a 25°C; (—) pH calculado pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) a 25°C.

Para a obtenção dos dados do modelo, foram utilizadas a constante de Henry, o volume molar parcial do CO₂ e a constante de dissociação da água de Edwards *et al.* (1978), constantes de dissociação do CO₂ de Kawazuishi e Prausnitz (1987) e coeficiente virial de Rumpf e Maurer (1993), apresentados em detalhes no Apêndice A. O parâmetro de interação entre o CO₂ e o íon HCO₃⁻ foi obtido de Kurz *et al.* (1995), dado no Apêndice B.

Observa-se que o pH diminui expressivamente com o aumento de pressão para as pressões mais baixas, diminuindo a taxa de queda com o aumento da pressão. Este comportamento também foi observado por Hofland *et al.* (2000). Observa-se também que os valores de pH a 32°C (Meysami *et al.* 1992) são mais altos do que os valores obtidos a

25°C. Este fato reflete a menor solubilidade do CO₂ a temperaturas mais altas, que estando presente em menores concentrações na fase líquida, diminui também a quantidade de íons H⁺ e HCO₃⁻ em solução.

Os dados de pH de equilíbrio em soluções aquosas de NaHCO₃ foram obtidos para a concentração de NaHCO₃ de 10 mM a 5, 15 e 25°C e para a concentração de 50 mM a 15°C (Figura 6.2). Apesar da queda do pH em função da pressão apresentar comportamento similar ao observado para o sistema CO₂/H₂O, verifica-se um efeito tamponante significativo devido à presença do bicarbonato de sódio em solução mesmo em baixas concentrações, que forma um tampão com o ácido carbônico. O pK_a do ácido carbônico é de 6,37 a 25°C (Millero *et al.*, 2007). Os tampões têm maior capacidade tamponante no intervalo entre ± 1 unidade de pH a partir do pK_a do ácido (Stoll e Blanchard, 1990). O pH da solução de NaHCO₃ 10 mM a 25°C ficou cerca de 1,2 unidades acima do pH da solução sem o sal. A capacidade tamponante da solução de NaHCO₃ 50 mM a 15°C foi ainda maior, devido à maior concentração do sal. O efeito da temperatura sobre o pH de equilíbrio foi menos expressivo, mas observou-se que para as temperaturas menores o pH foi menor, evidenciando novamente a maior solubilidade do CO₂ com a diminuição da temperatura.

O modelo de Edwards *et al.* (1978) apresentou resultados excelentes para o cálculo do pH de equilíbrio dos sistemas estudados, resultando em erro médio máximo de 0,13 unidade de pH para o sistema CO₂/H₂O a 25°C e erro médio mínimo de 0,04 unidade de pH para o sistema CO₂/H₂O/NaHCO₃ 10 mM a 15°C (Tabela 6.1). Ressalta-se que não foi necessário ajustar nenhum parâmetro de interação adicional aos sistemas estudados, tendo sido utilizados apenas parâmetros já disponíveis em trabalhos encontrados na literatura. O parâmetro de Kurz *et al.* (1995) foi obtido para faixas de temperaturas mais altas do que as utilizadas neste trabalho (ver Apêndice B), mas mesmo assim se mostrou adequado. Além disso, estes parâmetros têm pouca influência sobre os valores calculados para baixas concentrações do sal.

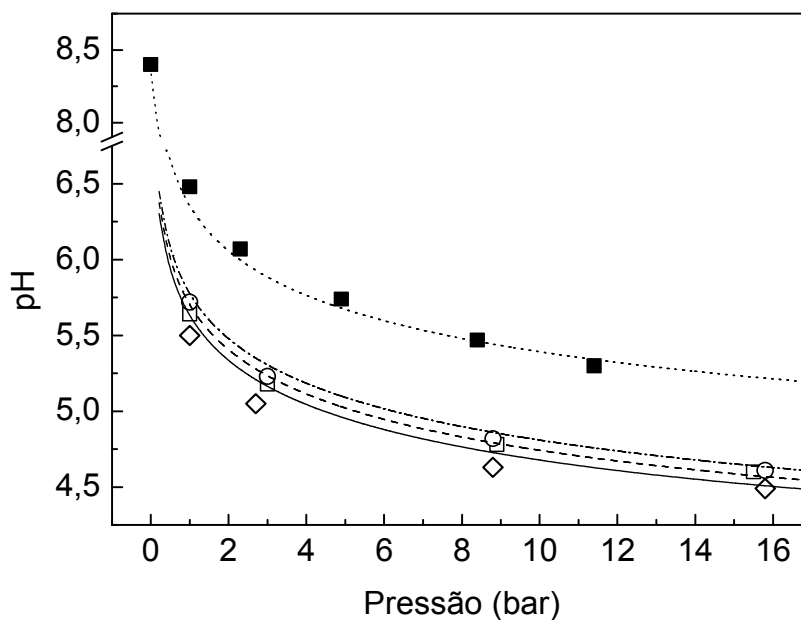


Figura 6.2 – Valores de pH de equilíbrio das soluções de NaHCO_3 em função da pressão de CO_2 . Símbolos representam os valores experimentais e linhas os valores calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978): (\diamond , —) NaHCO_3 10 mM e 5°C ; (\square , ---) NaHCO_3 10 mM e 15°C ; (\circ , -.-) NaHCO_3 10 mM e 25°C ; (\blacksquare , ...) NaHCO_3 50 mM e 15°C .

Tabela 6.1 – Erros médios entre os valores de pH de equilíbrio experimentais e os calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978).

| Sistema | T ($^\circ\text{C}$) | Erro médio (pH) |
|------------------------------------|------------------------|-----------------|
| $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ | 25 | 0,13 |
| $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$ 10 mM | 5 | 0,10 |
| $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$ 10 mM | 15 | 0,04 |
| $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$ 10 mM | 25 | 0,05 |
| $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$ 50 mM | 15 | 0,06 |

6.2. Modelagem do equilíbrio do sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3/\text{insulina suína}$

Os trabalhos de modelagem termodinâmica da insulina suína se iniciaram pela análise da carga global da molécula, calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch. Subsequentemente, tendo por base a atuação de forças de repulsão eletrostática e a lei de Coulomb, analisou-se o efeito destas forças, cujos valores dependem do quadrado da carga elétrica. Finalmente, tendo-se definida a metodologia para o cálculo da carga global da molécula de insulina, a carga foi inserida no modelo de eletrólitos de Pitzer (1973) e aplicado ao sistema de eletrólitos voláteis contendo a proteína para a resolução do equilíbrio de fases.

6.2.1. Cálculo da carga global da molécula de insulina suína

Seguindo-se o modelo exposto no capítulo 4 deste trabalho, a insulina suína foi modelada como um eletrólito fraco em solução, sendo a sua carga global calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch (Stryer, 1995) em função do pH do meio. Para o cálculo da carga global, foram utilizados para a proteína os mesmos valores de pK_a das cadeias laterais ionizáveis dos aminoácidos livres. Sabe-se que esta é uma aproximação, uma vez que, quando ligadas à proteína, estas cadeias podem se comportar diferentemente de quando estão na forma livre. Fatores relacionados à conformação da proteína, proximidade de grupos da proteína que podem interagir com estas cadeias laterais e maior ou menor exposição do grupo lateral ao solvente e interações eletrostáticas, por exemplo, podem influenciar de modo significativo o valor do pK_a (Tanford e Roxby, 1972; Yang *et al.*, 1993; Vlijmen *et al.*, 1998).

Contudo, a proteína é constituída de uma grande quantidade de aminoácidos, sujeitas a interações e conformações que dependem de muitas variáveis independentes. De acordo com um dos teoremas fundamentais da estatística, o teorema do limite central (Neto *et al.*, 2002), se a flutuação total numa certa variável aleatória for o resultado da soma das flutuações de muitas variáveis independentes e de importância mais ou menos igual, a sua distribuição tenderá para a normalidade, não importa qual seja a natureza das distribuições

das variáveis individuais. Como no cálculo da carga global da proteína são somadas as contribuições de cada grupo de aminoácido ionizável, considerando-se que a variação dos valores de pK_a de cada aminoácido esteja sujeito a diversas variáveis independentes, de acordo com o teorema do limite central, as flutuações terão uma distribuição normal. Assim, espera-se que o erro resultante em se utilizar o conjunto de valores de pK_a dos aminoácidos na forma livre também tenha uma distribuição normal e não tenha efeito significativo sobre o cálculo da carga global da insulina suína. Entretanto, para se verificar a validade do teorema do limite central quando aplicado aos valores de pK_a dos aminoácidos que compõem a proteína, a carga global da molécula de insulina suína foi calculada utilizando-se os valores de pK_a dos aminoácidos livres e com os valores experimentais obtidos por Kaarsholm *et al.* (1990) em experimentos de titulação com HCl da insulina humana 1 mM em cloreto de guanidínio (GdHCl) 6 M (Figura 6.3). Os valores dos pK_a utilizados são listados na Tabela 6.2.

Observa-se pelos gráficos da Figura 6.3 que nas redondezas do pI a diferença entre as cargas calculadas pelos dois conjuntos de valores de pK_a (metodologia descrita no Apêndice C) não diferem significativamente. A Figura 6.3B ilustra a diferença entre os dois métodos no intervalo de pH entre 4,0 e 6,0. Os dados experimentais de pH em solução de NaHCO_3 10 mM e os gerados pelo modelo de eletrólitos demonstraram que a faixa de pH para estas soluções entre 5 e 25°C e 1 a 20 bar está entre 4,42 e 5,77. Como a variação de carga da insulina suína calculada nesse intervalo pelos dois métodos é relativamente pequena e como as condições experimentais deste trabalho são diferentes daquelas utilizadas por Kaarsholm *et al.* (1990), optou-se por utilizar no modelo termodinâmico apenas o conjunto de valores de pK_a dos aminoácidos isolados (Stryer, 1995).

Tabela 6.2 – Valores de pK_a das cadeias ionizáveis da insulina suína.

| Aminoácido | Grupo ionizável | pK_a isolado^a | pK_a na proteína^b |
|-------------------|-----------------------------|--|--|
| A1 – Gly | α -NH ₂ | 9,80 | 7,38 |
| A4 – Glu | γ -COOH | 4,30 | 4,37 |
| A14 – Tyr | Fenol-OH | 10,90 | 10,20 |
| A17 – Glu | γ -COOH | 4,30 | 4,37 |
| A19 – Tyr | Fenol-OH | 10,90 | 10,20 |
| A21 – Asn | α -COOH | 2,00 | 3,45 |
| B1 – Phe | α -NH ₂ | 9,10 | 7,38 |
| B5 – His | Imidazol-NH ₂ | 6,00 | 5,98 |
| B10 – His | Imidazol-NH ₂ | 6,00 | 5,98 |
| B13 – Glu | γ -COOH | 4,30 | 4,37 |
| B16 – Tyr | Fenol-OH | 10,90 | 10,20 |
| B21 – Glu | γ -COOH | 4,30 | 4,37 |
| B22 – Arg | Guanidínio-NH ₂ | 12,50 | 11,10 |
| B26 – Tyr | Fenol-OH | 10,90 | 10,20 |
| B29 – Lys | ϵ -NH ₂ | 10,80 | 8,52 |
| B30 – Ala | α -COOH | 2,30 | 3,45 |

a. Stryer (1995)

b. Kaarsholm *et al.* (1990)

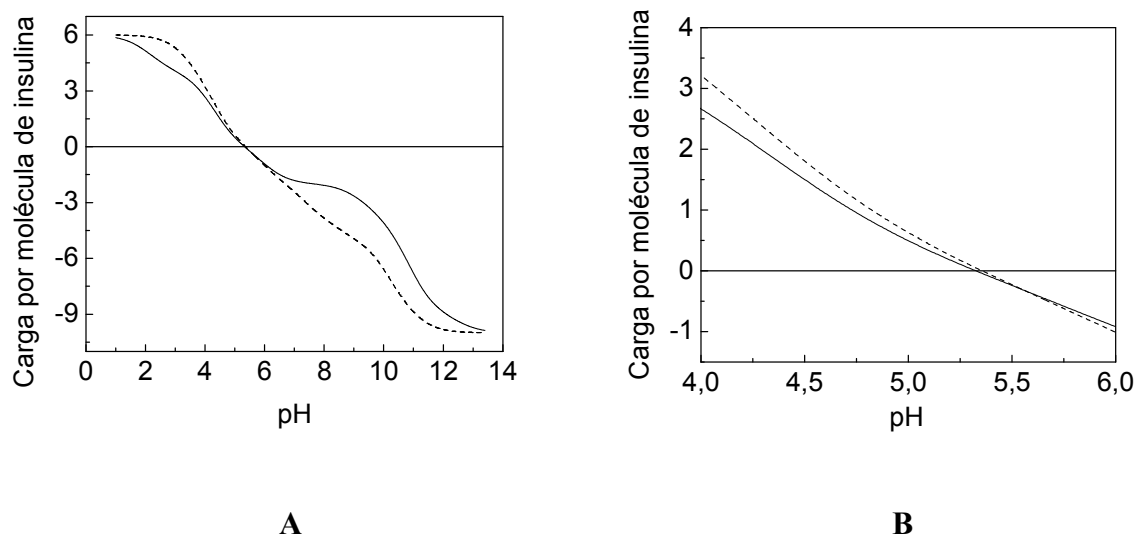


Figura 6.3 – Carga global da insulina suína calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch (Stryer, 1995): (—) valores típicos de pK_a dos aminoácidos isolados (Stryer, 1995); (---) valores de pK_a experimentais obtidos para a insulina humana 1 mM em GdHCl 6 M (Kaarsholm *et al.* 1990). Faixas de pH: (A) de 0,0 a 14,0; (B) de 4,0 a 6,0.

As curvas de solubilidade de proteínas obtidas por precipitação isoelétrica em função do pH apresentam um formato em U e foram obtidas por diversos autores para diversas proteínas. A presença de carga elétrica global nas moléculas de proteína faz com que haja forças de repulsão eletrostática entre as moléculas, resultando em um maior distanciamento entre elas em solução. Este maior distanciamento é acompanhado por efeito maior de solvatação das moléculas de solvente e interações com íons de cargas opostas, o que faz com que a proteína se mantenha solúvel. A ausência de carga elétrica global na proteína no pI ou em suas proximidades diminui a repulsão eletrostática, permitindo a aproximação das moléculas. Com esta aproximação, as moléculas passam a interagir umas com as outras, formando então agregados e diminuindo sensivelmente a solubilidade, levando à precipitação (Glatz, 1990). A força de repulsão eletrostática pode ser descrita pela lei de Coulomb. Segundo a lei de Coulomb, para duas partículas com cargas q_i e q_j a uma distância de separação r , a força F de atração ou repulsão é dada pela seguinte relação (Prausnitz *et al.*, 1999):

$$F = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 D r^2} \quad (6.1)$$

Para duas moléculas com carga de mesmo sinal, a força será de repulsão. No caso da precipitação isoelétrica, as moléculas de proteína terão ou carga nula ou então a mesma carga, o que, em relação à interação eletrostática, gerará sempre uma força de repulsão entre elas. Elevando-se as cargas calculadas da insulina ao quadrado, obtêm-se os perfis ilustrados pelos gráficos da Figura 6.4. Estes perfis são qualitativamente similares aos perfis de solubilidade obtidos para a proteína em função do pH do meio e sinaliza que o efeito de solubilidade em função do pH pode ser descrito pela força de repulsão eletrostática de Coulomb (Prausnitz *et al.*, 1999). Contudo, a expressão 6.1 descreve o comportamento de duas partículas isoladas em um meio contínuo. Em solução, outros efeitos devem ser considerados. Excetuando-se o caso de diluição infinita, nas vizinhanças de um íon negativo, a concentração local de íons positivos é maior do que a concentração global em solução. Uma atmosfera de íons de carga contrária ao redor dos íons *i* e *j* produz um efeito de blindagem e um decréscimo na força eletrostática entre eles. Esta foi a base da teoria de Debye-Hückel para soluções diluídas de eletrólitos (Prausnitz *et al.* 1999).

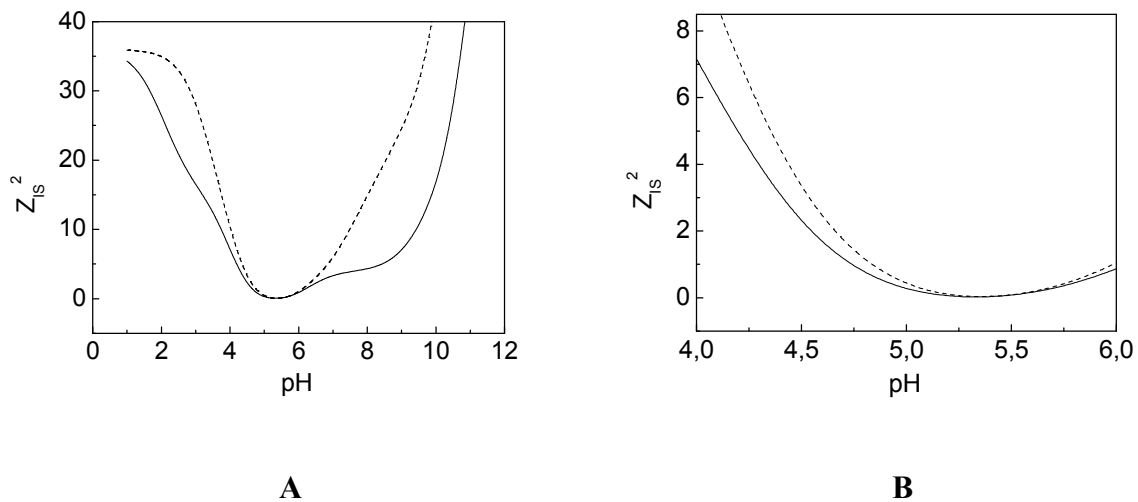


Figura 6.4 – Quadrado da carga global da insulina suína (z_{IS}^2) em função do pH: (—) valores típicos de pKa dos aminoácidos isolados (Stryer, 1995); (---) valores de pKa experimentais obtidos para a insulina humana 1 mM em GdHCl 6 M (Kaarsholm *et al.*, 1990). Faixas de pH: (A) de 0 a 14; (B) de 4,0 a 6,0.

6.2.2. Resolução do equilíbrio de fases do sistema CO₂/H₂O/NaHCO₃/insulina suína

Com a metodologia definida para o cálculo da carga global da molécula de proteína no meio em que se encontra, foi possível então aplicar o modelo de eletrólitos e incluí-la no modelo termodinâmico para a resolução do equilíbrio de fases do sistema. Considerando-se a molécula de insulina suína em sua forma monomérica, aplicou-se o modelo de Edwards *et al.* (1978) para a resolução do equilíbrio de fases da proteína em solução de NaHCO₃ 10 mM sob pressão de CO₂. Inicialmente, apenas o termo de longo alcance (termo de Debye-Hückel, devido a interações eletrostáticas) do modelo de eletrólitos de Pitzer (1973) foi considerado para a proteína. Foram utilizados como referência para os cálculos da atividade os valores experimentais de solubilidade de insulina suína mais próximos ao ponto isoelétrico para cada temperatura (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 – Solubilidade experimental da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM sob pressão de CO₂ nas proximidades do pI.

| <i>T</i> (°C) | <i>P</i> (bar) | pH | <i>m_{IS}</i> | |
|---------------|----------------|------|-----------------------|-----------------------|
| | | | (mg/mL) | (mol/kg) |
| 5 | 1,6 | 5,33 | 0,24 | 4,10.10 ⁻⁵ |
| 15 | 1,4 | 5,37 | 0,24 | 4,10.10 ⁻⁵ |
| 25 | 2,0 | 5,38 | 0,13 | 2,25.10 ⁻⁵ |

Verificou-se que a inclusão da proteína ao modelo tem pouco efeito sobre o pH de equilíbrio calculado quando comparada aos valores de pH calculados somente com os eletrólitos. Quando colocados juntos em um gráfico, verifica-se que os valores de pH calculados para a solução de NaHCO₃ com a insulina suína sob pressão de CO₂ coincidem com os valores calculados somente para a solução de NaHCO₃ sob as mesmas condições, reproduzindo os perfis apresentados na Figura 6.2. Porém, verificou-se que as diferenças entre os valores experimentais e calculados de solubilidade apenas considerando o termo de longo alcance são significativamente altas, resultando em erros médios de 44,2, 40,7 e 34,7% para as temperaturas de 5, 15 e 25°C, respectivamente. Apesar do modelo ser capaz de gerar uma medida qualitativa do efeito das forças de repulsão eletrostática entre as

moléculas de insulina nas vizinhanças do pI, na medida em que se afasta do ponto de referência da curva, que é tomado o mais próximo possível do ponto isoelétrico da proteína, a diferença entre os valores medidos e calculados também aumenta (Figuras 6.5 a 6.7).

Como os resultados do modelo para a insulina suína apenas com o termo de longo alcance do modelo de Pitzer (1973) não foram satisfatórios, realizou-se um estudo com a inclusão de termos de interações de curto alcance, o que implica no ajuste de parâmetros de interação binários para o sistema. A inclusão dos termos de curto alcance ao modelo de eletrólitos para a insulina suína requer uma prévia análise dos parâmetros com influência significativa sobre o equilíbrio de fases da proteína em solução. De um total de sete espécies químicas presentes em solução (CO_2 , HCO_3^- , H^+ , CO_3^{2-} , Na^+ , OH^- e insulina suína), há, matematicamente, 49 combinações de parâmetros de interação binários possíveis. Como os parâmetros são simétricos, ou seja, $\beta_{i,j}^k = \beta_{j,i}^k$, o número de parâmetros diminui consideravelmente, mas ainda assim, o sistema conta com 28 parâmetros de interação binários independentes. Ressalta-se que os $\beta_{i,j}^k$ do modelo são referentes às forças de curto alcance entre os componentes e algumas considerações preliminares podem contribuir para a redução do número de parâmetros relevantes para o estudo.

Em relação aos eletrólitos, para a faixa de concentrações utilizadas neste trabalho, os parâmetros de interação entre componentes iônicos de mesma carga podem ser desconsiderados, uma vez que a força de repulsão é uma barreira à aproximação entre estas espécies (Pitzer, 1973; Rumpf e Maurer, 1993). Os parâmetros de interação entre componentes em baixas concentrações também podem ser desconsiderados, pois a probabilidade de aproximação e interação entre estes componentes é pequena. Espécies que participam de uma mesma reação química já são avaliadas pela constante de reação e não precisam de parâmetros adicionais. Há que se observar também que alguns parâmetros de interação entre os íons dos sais já foram estabelecidos em trabalhos encontrados na literatura e não necessitam ser reajustados. Feitas estas ponderações e, uma vez que o equilíbrio dos eletrólitos foi descrito satisfatoriamente pelo modelo, nenhum novo parâmetro para estas espécies foi ajustado.

Sobre os parâmetros de interação que envolvem a insulina suína, é necessário observar as particularidades da classe de moléculas a que ela pertence. Neste trabalho, para a resolução do equilíbrio de fases da proteína, esta é considerada como um eletrólito em solução. Entretanto, como já exposto anteriormente, proteínas são na realidade

macromoléculas compostas por grupos sujeitos à ionização, grupos polares não ionizáveis e grupos apolares ou hidrofóbicos. Apesar da grande influência dos grupos ionizáveis sobre o comportamento das proteínas, interações não eletrostáticas de curto alcance como as interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio também apresentam consideráveis contribuições (Melander e Horváth, 1977; Pace *et al.*, 2004). Então, é importante avaliar as possíveis interações entre as moléculas de insulina com outros componentes solução. Dentre os parâmetros que possam ser mais relevantes, estão os relacionados com as interações entre as moléculas de insulina, da insulina com o sal NaHCO_3 e da insulina com o CO_2 . Em relação ao H^+ e OH^- , suas concentrações não são independentes e os efeitos destes íons sobre a proteína já são considerados no cálculo da carga global, de modo que o ajuste de parâmetros de interação com estas espécies é desnecessário. A Tabela 6.4 ilustra o panorama desta análise sobre os parâmetros de interação binários do modelo. Verifica-se que há quatro parâmetros binários que podem ser relevantes para o equilíbrio de fases da insulina suína no sistema, referentes às interações insulina-insulina, insulina- Na^+ , insulina- HCO_3^- e insulina- CO_2 .

Tabela 6.4 – Lista dos parâmetros de interação binários do modelo de eletrólitos de Pitzer (1973) para o sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3/\text{insulina}$ suína.

| Espécies | CO_2 | HCO_3^- | H^+ | CO_3^{2-} | Na^+ | OH^- | IS* |
|--------------------|---------------|------------------|--------------|--------------------|---------------|---------------|-----|
| CO_2 | 0 | – | – | – | – | – | – |
| HCO_3^- | ◆ | 0 | – | – | – | – | – |
| H^+ | 0 | 0 | 0 | – | – | – | – |
| CO_3^{2-} | 0 | 0 | 0 | 0 | – | – | – |
| Na^+ | 0 | ❖ | 0 | ❖ | 0 | – | – |
| OH^- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | – |
| IS* | ■ | ■ | 0 | 0 | ■ | 0 | ■ |

* Insulina suína.

◆ Kurz *et al.* (1995)

❖ Xia *et al.* (1999)

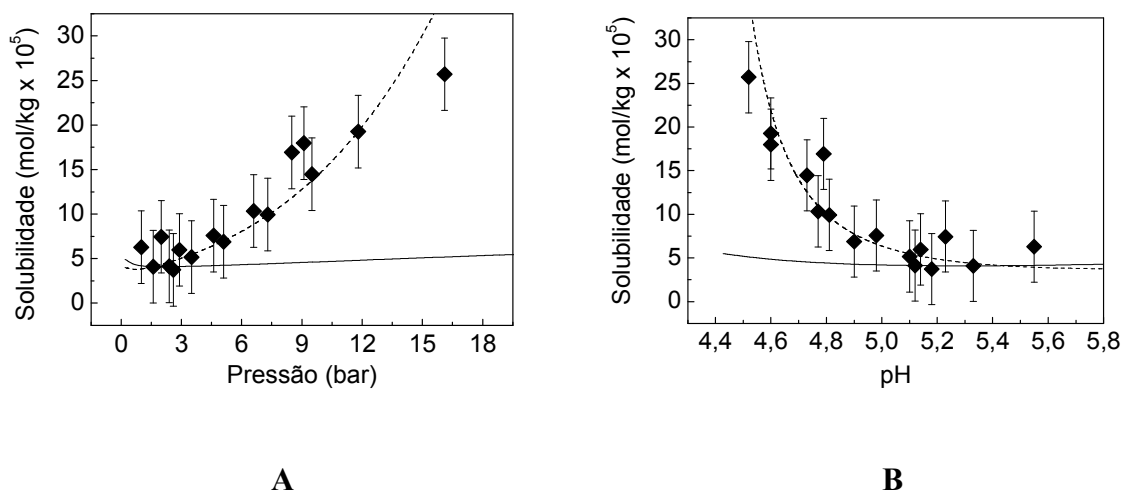
■ Parâmetros possivelmente relevantes.

Porém, como os experimentos foram realizados sempre a uma mesma concentração de NaHCO_3 de 10 mM, a regressão dos dados experimentais para a obtenção de um parâmetro para este sal pode não ser apropriada. Ainda que o sal tenha uma interação de curto alcance significativa com a proteína, a concentração de sal atuará como uma constante no algoritmo de ajuste de parâmetros, que possivelmente tenderá a obter valores artificiais na tentativa de minimizar os erros entre os valores experimentais e calculados. De fato, o ajuste dos parâmetros de interação entre a proteína e o sal resultou em parâmetros expressivamente altos, que carecem de um significado físico mais amplo e que não resultam em uma diminuição considerável do erro entre os valores experimentais e calculados. Em relação ao ajuste de parâmetros de interação entre as moléculas de insulina suína, verificou-se que as baixas concentrações da proteína (em unidade de molalidade) em relação aos outros componentes do sistema também fazem com que os parâmetros ajustados não resultem em melhoria expressiva no cálculo da solubilidade, além de gerar parâmetros também de valor elevado.

No entanto, analisando-se o comportamento do CO_2 em função da temperatura e pressão do sistema, verifica-se que a sua concentração aumenta com o aumento da pressão e com a diminuição de temperatura. O aumento de solubilidade com a diminuição da temperatura é comum para a solubilidade de gases em líquidos e usualmente é devido ao processo exotérmico de dissolução e à menor agitação das moléculas de água pelo abaixamento da temperatura. Este comportamento “retrógrado” é o mesmo verificado para a molécula de insulina suína em solução. Supondo-se haver um efeito de interação de curto alcance entre as moléculas de CO_2 e as moléculas de insulina suína, inseriu-se ao modelo este parâmetro de interação, β_{IS,CO_2}^0 , que foi ajustado aos dados experimentais de solubilidade. Houve melhoria significativa dos valores calculados com a inclusão deste parâmetro (Tabela 6.5; Figuras 6.5 a 6.7). Porém, nota-se que esta melhoria é muito mais evidente para as pressões mais altas e valores de pH mais baixos. Isto é condizente com o fato de haver mais CO_2 em solução nestas condições.

Tabela 6.5 – Erros médios entre os valores experimentais e calculados da solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM sob atmosfera de CO₂.

| T (°C) | $\beta_{CO_2,IS}^0$ | Erro médio |
|--------|---------------------|------------|
| 5 | 0 | 44,2% |
| 5 | -1,17 | 17,0% |
| 15 | 0 | 40,7% |
| 15 | -1,27 | 12,5% |
| 25 | 0 | 34,7% |
| 25 | -1,35 | 12,1% |

**Figura 6.5** – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 5°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (◆) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) apenas com o termo de longo alcance do modelo de Pitzer (1973); (---) inclusão do termo de interação β_{IS,CO_2}^0 .

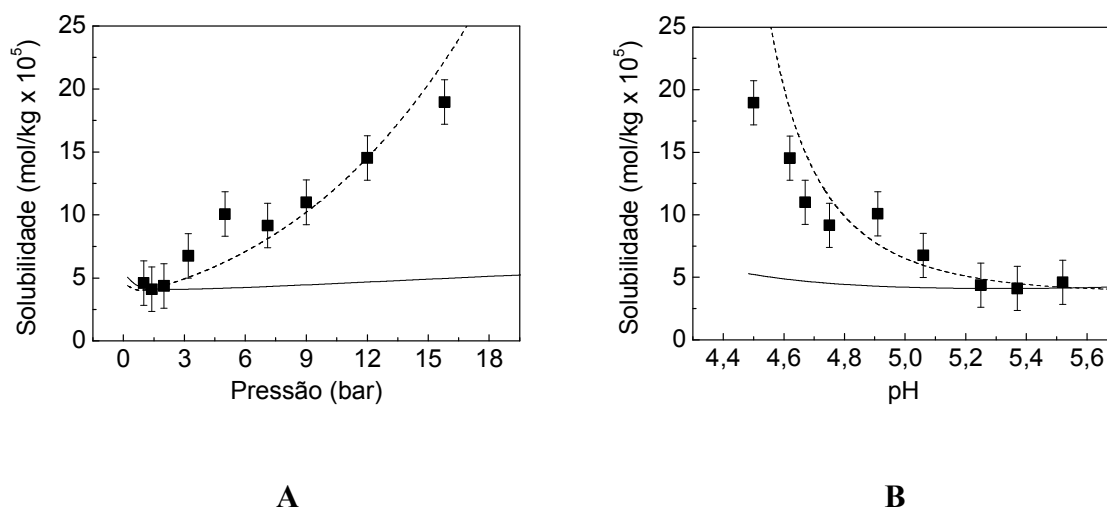


Figura 6.6 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 15°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (■) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) apenas com o termo de longo alcance do modelo de Pitzer (1973); (---) inclusão do termo de interação β_{IS,CO_2}^0 .

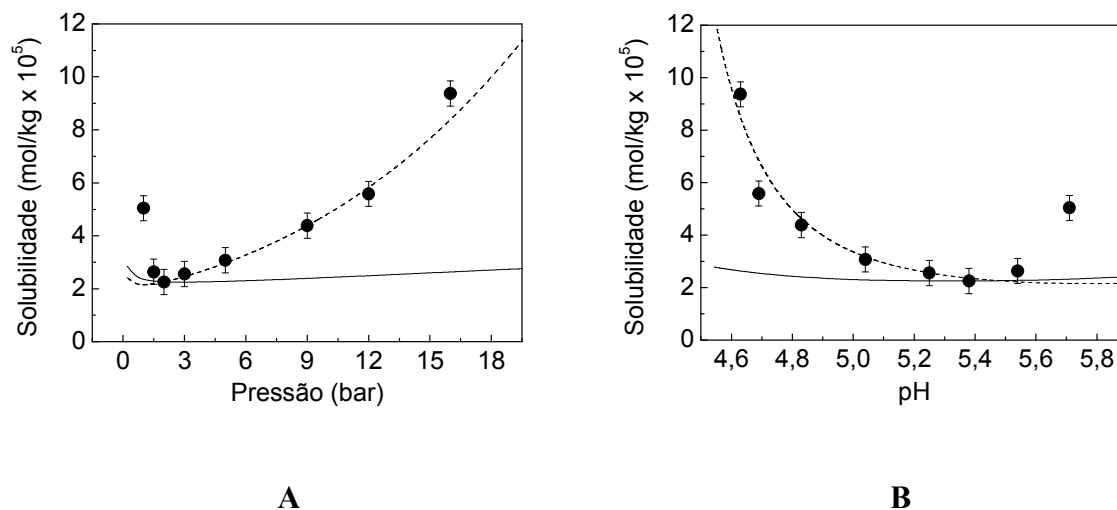


Figura 6.7 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 25°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (●) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) apenas com o termo de longo alcance do modelo de Pitzer (1973); (---) inclusão do termo de interação β_{IS,CO_2}^0 .

Nota-se que houve grande melhoria nos cálculos de solubilidade da insulina suína com a inclusão de $\beta_{CO_2,IS}^0$. Estes resultados induzem à conclusão de que o aumento da quantidade de CO₂ em solução seria o responsável pelo aumento da solubilidade da proteína. Porém, não foi encontrada uma explicação razoável que justificasse este fato. O efeito das interações eletrostáticas sobre a solubilidade das proteínas em função do pH do meio já está consolidado por diversos estudos e resultados experimentais encontrados na literatura. Se a presença do CO₂ resulta em aumento da solubilidade, este efeito deve se dar por alguma influência direta ou indireta sobre as forças de atração ou repulsão eletrostáticas entre as moléculas da proteína. Entretanto, a molécula de CO₂ possui momento de dipolo igual a zero, e tem baixa afinidade por moléculas eletricamente carregadas ou com muitos grupos polares. Embora ela possua momento de quadrupolo (Hamilton, 1956; Harries, 1970), o seu efeito sobre a solvatação de solutos deve ser significativo apenas para maiores concentrações e densidades, como por exemplo, no estado supercrítico (Saharay e Balasubramanian, 2004; 2007). Apesar de a molécula de insulina suína possuir uma grande quantidade de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, também apolares, é pouco provável que a interação do CO₂ com estes grupos seja responsável pela solvatação e sustentação da proteína na forma solúvel em fase aquosa. Também é improvável que o CO₂ tenha efeito significativo sobre a constante dielétrica da água, uma vez que a maior solubilidade do CO₂ calculada em NaHCO₃ 10 mM entre as condições experimentais avaliadas foi de 1,6% em fração mássica a 16 bar e 5°C.

Para se verificar o efeito da concentração de CO₂ sobre a solubilidade da insulina suína, as solubilidades em outras concentrações de NaHCO₃, a 20 mM e 50 mM a 25°C sob pressão de CO₂ próxima ao ponto isoelétrico, foram medidas e comparadas com o valor em NaHCO₃ 10 mM (Tabela 6.6). Diferentes concentrações de NaHCO₃ precisaram ser utilizadas para se manter o pH próximo do pI a cada condição de pressão de CO₂.

Tabela 6.6 – Solubilidade da insulina suína em função da pressão de CO₂ e concentração de NaHCO₃.

| <i>T</i> (°C) | <i>P</i> (bar) | NaHCO ₃ (mM) | pH | <i>m</i> _{CO2} (mol/kg) | <i>m</i> _{IS} | |
|---------------|----------------|----------------------------|------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| | | | | | (mg/mL) | (mol/kg) |
| 25 | 2,0 | 10 | 5,38 | 0,07 | 0,13 | 2,25.10 ⁻⁵ |
| 25 | 5,7 | 20 | 5,22 | 0,19 | 0,25 | 4,27.10 ⁻⁵ |
| 25 | 16,1 | 50 | 5,31 | 0,50 | 0,13 | 2,33.10 ⁻⁵ |

Observa-se por estes resultados experimentais que a quantidade de CO₂ não é diretamente responsável pela maior solubilidade da insulina suína. A pressão de 16 bar, a concentração de CO₂ em NaHCO₃ 50 mM é aproximadamente 7 vezes maior do que a 2 bar em NaHCO₃ 10 mM, mas as solubilidades são praticamente iguais. Caso a interação da insulina suína com o CO₂ fosse diretamente responsável pela maior solubilidade da insulina, o aumento da concentração de CO₂ deveria ocasionar o aumento da solubilidade, o que não foi verificado experimentalmente. Por outro lado, o aumento da concentração de CO₂ molecular aumenta a concentração de ácido carbônico, que por sua vez, libera íons H⁺ em solução. Devido ao efeito tamponante do NaHCO₃, os valores de pH para a pressão de CO₂ de 2 bar em NaHCO₃ 10 mM e de 16 bar em NaHCO₃ 50 mM são próximos, resultando em valores de solubilidade similares. Estes resultados indicam a forte influência do pH sobre a solubilidade e descartam o efeito da interação com o CO₂.

O efeito da concentração de íons H⁺, que ao reagir com as cadeias laterais ionizáveis dos aminoácidos determina a carga da molécula de insulina suína, é computada no modelo pelo pH do sistema. Mas este efeito não foi suficiente para descrever a solubilidade do monômero de insulina pelo modelo termodinâmico adotado. Contudo, sabe-se que a molécula de insulina sofre reações de auto-associação que geram multímeros estáveis tanto na fase sólida quanto em solução. De fato, na presença de dois átomos de Zn por hexâmero de insulina, a população de hexâmeros de insulina é estável e predominante em soluções neutras ou moderadamente alcalinas (Blundell *et al.*, 1972). A proporção de dois átomos de Zn por hexâmero de insulina suína em unidades de massa é de 0,38%. Medições realizadas

por espectroscopia de absorção atômica revelaram a proporção de 0,44% de Zn nas amostras de insulina suína utilizada nos ensaios de precipitação, o que induz a formação do hexâmero em solução. É razoavelmente certo que o hexâmero encontrado em cristais de insulina é o mesmo observado em soluções de insulina zíncica (Blundell *et al.*, 1972). Na formação do hexâmero, o monômero de insulina primeiramente se aglomera em dímeros, que se unem para formarem tetrâmeros e em seguida, pela adição de mais um dímero, o hexâmero (Jeffrey e Coates, 1966, Goldman e Carpenter, 1974, Helmerhorst e Stokes, 1986, 1987). Segundo Milthorpe *et al.* (1977), o hexâmero de insulina bovina contendo dois átomos de Zn por hexâmero (em tampão de Tris-HCl e NaCl em pH 7,0 com força iônica de 0,2 a 25°C) em concentrações acima de 0,1 mg/mL se encontra na proporção de 75% ou acima do total da proteína (Figura 6.8).

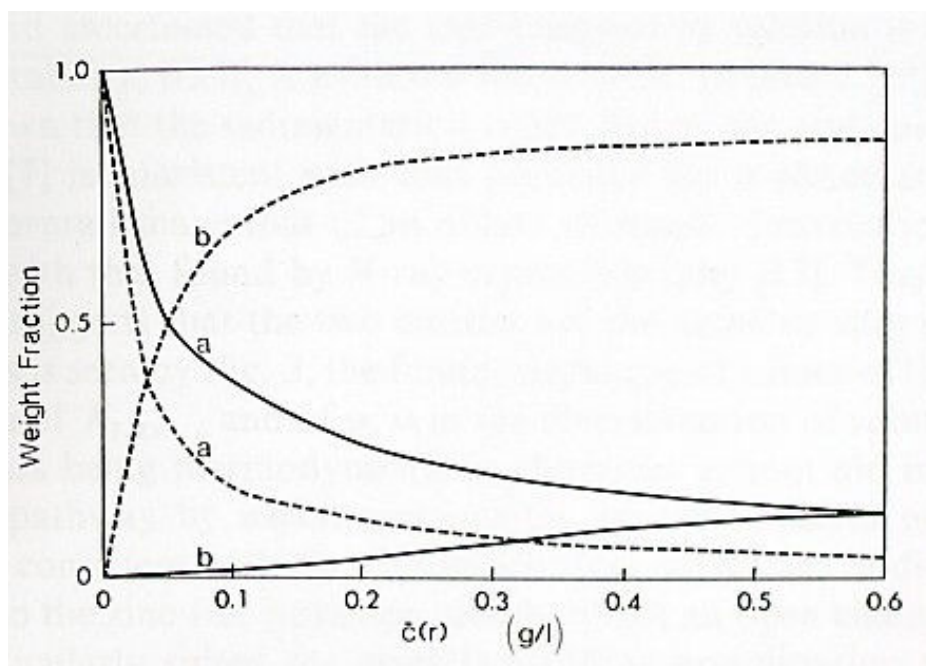


Figura 6.8 – Comparação da fração mássica do monômero (a) e do hexâmero (b) de insulina bovina em função da concentração mássica total para a insulina sem Zn (—) e com Zn (---) em tampão de Tris-HCl/NaCl, pH 7,0 e $I = 0,2$ a 25°C (Milthorpe *et al.*, 1977).

A região de contato entre dois monômeros no dímero é basicamente composta de resíduos apolares. Na formação do dímero, estes resíduos apolares ficam protegidos do contato com as moléculas do solvente. Desta forma, como já exposto anteriormente, a agregação do monômero ocorre com a exclusão do solvente, e pode contribuir com um aumento de entropia, favorecendo a agregação. Além disso, os resíduos apolares com menores separações intermoleculares estão envolvidos por forças de van der Waals. Há também a formação de pontes de hidrogênio entre os resíduos de fenilalanina, que podem exercer forças adicionais importantes para uma maior aproximação dos monômeros (Blundell *et al.*, 1972). A associação dos dímeros para a formação de multímeros de maior grau é o resultado de uma série de contatos envolvendo tanto interações entre resíduos apolares quanto pontes de hidrogênio. A progressiva blindagem dos resíduos apolares na agregação do monômero e dos dímeros leva a um hexâmero cuja superfície é quase que inteiramente polar (Blundell *et al.*, 1972).

Em relação à distribuição de cargas, há muitos grupos potencialmente ionizáveis em posições desfavoráveis na molécula do hexâmero (Blundell *et al.* 1972). Este fato sugere que a associação da insulina suína também se dê com a soma das cargas de cada monômero, ainda que parcialmente. Em estudos de auto-associação da insulina com e sem Zn por espectrometria de massas, Nettleton *et al.* (2000) observaram que em pH 3,2, a formação do dímero leva o estado de carga positiva de +5 no caso do monômero para +7 para o dímero, ao invés de +10. Esta redução de carga de +10 para +7 para o par de moléculas ionizadas sugere que três interações iônicas não presentes no monômero de insulina estão envolvidas na estabilização da estrutura do dímero. De qualquer modo, o valor de carga do dímero é maior do que a carga do monômero, sendo multiplicada por um fator de 1,4 em relação à carga do monômero. Para o tetrâmero, os autores encontraram valores de carga 2,7 vezes maior do que a do monômero e para o hexâmero contendo 2 átomos de Zn (2 Zn), 3,0 vezes maior do que a carga do monômero. Além disso, este fator varia com o pH. Para o pH de 2,0, os autores obtiveram valores de carga em relação ao monômero de insulina multiplicada por um fator de 1,3 para o dímero, 1,7 para tetrâmero e 2,0 para o hexâmero (2 Zn).

Constantes de associação da insulina em dímeros, tetrâmeros e hexâmeros também foram obtidas por estes e outros autores para soluções de insulina zíncica (Goldman e Carpenter, 1974, Milthorpe *et al.*, 1977, Helmerhorst e Stokes, 1986, 1987, Nettleton *et al.*, 2000), mas as diferentes condições em que foram obtidas em relação às condições experimentais do presente trabalho e a indefinição em relação ao estado de ionização dos multímeros de insulina limitam a utilização direta destes parâmetros na modelagem termodinâmica proposta. No entanto, as evidências são de que as presenças do dímero, tetrâmero e hexâmero de insulina em solução para a faixa de concentração investigada neste trabalho são significativas e que as cargas globais são maiores do que o da molécula na forma monomérica.

Utilizando-se os fatores de multiplicação encontrados por Nettleton *et al.* (2000) no pH 3,2 e os valores de pK_a dos aminoácidos isolados (Stryer, 1995), foram calculadas as cargas e o quadrado das cargas dos multímeros de insulina (Figuras 6.9 e 6.10, respectivamente). Nota-se que o efeito de cargas adicionais aos multímeros de insulina é substancial. Associando-se novamente o efeito do quadrado da carga às forças de repulsão eletrostática, pode-se inferir que as reações de associação e a presença expressiva dos multímeros em solução resultem em uma maior solubilidade global da insulina quando comparada apenas à consideração do monômero de insulina.

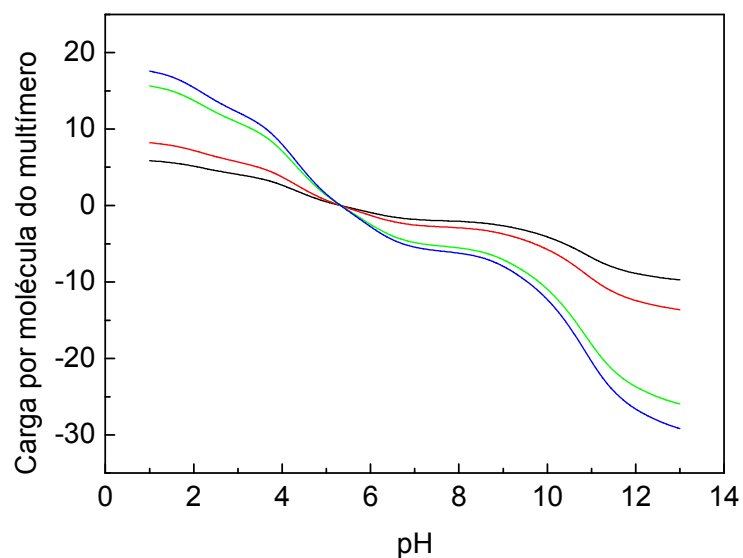


Figura 6.9 – Cargas dos multímeros de insulina suína utilizando-se os valores de pK_a dos aminoácidos livres (Stryer, 1995) e a proporção de cargas dada por Nettleton *et al.* (2000): (—) monômero; (—) dímero; (—) tetrâmero; (—) hexâmero.

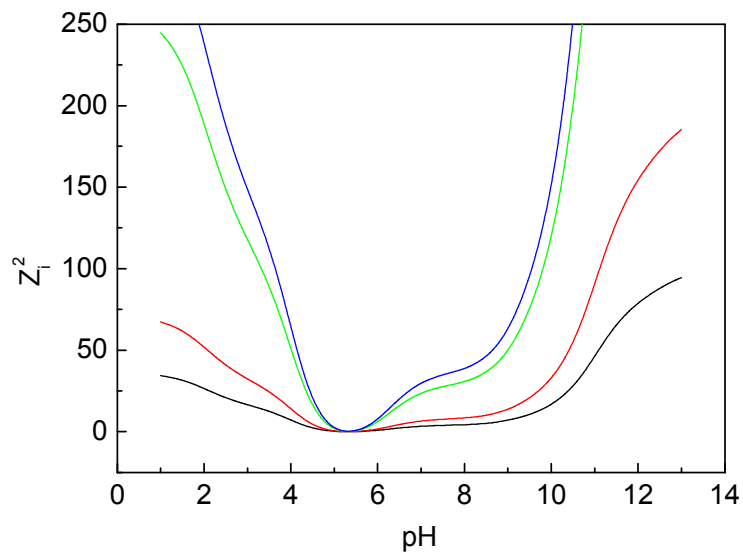


Figura 6.10 – Quadrado das cargas dos multímeros de insulina suína utilizando-se os valores de pK_a dos aminoácidos livres (Stryer, 1995) e a proporção de cargas dada por Nettleton *et al.* (2000): (—) monômero; (—) dímero; (—) tetrâmero; (—) hexâmero.

Pode-se definir que as cargas globais dos multímeros de insulina sejam iguais à carga do monômero multiplicados por um fator, que pode ser denominado de k_i . Assim, as cargas dos multímeros podem ser dadas pelas seguintes relações:

$$z_D = k_D z_M \quad (6.1)$$

$$z_T = k_T z_M \quad (6.2)$$

$$z_H = k_H z_M \quad (6.3)$$

em que z_D , z_T e z_H são as respectivas cargas globais do dímero, do tetrâmero e do hexâmero de insulina, z_M é a carga do monômero, calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch (Stryer, 2005), e os fatores k_D , k_T e k_H são fatores multiplicadores. É possível, com a definição das equações 6.1 a 6.3, calcular-se um valor médio de carga que represente a população dos multímeros de insulina. Definindo-se a concentração macroscópica (experimentalmente acessível) de insulina como a soma de todas as moléculas de insulina presentes no sistema, a concentração macroscópica será soma das concentrações de todos os multímeros, multiplicados pelo número de monômeros que os compõem. Esta definição pode ser expressa pela seguinte relação:

$$m_{IS} = m_M + 2m_D + 4m_T + 6m_H \quad (6.4)$$

sendo m_{IS} a concentração macroscópica de insulina, m_M a concentração do monômero, m_D a concentração do dímero, m_T a concentração do tetrâmero e m_H a concentração do hexâmero. A fração de cada multímero é dada por:

$$\Phi_i = \frac{im_i}{m_{IS}} \quad (6.5)$$

sendo:

$$\sum_i \Phi_i = 1 \quad (6.6)$$

Assim, a carga média da população de multímeros presentes em solução pode ser calculada pela seguinte equação:

$$\bar{z}_{IS} = \Phi_M z_M + \Phi_D z_D + \Phi_T z_T + \Phi_H z_H \quad (6.7)$$

em que \bar{z}_{IS} é a carga média da população de multímeros de insulina. Substituindo-se as relações 5.4 a 5.6 na equação 5.10, obtém-se a expressão:

$$\bar{z}_{IS} = (\Phi_M + \Phi_D k_D + \Phi_T k_T + \Phi_H k_H) z_M \quad (6.8)$$

Denominando-se por k o termo entre parênteses na equação 5.11, chega-se à:

$$\bar{z}_{IS} = k \cdot z_M \quad (6.9)$$

De acordo com os resultados de Nettleton *et al.* (2000), os fatores k_i , e consequentemente o fator k , podem variar com o pH do meio. No entanto, para os cálculos deste trabalho os fatores k_i foram considerados constantes. Os resultados de Milthorpe *et al.* (1977) demonstram que a proporção de monômeros e hexâmeros de insulina não apresenta grandes variações para concentrações totais da proteína acima de 0,1 g/L (0,1 mg/mL ou $1,7 \cdot 10^{-5}$ mol/kg). Aplicando-se estas considerações ao sistema em estudo, ou seja, assumindo-se uma distribuição dos diversos multímeros de insulina aproximadamente constante para a faixa de solubilidade investigada e valores de k_i constantes, pode-se assumir que o fator de multiplicação k seja também constante e represente o estado de ionização média da população dos multímeros de insulina.

Ao se aplicarem estas modificações ao modelo termodinâmico para o cálculo do equilíbrio de fases da proteína, considera-se a população de multímeros de insulina como um único pseudo-componente. Estas novas definições alteram os valores de carga global na equação para o cálculo do coeficiente de atividade da proteína, porém, praticamente não provocam alterações no cálculo da atividade, uma vez que o valor de referência experimental utilizado para este cálculo é o ponto mais próximo do ponto isoelétrico, em que teoricamente, todos os multímeros têm cargas próximas ao valor nulo. A condição de atividade constante para o monômero de insulina no equilíbrio sólido-líquido também se aplica aos multímeros, uma vez que o potencial químico dos multímeros é uma função do potencial do monômero (Pessôa Filho, 1998, Pessôa Filho e Mohamed, 1999).

O fator k foi inserido no modelo termodinâmico como um parâmetro ajustável aos dados experimentais. Os resultados dos cálculos de pH de equilíbrio e solubilidade em função da pressão e do pH para as temperaturas de 5, 15 e 25°C são ilustrados nas Figuras 6.11 a 6.15. Os erros médios entre os valores experimentais e calculados são apresentados na Tabela 6.7.

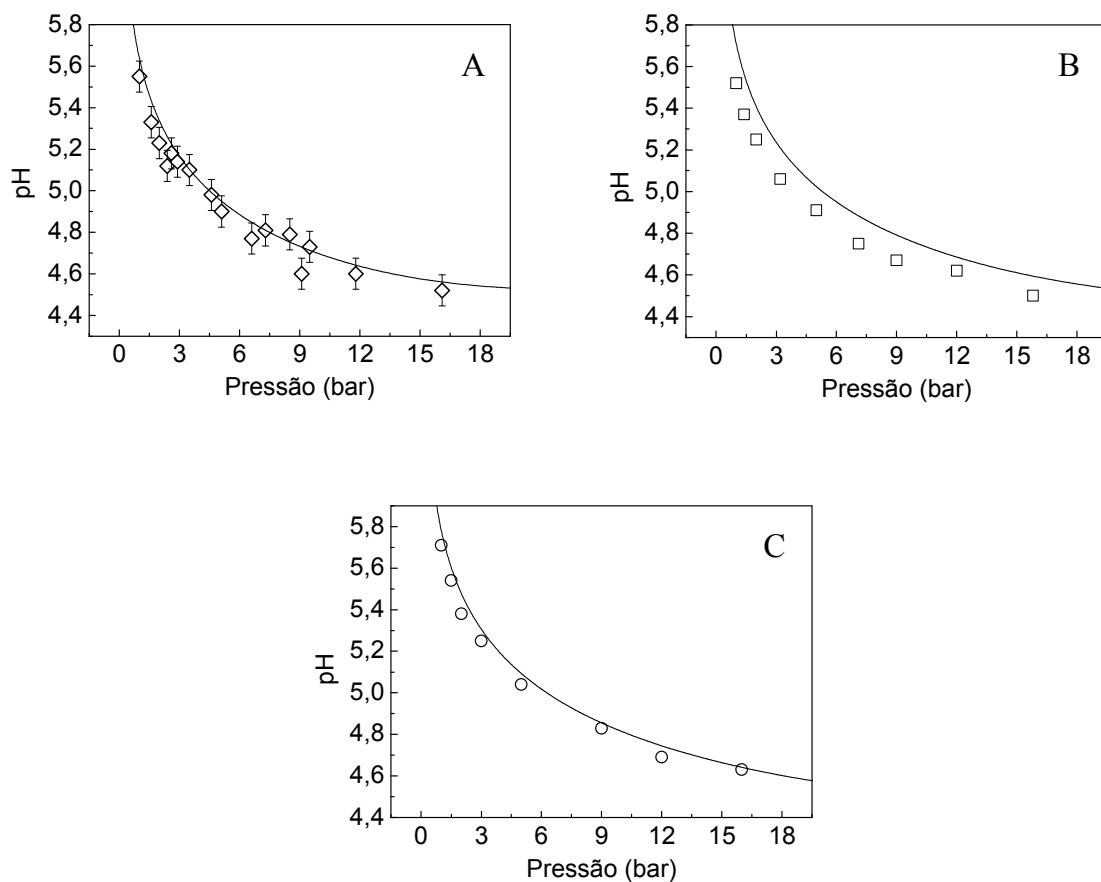


Figura 6.11 – Valores de pH de soluções saturadas de insulina suína em NaHCO₃ 10 mM em função da pressão de CO₂. (A): (◇) dados experimentais a 5°C; (B): (□) dados experimentais a 15°C; (C): (○) dados experimentais a 25 °C. (—) valores calculados pelo modelo com ajuste do fator *k*.

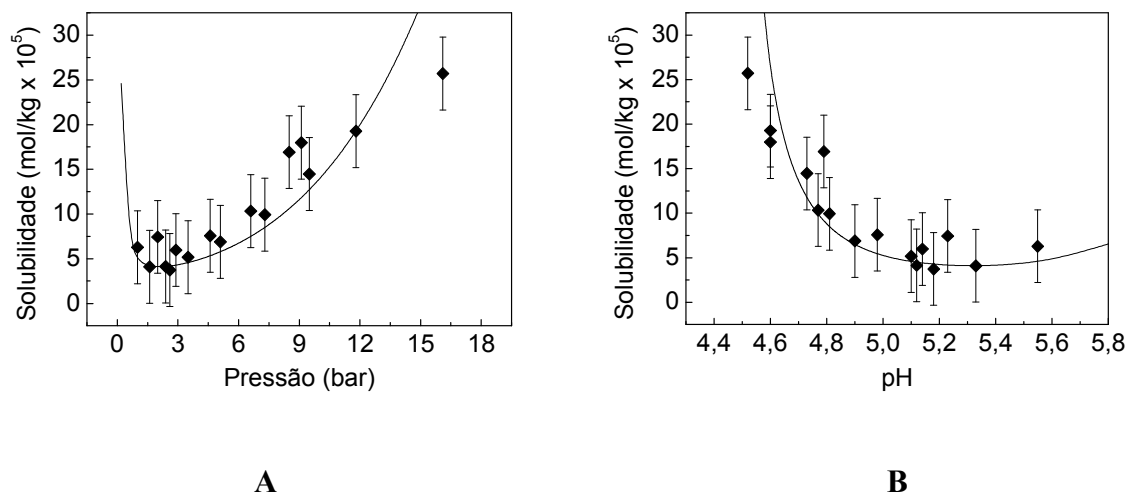


Figura 6.12 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 5°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (◆) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k .

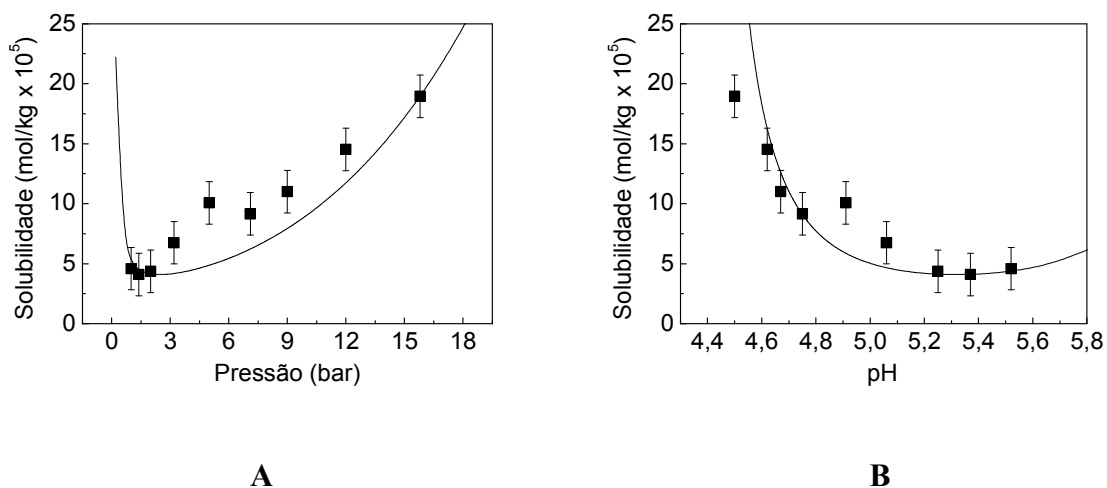


Figura 6.13 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 15°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (■) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k .

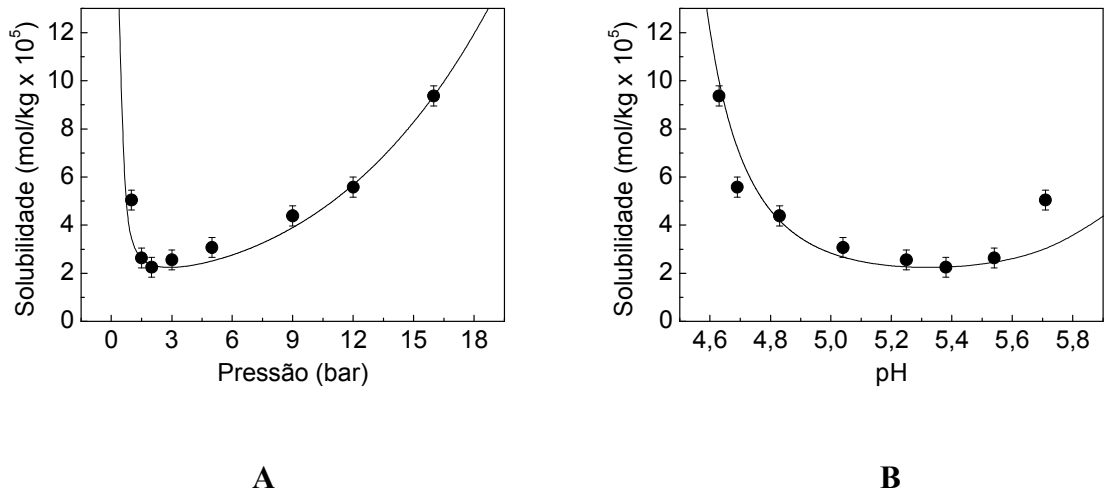


Figura 6.14 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM a 25°C: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH da solução. (●) Dados experimentais; (—) valores calculados pelo modelo com ajuste do fator *k*.

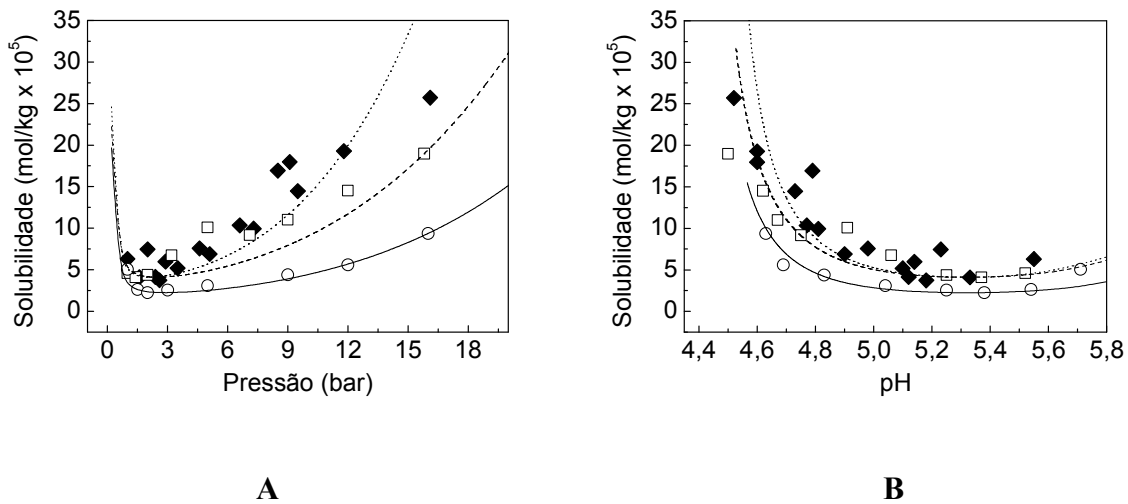


Figura 6.15 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM: (A) em função da pressão de CO₂; (B) em função do pH. Dados experimentais: (◆) 5°C; (□) 15°C; (○) 25°C. Valores calculados pelo modelo com ajuste do fator *k*: (⋯) 5°C; (---) 15°C; (—) 25°C.

Tabela 6.7 – Erros médios entre os valores experimentais e calculados da solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 10 mM sob atmosfera de CO₂.

| T (°C) | $\beta_{CO_2,IS}^0$ | <i>k</i> | Erro médio |
|--------|---------------------|----------|------------|
| 5 | 0 | 1 | 44,2% |
| 5 | -1,17 | 1 | 17,0% |
| 5 | 0 | 3,15 | 21,7% |
| 15 | 0 | 1 | 40,7% |
| 15 | -1,27 | 1 | 12,5% |
| 15 | 0 | 2,86 | 21,7% |
| 25 | 0 | 1 | 34,7% |
| 25 | -1,35 | 1 | 12,1% |
| 25 | 0 | 3,03 | 10,6% |

Em relação aos coeficientes de atividade, observa-se um grande desvio da idealidade à medida que o pH do sistema se afasta do pI, refletindo o aumento da carga global da insulina suína (Figura 6.16).

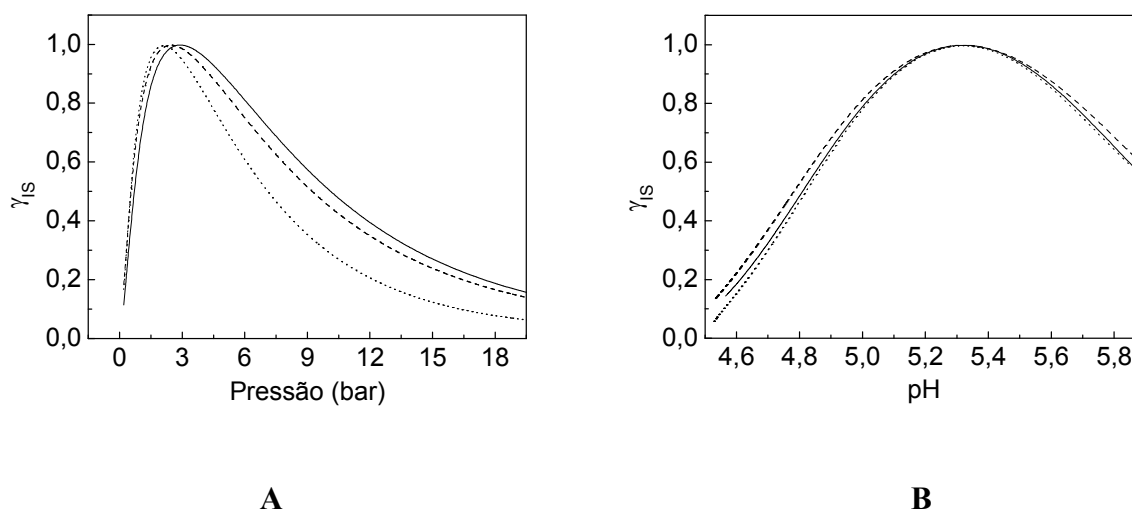


Figura 6.16 – Coeficientes de atividade da insulina suína em NaHCO_3 10 mM: (A) em função da pressão de CO_2 ; (B) em função do pH. Valores calculados pelo modelo com ajuste do fator k : (···) 5°C ; (---) 15°C ; (—) 25°C .

A maior solubilidade dos multímeros de insulina em relação ao monômero pode ser explicada pelo próprio processo de formação dos multímeros. A formação do dímero de insulina acontece pelo contato entre os resíduos hidrofóbicos da molécula. A interação entre estes resíduos promove uma aproximação entre duas moléculas do monômero, resultando numa blindagem de partes apolares das duas moléculas ao solvente. As sucessivas associações até a formação do hexâmero levam a uma progressiva dos resíduos apolares, resultando na formação de um hexâmero cuja superfície é quase que inteiramente polar (Blundell *et al.*, 1972). Esta superfície polar possui afinidade maior pelas moléculas de água do que o monômero isoladamente, o que somado ao fato de que os multímeros carregam carga global maior do que o monômero, resulta em um valor maior de solubilidade.

7. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho resultou nas seguintes conclusões:

1. O projeto e a construção do equipamento para a precipitação de proteínas, que preenche os requisitos técnicos e de segurança necessários à realização dos experimentos, foram bem sucedidos. Também houve sucesso no desenvolvimento de metodologias para a obtenção de dados de equilíbrio da insulina suína em soluções aquosas de NaHCO_3 sob atmosfera de CO_2 pressurizado. Demonstrou-se que o CO_2 é capaz de precipitar a insulina suína e que a solubilidade da proteína segue o mesmo perfil encontrado na precipitação isoelétrica com ácidos e bases convencionais.
2. O tampão de $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ é adequado para o controle de pH das soluções de insulina suína nas vizinhanças de seu ponto isoelétrico. Pela comparação do pH de equilíbrio de soluções de NaHCO_3 com e sem a insulina suína, conclui-se que esta proteína não apresenta um forte efeito tamponante em solução. Isto se deve possivelmente a baixa solubilidade e pequena quantidade de cadeias laterais ionizáveis em sua composição. Além disso, a insulina é uma proteína pequena, de baixa massa molecular em comparação a proteínas de maior efeito tamponante como a BSA e a HSA, e possui uma quantidade considerável de resíduos de caráter hidrofóbico. Este caráter hidrofóbico também se reflete na baixa solubilidade da molécula.
3. A insulina suína apresentou solubilidade retrógrada na solução aquosa de NaHCO_3 10 mM sob pressão de CO_2 até 16 bar, ou seja, a sua solubilidade aumentou com a diminuição da temperatura entre 25 e 5°C.

4. Pelos resultados dos ensaios de atividade biológica da insulina suína, conclui-se que o processo de precipitação isoelétrica com o CO_2 em soluções aquosas de NaHCO_3 não causa desnaturação à proteína. Contudo, é necessário evitar a rápida despressurização do sistema, principalmente nas pressões mais altas, pois a saída do CO_2 da fase líquida produz espuma, que é formada em maior ou menor quantidade em função da maior ou menor presença da proteína em solução e da velocidade com que o CO_2 sai da fase líquida.
5. Em relação à abordagem termodinâmica utilizada para a modelagem do equilíbrio de fases da proteína, foi possível incluir a proteína no modelo de eletrólitos de Pitzer (1973), considerando-a como um eletrólito. Por este modelo, verificou-se que a solubilidade da proteína é maior quando a proteína se afasta do ponto isoelétrico, adquirindo carga global positiva ou negativa. Apesar de o fenômeno ter sido qualitativamente descrito em outros trabalhos e por modelos empíricos, não haviam sido encontrados na literatura trabalhos que apresentassem um modelo termodinâmico quantitativo para a solubilidade das proteínas.
6. Observou-se que a solubilidade da insulina suína aumentou com o quadrado da carga global, seguindo o comportamento das forças de repulsão eletrostática descrito pela lei de Coulomb. Entretanto, foi necessário considerar as especificidades da molécula de insulina suína, que têm forte tendência a se auto-associar em multímeros. Assim, com apenas um parâmetro ajustável, foi possível modelar o equilíbrio de fases da proteína com a abordagem termodinâmica proposta.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros:

1. A extensão da abordagem termodinâmica utilizada para a descrição do comportamento de fases de outras proteínas em processos de precipitação isoelétrica, com eletrólitos voláteis e com eletrólitos convencionais.
2. Um aprofundamento do modelo termodinâmico para proteínas de maior solubilidade e com maior efeito tamponante em relação à insulina. Neste caso, sugere-se a consideração não apenas da molécula de proteína na equação do balanço de cargas em solução, mas as reações de cada um dos resíduos ionizáveis presentes na proteína. Pela abordagem utilizada neste trabalho, no ponto isoelétrico a proteína tem efeito nulo no balanço de cargas. Porém, cada um dos resíduos ionizáveis está em equilíbrio com os íons H^+ presentes em solução, o que afeta o pH de equilíbrio e a própria carga global da molécula de proteína.
3. A inclusão no modelo termodinâmico das interações hidrofóbicas entre as moléculas de proteínas e das pontes de hidrogênio formadas entre as moléculas de proteínas e entre as moléculas de solvente. A inclusão de interações com o solvente obrigaria também uma mudança do formalismo de McMillan-Mayer para o formalismo de Lewis e Randal, uma vez que no primeiro caso o solvente não é considerado como um componente do sistema, apenas como um meio contínuo.
4. O estudo da cristalização da insulina suína com o CO_2 . O estudo da formação, da distribuição de tamanhos e da estabilidade dos cristais de insulina obtidos pelo CO_2 poderá ter aplicação na formulação e em estudos de dosagem controlada deste fármaco.

Além disso, uma vez comprovada a eficácia da cristalização com o CO₂, pode-se comparar a viabilidade técnico-econômica deste processo em substituição aos processos convencionais de cristalização.

5. A utilização de um modelo cinético para a determinação do tamanho médio das partículas de precipitado. Para isto, poderia se descrever o sistema através de equações diferenciais e resolver simultaneamente a cinética de variação de pH, concentração de insulina suína na fase sobrenadante e crescimento das partículas de precipitado.
6. A utilização da amônia como agente volátil para a precipitação isoelétrica de proteínas com ponto isoelétrico na região alcalina.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, J. J., Crystalline insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 12, p. 132-136, 1926.
- ABRAMS, D. S., PRAUSNITZ, J. M., Statistical thermodynamics of liquid-mixtures - new expression for excess Gibbs energy of partly or completely miscible systems. *AIChE Journal*, v. 21, p. 116-128, 1975.
- ADAMS, M. J., BLUNDELL, T. L., DODSON, E. J., DODSON, G. G., VIJAYAN, M., BAKER, E. N., HARDING, M. M., HODKIN, D. C., RIMMER, B., SHEAT, S., Structure of rhombohedral 2 Zinc insulin crystals. *Nature*, v. 224, p. 491-495, 1969 (apud Goldman e Carpenter, 1974).
- AGENA, S. M., BOGLE, I. D. L., PESSOA, F. L. P., An activity coefficient model for proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55, p. 65-71, 1997.
- AGENA, S. M., PUSEY, M. L., BOGLE, I. D. L., Protein solubility modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64, p. 144-150, 1999.
- AKERLOF, G., Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures. *The Journal of the American Chemical Society*, v. 54, p. 4125-4139, 1932.
- ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S. N., Theory of protein solubility. *Methods in Enzymology*, v. 114, p. 49-77, 1985.
- ASHERIE, N., Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, v. 34, p. 266-272, 2004.

- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2^a ed., McGraw-Hill, New York, 984 p., 1986.
- BAKER, E. N., BLUNDELL, T. L., CUTFIELD, J. F., CUTFIELD, S. M., DODSON, E. J., DODSON, G. G., HODGKIN, D. M., HUBBARD, R. E., ISAACS, N. W., REYNOLDS, C. D., SAKABE, K., SAKABE, N., VIJAYAN, N. M., The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 319, p. 369-456, 1988.
- BAZARAA, M. S., SHERALI, H. D., SHETTY, C. M., *Nonlinear programming – theory and algorithms*, John Wiley & Sons, New York, 1993.
- BELL, D. J., HOARE, M., DUNNILL, P., The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. Em *Downstream Processing*, Fiechter, A., Springer-Verlag, Berlin, p. 1-59, 1983.
- BELTER, P. A., CUSSLER, E. L., HU, W. S., *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L., CLARKE, N. D., *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, 5^a Ed., New York, 2002.
- BERGERON, L., FILOBELO, L. F., GALKIN, O., VEKILOV, P. G., Thermodynamics of the hydrophobicity in crystallization of insulin. *Biophysical Journal*, v. 85, p. 3935-3942, 2003.
- BEUTIER, D., RENON, H., Representation of $\text{NH}_3\text{-H}_2\text{S-H}_2\text{O}$, $\text{NH}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ and $\text{NH}_3\text{-SO}_2\text{-H}_2\text{O}$ vapor-liquid equilibria. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, v. 17, p. 220-230, 1978.
- BERNARDO A., CALMANOVICI, C. E., MIRANDA, E. A., Induction time as an instrument to enhance comprehension of protein crystallization. *Crystal Growth & Design*, v. 4, p. 799-805, 2004.
- BIELING, V., RUMPF, B., STREPP, F., MAURER, G., An evolutionary optimization method for modeling the solubility of ammonia and carbon dioxide in aqueous solutions. *Fluid Phase Equilibria*, v. 53, p. 251-259, 1989.

- BIELING, V., KURZ, F., RUMPF, B., MAURER, G., Simultaneous solubility of ammonia and carbon dioxide in aqueous solutions of sodium sulfate in the temperature range 313-393 K and pressures up to 3 MPa. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 34, p. 1449-1460, 1995.
- BLUNDELL, T. L., CUTFIELD, J. F., CUTFIELD, S. M., DODSON, E. J., DODSON, G. G., HODGKIN, D. C., MERCOLA, D. A., VIJAYAN, M., Atomic positions in rhombohedral 2-Zinc insulin crystals. *Nature*, v. 231, p. 506-511, 1971.
- BLUNDELL, T., DODSON, G., HODGKIN, D., MERCOLA, D., Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. Em *Advances in Protein Chemistry*, Eds. ANFINSEN JR., C. B., EDSALL, J. T., RICHARDS, F. M., Academic Press, New York, p. 279-403, 1972.
- BONORA E., MANICARDI V., ZAVARONI I., COSCELLI C., BUTTURINI U., Relationships between insulin-secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose-intolerance. *Diabetes & Metabolism*, v. 13, p. 116-121, 1987.
- BRADLEY, D. J., PITZER, K. S., Dielectric properties of water and Debye-Hückel parameters to 350°C and 1 kbar. *Journal of Physical Chemistry*, v. 83, p. 1599-1603, 1979.
- BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAUFIN, G., Thermal isoelectric precipitation of α -lactalbumin from a whey protein concentrate: influence of protein-calcium complexation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 47, p. 121-130, 1995.
- BRAMAUD, C., AIMAR, P., DAUFIN, G., Whey protein fractionation: isoelectric precipitation of α -lactalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 56, p. 391-397, 1997.
- BRANDENBURG, D., Insulin – structure, function, design. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, v. 107, suppl. 2, 1999.
- BRELVI, S. W., O'CONNELL, J. P., Corresponding states correlations for liquid compressibility and partial molal volumes of gases at infinite dilution in liquids. *AIChE Journal*, v. 18, p. 1239-1243, 1972.

- BUTLER, J. A. V., The use of solubility as a criterion of purity of proteins: I. application of the phase rule to the solubility of proteins. II. the solubility curves and purity of chymotrypsinogen. *The Journal of General Physiology*, v. 24, p. 189-202, 1940.
- CHIEW, Y. C., KUEHNER, D., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Molecular Thermodynamics for Salt-Induced Protein Precipitation. *AIChE Journal*, v. 41, p. 2150-2159, 1995.
- CHOVE, B. E., GRANDISON, A. S., LEWIS, M. J., Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration. *Food Hydrocolloids*, v. 21, p. 1379-1388, 2007.
- COUTINHO, J. A. P., PESSOA, F. L. P., A modified UNIQUAC model for proteins. *Fluid Phase Equilibria*, v. 222-223, p. 127-133, 2004.
- CURTIS, R. A., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Calculation of phase diagrams for aqueous protein solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 105, p. 2445-2452, 2001.
- DOYLE, M. E., EGAN, J. M., Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacological Reviews*, v. 55, p. 105-131, 2003.
- DUNN, M. F., Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer – a review. *BioMetals*, v. 18, p. 295-303, 2005.
- EDSALL, J. T., GUTFREUND, H., *Biothermodynamics, the study of biochemical processes at equilibrium*, John Wiley & Sons, Chichester, 248 p., 1983.
- EDWARDS, T. J., NEWMAN, J., PRAUSNITZ, J. M., Thermodynamics of aqueous solutions containing volatile weak electrolytes. *AIChE Journal*, v. 21, p. 248-258, 1975.
- EDWARDS, T. J., MAURER, G., NEWMAN, J., PRAUSNITZ, J. M., Vapor-liquid equilibria in multicomponent aqueous solutions of volatile weak electrolytes. *AIChE Journal*, v. 24, p. 966-976, 1978.
- EKNOYAN, G., A history of diabetes mellitus – A disease of the kidneys that became a kidney disease. *Journal of Nephrology*, v. 19, supl. 10, p. 71-74, 2006.

- FEELING-TAYLOR, A. R., BANISH, R. M., HIRSCH, R. E., VEKILOV, P. G., Miniaturized scintillation technique for protein solubility determinations. *Review of Scientific Instruments*, v. 70, p. 2845-2849, 1999.
- FEHER, G., KAM, Z., Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays. *Methods in Enzymology*, v. 114, p. 77-112, 1985.
- FREDENSLUND A., GMEHLING J., MICHELSEN M. L., RASMUSSEN P., PRAUSNITZ J. M., Computerized design of multicomponent distillation-columns using UNIFAC group contribution method for calculation of activity-coefficients. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, v. 16, p. 450-462, 1977.
- FREDERICQ, E., NEURATH, H., The interaction of insulin with thiocyanate and other anions. The minimum molecular weight of insulin. *Journal of the American Chemical Society*, v. 72, p. 2684-2691, 1950.
- FREDERICQ, E., The association of insulin molecular units in aqueous solution, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 65, p. 218-228, 1956.
- GAO, J., ZHENG, D. Q., GUO, T. M., Solubilities of methane, nitrogen, carbon dioxide, and a natural gas mixture in aqueous sodium bicarbonate solutions under high pressure and elevated temperature. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 42, p. 69-73, 1997.
- GEHLE, D., SCHÜGERL, E., Protein recovery by continuous flotation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 133 – 138, 1984.
- GLATZ, C. E., Precipitation. Em *Separation Process in Biotechnology*, ASENJO J. A., Marcel Dekker, Berkeley, 801 p., 1990.
- GOLDMAN, J., CARPENTER, F., H., Zinc binding, circular dichroism, and equilibrium sedimentation studies on insulin (bovine) and several of its derivatives. *Biochemistry*, v. 13, p. 4566-4574, 1974.
- GOLUBOVIC, M., VAN HATEREN, S. H., OTTENS, M., WITKAMP, G. J., VAN DER WIELEN, L. A. M., Novel method for the production of pure glycinin from soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 5265-5269, 2005.

- GÖPPERT, U., MAURER, G., Vapor-liquid equilibria in aqueous solutions of ammonia and carbon dioxide at temperatures between 333 and 393 K and pressures up to 7 MPa. *Fluid Phase Equilibria*, v. 41, p. 153-185, 1988.
- GUGGENHEIN, E. A., The specific thermodynamic properties of aqueous solutions of strong electrolytes. *Philosophical Magazine*, v. 19, p. 588, 1935 (apud Pitzer, 1973).
- GURSKY, O., LI, Y., BADGER, J., CASPAR, D. L. D., Monovalent cation binding to cubic insulin crystals. *Biophysical Journal*, v. 61, p. 604-611, 1992.
- HAMILTON, W. C., Quadrupole moment of carbon dioxide. *The Journal of Chemical Physics*, v. 25, p. 1283, 1956.
- HARRIES, J. E., The quadrupole moment of CO₂, measured from the far infrared spectrum. *Journal of Physics B: Atomic and Molecular Physics*, v. 3, p. L150-L152, 1970.
- HARRIS, L. J., BIRCH, T. W., Zwitterions: I. Proof of the zwitterion constitution of the amino-acid molecule. II. Amino-acids, polypeptides, etc., and proteins as zwitterions, with instances of non-zwitterion ampholytes. *Biochemical Journal*, 24, p. 1080-1097, 1930.
- HARRISON, R. G., TODD, P., RUDGE, S. R., PETRIDES, D. P., *Bioseparations Science and Engineering*, Oxford University Press, New York, 432 p., 2003.
- HAYDEN, J. G., O'CONNELL, A generalized method for predicting second virial coefficients, *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, v. 14, p. 209-216, 1975.
- HEBERT, E. J., GRIMSLEY, G. R., HARTLEY, R. W., HORN, G., SCHELL, D., GARCIA, S., BOTH, V., SEVCIK, J., PACE, C. N., Purification of ribonucleases Sa, Sa2, and Sa3 after expression in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v. 11, p. 162-168, 1997.
- HELMERHORST, E., STOKES, G. B., Self-association of insulin: determinations based on a differential gel adsorption procedure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 245, p. 238-247, 1986.

- HELMERHORST, E., STOKES, G. B., Self-association of insulin: its pH dependence and effect of plasma. *Diabetes*, v. 36, p. 261-264, 1987.
- HOFLAND, G. W., VAN ES, M., VAN DER WIELEN, L. A. M., WITKAMP, G.-J., Isoelectric precipitation of casein using high-pressure CO₂. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 38, p. 4919-4927, 1999.
- HOFLAND, G. W., DE FIJKE, A., THIERING, R., VAN DER WIELEN, L. A. M., WITKAMP, G. J, Isoelectric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p. 357-368, 2000.
- HOFLAND, G., W., *Isoelectric precipitation of proteins using carbon dioxide as a volatile acid*. Delft: Technische Universiteit Delft, Holanda, 2001. 228 p. Tese de doutorado.
- HOFLAND, G. W., BERKHOFF, M., WITKAMP, G. J., VAN DER WIELEN. L. A. M., Dynamics of precipitation of casein with carbon dioxide. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 685-697, 2003.
- HUFFMAN, L. M., HARPER, J., Symposium: marketing dairy value through technology. Maximizing the value of milk through separation technologies. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2238-2244, 1999.
- ISHIMOTO, C. TANAKA, T., Critical behaviour of a binary mixture of protein and salt water. *Physical Review Letters*, v. 39, p. 474-477, 1977.
- JEFFREY, P. D., COATES, J. H., An equilibrium ultracentrifuge study of the self-association of bovine insulin. *Biochemistry*, v. 5, p. 489-498, 1966.
- JORDAN, P. J., LAY, K., NGAN, N., RODLEY, G. F., Casein Precipitation Using High Pressure Carbon Dioxide. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, v. 22, p. 247-256, 1987.
- KAARSHOLM, N. C., HAVELUNG, S., HOUGAARD, P., Ionization behavior of native and mutant insulins: pK perturbation of B13-Glu in aggregated species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 283, p. 496-502, 1990.

- KAMEI, D. T., WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN, D., Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems. *Langmuir*, v. 18, p. 3047-3057, 2002.
- KAMPS, A. P. S., SING, R., RUMPF, B., MAURER, G., Influence of NH_4Cl , NH_4NO_3 and NaNO_3 on the simultaneous solubility of ammonia and carbon dioxide in water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 45, p. 796-809, 2000.
- KAWAZUISHI, K., PRAUSNITZ, J. M., Correlation of vapor-liquid equilibria for the system ammonia-carbon dioxide-water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 26, p. 1482-1485, 1987.
- KIM, S. G., BAE, Y. C., Salt-induced protein precipitation in aqueous solution: single and binary protein systems. *Macromolecular Research*, v. 11, p. 53-61, 2003.
- KORSHID, N., HOSSAIN, M. M., FARID, M. M., Precipitation of food protein using high pressure carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 1214-1220, 2007.
- KOZINSKI, A. A. e LIGHTFOOT, E. N., Protein ultrafiltration: a general example of boundary layer filtration. *AIChE Journal*, v. 18, p. 1030-1040, 1972.
- KRICHEVSKY, I. R., KASARNOVSKY, J. S., Thermodynamical calculations of solubilities of nitrogen and hydrogen in water at high pressures. *Journal of the American Chemical Society*, v. 57, p. 2168-2171, 1935.
- KUEHNER, D. E., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Salt-induced protein precipitation: phase equilibria from an equation of state. *Fluid Phase Equilibria*, v. 116, p. 140-147, 1996.
- KURZ, F., RUMPF, B., MAURER G., Vapor-liquid-solid equilibria in the system $\text{NH}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ from around 310 to 470 K: new experimental data and modeling. *Fluid Phase Equilibria*, v. 104, p. 261-275, 1995.
- KURZ, F., RUMPF, B., SING, R., MAURER G., Vapor-liquid and vapor-liquid-solid equilibria in the system ammonia-carbon dioxide-sodium chloride-water at temperatures from 313 to 393 K and pressures up to 3 MPa. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 35, p. 3795-3802, 1996.

- LADISCH, M. R., *Bioseparations engineering*, John Wiley & Sons, New York, 760 p., 2001.
- LARSEN, B. L., RASMUSSEN, P., FREDENSLUND, A., A modified UNIFAC group-contribution model for prediction of phase-equilibria and heats of mixing. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 26, p. 2274-2286, 1987.
- LICHTFERS, U., *Spektroskopische Untersuchungen zur Ermittlung von Speziesverteilungen im System Ammoniak – Kohlendioxid – Wasser*. Kaiserslautern: Universität Kaiserslautern, 2000. 329 p. Tese de doutorado.
- LICHTFERS, U., RUMPF, B., Infrarotspektroskopische Untersuchungen zur Ermittlung von Spezieskonzentrationen in wässrigen Lösungen, die Ammoniak und Kohlendioxid enthalten. *Chemie Ingenieur Technik*, v. 72, p. 1526-1530, 2000.
- LIMA, L. H. F., Precipitação de lisozima e insulinas bovina e suína por "salting out" com o uso de eletrólitos voláteis. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, 2007. 87 p. Tese de mestrado.
- LUNDBAEK, K., Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *British Medical Journal*, p. 1507-1513, 1962.
- MAA, Y. F., HSU, C. C., Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54, p. 503-512, 1997
- MELANDER, W., HORVÁTH, C., Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 183, p. 200-215, 1977.
- MEYASSAMI, B., BALABAN, M. O., TEIXEIRA, A. A., Prediction of pH in model systems pressurized with carbon dioxide. *Biotechnology Progress*, 1992, v. 8, p. 149-154, 1992.
- MILLERO, F., HUANG, F., GRAHAN, T. PIERROT, D., The dissociation of carbonic acid in NaCl solutions as a function of concentration and temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 71, p. 46-55, 2007.

- MILTHORPE, B. K., NICHOL, L. W., JEFFREY, P. D., The polymerization pattern of zinc(II)-insulin at pH 7.0. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 495, p. 195-202, 1977.
- MURPHY, P. A., RESURRECCION, A. P., Varietal and environmental differences in soybean glycinin and β -conglycinin content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 32, p. 911-915, 1984.
- NANNEN, N. L., HUTKINS, R. W., Proton-translocating adenosine-triphosphatase activity in lactic-acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 747-751, 1991 (apud Spilimbergo *et al.*, 2005).
- NASH, A. M., KWOLEK, W. F., WOLF, W. J., Denaturation of soybean proteins by isoelectric precipitation. *Cereal Chemistry*, v. 48, p. 360-368, 1971.
- NELSON, C. D., GLATZ, C. E., Primary particle formation in protein precipitation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p. 1434-1444, 1985.
- NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E., *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, 2ª ed., Editora da Unicamp, Campinas, 401 p., 2002.
- NETTLETON, E. J., TITO, P., SUNDE, M., BOUCHARD, M., DOBSON, C. M., ROBINSON, C. V., Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry. *Biophysical Journal*, v. 79, p. 1053-1065, 2000.
- NINNI, L., MEIRELLES, A. J. A., Water activity, pH and density of aqueous amino acids solutions. *Biotechnology Progress*, v. 17, p. 703-711, 2001.
- NOZAKI, Y., TANFORD, C., Examination of titration behavior methods. *Methods in Enzymology*, v. 11, p. 715-734, 1967.
- O'DONOGHUE, S. I., CHANG, X., ABSEHER, R., NILGES, M., LED, J. J., Unraveling the symmetry ambiguity in a hexamer: calculation of the R6 human insulin structure. *Journal of Biomolecular NMR*, v. 16, p. 93-108, 2000.

- PACE, C. N., TREVIÑO, S., PRABHAKARAN, E., SCHOLTZ, J. M., Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 359, p. 1225-1235, 2004.
- PAULIKOWSKI, E. M., NEWMAN, J., PRAUSNITZ, J. M., Phase equilibria for aqueous solutions of ammonia and carbon dioxide. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, v. 21, p. 764-770, 1982.
- PESSÔA FILHO, P. A., *Equações de estado para compostos auto-associativos: modificação da equação de Redlich-Kwong-Soave por meio da abordagem química*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, 1998. 164 p. Tese de mestrado.
- PESSÔA FILHO, P. A., MOHAMED, R. S., A chemical theory based equation of state for self-associating compounds. *Thermochimica Acta*, v. 328, p. 65-71, 1999.
- PESSÔA FILHO, P. A., *Contribuições à modelagem do equilíbrio de fases e da partição de moléculas biológicas em sistemas aquosos bifásicos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, 2002. 404 p. Tese de doutorado.
- PEIPER, J. C., PITZER, K. S., Thermodynamics of aqueous carbonate solutions including mixtures of sodium carbonate, bicarbonate, and chloride. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 14, p. 613-638, 1982.
- PINHO, S. P., SILVA, C. M., MACEDO, E. A., Solubility of amino acids: a group contribution model involving phase and chemical equilibria. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 33, p. 1341-1347, 1994.
- PITZER, K. S., Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations. *Journal of Physical Chemistry*, v. 77, p. 268-277, 1973.
- PITZER, K. S., MAYORGA, G., Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. *Journal of Physical Chemistry*, v. 77, p. 2300-2308, 1973.
- PITZER, K. S., PEIPER, J. C., Activity coefficient of aqueous NaHCO_3 . *Journal of Physical Chemistry*, v. 84, p. 2396-2398, 1980.

- POCKER, Y., BISWAS, S. B., Self-association of insulin and the role of hydrophobic bonding: a thermodynamic model of insulin dimerization. *Biochemistry*, v. 20, p. 4354-4361, 1981.
- POPELLO, I. A., SUCHKOV, V. V., GRINBERG, V. Y., TOLSTOGUZOV, V. B., Liquid/liquid phase equilibrium in the globulin/salt/water systems – Legumin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 51, p. 345-353, 1991.
- POPELLO, I. A., SUCHKOV, V. V., GRINBERG, V. Y., TOLSTOGUZOV, V. B., Liquid/liquid phase equilibrium in the globulin/salt/water systems – Vicilin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 54, p. 239-244, 1991.
- PRADHAN, A. A., VERA, J. H., Effect of acids and bases on the solubility of amino acids. *Fluid Phase Equilibria*, v. 152, p. 121-132, 1998.
- PRAUSNITZ, J. M., LICHTENTHALER, R. N., AZEVEDO, E. G., *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*, 3rd ed., Prentice Hall, New Jersey, 1999.
- PRAUSNITZ, J. M., Molecular thermodynamics for some applications in biotechnology. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 35, p. 21-39, 2003.
- PRESS, W. H., FLANNERY, B. P., TEUKOLSKY, S. A., VETTERLING, W. T., *Numerical Recipes: The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, Cambridge, 818 p., 1986.
- PRZYBYCIEN, T. M., PUJAR, N. S., STEELE, L. M., Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 469-478, 2004.
- QI, X. M., YAO, S. J., GUAN, Y. X., Novel isoelectric precipitation of proteins in a pressurized carbon dioxide-water-ethanol system. *Biotechnology Progress*, v. 20, p. 1176-1182, 2004.
- RICHERT, S. H., Current milk protein manufacturing process. *Journal of Dairy Science*, v. 58, p. 985-993, 1975.
- ROMERO, M. F., BORON, W. F., Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annual Review of Physiology*, v. 61, p. 699-723, 1999.

- RUMPF, B., MAURER, G., An experimental and theoretical investigation on the solubility of carbon dioxide in aqueous solutions of strong electrolytes. *Berichte Busengesellschaft furPhysikalische Chemie*, v. 97, p. 85-97, 1993.
- RUMPF, B., MAURER, G., Solubility of carbon dioxide in aqueous solutions of ammonium chloride at temperatures from 313 K to 433 K and pressures up to 10 MPa. *Berichte Busengesellschaft furPhysikalische Chemie*, v. 98, p. 1077-1081, 1994.
- SAHARAY, M., BALASUBRAMANIAN, S., Enhanced molecular multipole moments and solvent structure in supercritical carbon dioxide. *ChemPhysChem*, v. 5, p. 1442-1445, 2004.
- SAHARAY, M., BALASUBRAMANIAN, S., Evolution of intermolecular structure and dynamics in supercritical carbon dioxide with pressure: an ab initio molecular dynamics study. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, p. 387-392, 2007.
- SALT, D. J., LESLIE, R. B., LILLFORD, P. J., DUNNILL, P., Factors influencing protein structure during acid precipitation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 14, p. 144-148, 1982.
- SARBAR, M., COVINGTON, A. K., NUTTALL, R. L., GOLDENBERG, R. N., The activity coefficients of aqueous sodium bicarbonate solutions. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 14, p. 967-976, 1982.
- SAUL, A., WAGNER, W., International equations for the saturation properties of ordinary water substance. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 16, p. 893-901, 1987.
- SCATCHARD, G., Concentrated solutions of strong electrolytes. *Chemical Reviews*, v. 19, p. 309-327, 1939 (apud Pitzer, 1973).
- SCHLICHTKRULL, J., Insulin crystals. I. The minimum mole-fraction of metal in insulin crystals prepared with Zn^{++} , Cd^{++} , Co^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} , or Fe^{++} . *Acta Chemica Scandinavica*, v. 10, p. 1455-1458, 1956. (apud Blundell et al., 1972).
- SCOTT, D. A., Crystalline insulin. *Biochemical Journal*, v. 28, p. 1592-1602, 1934 (apud Blundell et al., 1972).

- SHAEIWITZ, J. A., HENRY JR., J. D., Biochemical Separations. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-Interscience, 2002.
- SHAW, K. L., GRIMSLEY, G. R., YAKOVLEV, G. I., MAKAROV, A. A., PACE, C. N., The effect of net charge on the solubility activity, and stability of ribonuclease Sa. *Protein Science*, v. 10, p. 1206-1215, 2001.
- SHIH, Y. C., PRAUSNITZ, J. M., BLANCH, H. W., Some Characteristics of Protein Precipitation by Salts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, p. 1155-1164, 1992.
- SHOELSON, S. E., Insulin and other antidiabetic agents. Em *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, 2000.
- SILKENBÄUMER, D., RUMPF, B., LICHTENTHALER, R. N., Solubility of carbon dioxide in aqueous solutions of 2-amino-2-methyl-1-propanol and n-methyldiethanolamine and their mixtures in the temperature range from 313 to 353 K and pressures up to 2.7 MPa. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 37, p. 3133-3141, 1998.
- SMITH, A. K., CIRCLE, S. J., Peptization of soybean proteins. *Industrial & Engineering Chemistry*, v. 30, p. 1414-1418, 1938.
- SOUTHWARD, C. R., WALKER, N. J., The manufacture and industrial use of casein. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, v. 15, p. 201-217, 1980.
- SOUTHWARD, C. R., Manufacture and applications of edible casein products: I. Manufacture and properties. *Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, v. 20, p. 79-101, 1985.
- SPILIMBERGO, S., BERTUCCO, A., BASSO, G., BERTOLONI, G., Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO₂ treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 92, p. 447-451, 2005.
- STOLL, V. S., BLANCHARD, J. S., Guide to protein purification – Buffers: principles and practice. *Methods in Enzymology*, v. 182, p. 9-39, 1990.
- STRYER, L., *Biochemistry*, 4^a ed., W. H. Freeman and Company, New York, 1064 p., 1995.

- SURESH, S. J., NAIK, V. M., Theory of dielectric constant of aqueous solutions. *Journal of Chemical Physics*, v. 116, p. 4212-4219, 2002.
- TANFORD, C., *Physical chemistry of macromolecules*, Wiley, New York, 710 p., 1961.
- TANFORD, C., The interpretation of hydrogen ion titration curves of proteins. *Advances in Protein Chemistry*, v. 17, p. 69-165, 1962.
- TANFORD, C., ROXBY, R., Interpretation of protein titration curves. Application to lysozyme. *Biochemistry*, v. 11, p. 2192-2198, 1972.
- TARATUTA, V. G., HOLSCHBACH, A., THURSTON, G. M., BLANKSCHTEIN, D., BENEDEK, G. B., Liquid-liquid phase separation of aqueous lysozyme solutions: effects of pH and salt identity. *Journal of Physical Chemistry*, v. 94, p. 2140-2144, 1990.
- TAVARES, F. W., BRATKO, D., STRIOLO, A., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Phase behavior of aqueous solutions containing dipolar proteins from second-order perturbation theory. *Journal of Chemical Physics*, v. 120, p. 9859-9869, 2004.
- TAVARES, F. W., PRAUSNITZ, J. M., Analytic calculation of phase diagrams for solutions containing colloids or globular proteins. *Colloid and Polymer Science*, v. 282, p. 620-632, 2004.
- TESTER, J. W., MODELL, M., *Thermodynamics and its applications*, 3rd ed., Prentice Hall, New York, 960 p., 1996.
- THIERING, R., HOFLAND, G., FOSTER, N., WITKAMP, G.-J., VAN DER WIELEN, L., Fractionation of soybean proteins with pressurized carbon dioxide as a volatile electrolyte. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 73, p. 1-11, 2001a.
- THIERING, R., HOFLAND, G., FOSTER, N., WITKAMP, G.-J., VAN DER WIELEN, L., Carbon Dioxide Induced Soybean Protein Precipitation: Protein Fractionation, Particle Aggregation, and Continuous Operation. *Biotechnology Progress*, v. 17, p. 513-521, 2001b.

- THOMSON, J. A., SCHURTENBERGEN, P., THURSON, J. M., BENEDEK, G. B., Binary liquid phase separation and critical phenomena in protein/water solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 84, p. 7079-7083, 1987.
- TOMASULA, P. M., CRAIG JR., J. C., BOSWELL, R. T., COOK, R. T., KURANTZ, M. J., MAXWELL, M., Preparation of casein using carbon dioxide. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 506-514, 1995.
- TOMASULA, P. M., CRAIG JR., J. C., BOSWELL, R. T., A continuous process for casein production using high-pressure carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, v. 33, 405, 1997.
- TOMASULA, P. M., CRAIG JR., J. C., MCALOON, A. J., Economic analysis of a continuous casein process using carbon dioxide as precipitant. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 3331-3342, 1998.
- TOMBS, M. P., NEWSON, B. G., WILDING, P., Protein solubility: phase separation in arachin-salt-water system. *International Journal of Peptide and Protein Research*, v. 6, p. 253-277, 1974.
- VAN MEGEN, W. H., Solubility behavior of soybean globulins as a function of pH and ionic strength. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 22, p. 126-129, 1974.
- VEKILOV, P. G., FEELING-TAYLOR, A. R., YAU, S. T., PETSEV, D., Solvent entropy contribution to the free energy of protein crystallization. *Acta Crystallographica D*, v. 58, p. 1611-1616, 2002.
- VLIJMEN, H. W. T., SCHAEFER, M., KARPLUS, M., Improving the accuracy of protein pK_a calculations: conformational averaging versus the average structure. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, v. 33, p. 145-158, 1998.
- VOET, D., VOET, J. G., *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1990.
- XIA J., RUMPF B., MAURER G., Solubility of carbon dioxide in aqueous solutions containing sodium acetate or ammonium acetate at temperatures from 313 to 433 K and pressures up to 10 MPa. *Fluid Phase Equilibria*, v. 155, p. 107-125, 1999.

- XIA J., RUMPF B., MAURER G., Corrigendum to “Solubility of carbon dioxide in aqueous solutions containing sodium acetate or ammonium acetate at temperatures from 313 to 433 K and pressures up to 10 Mpa” (*Fluid Phase Equilibria*, v. 155, p. 107, 1999). *Fluid Phase Equilibria*, v. 168, p. 283-284, 2000.
- WALSH, G., HEADON, D. R., *Protein Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester, 371 p., 1994.
- WALSTRA, P., JENNESS, R., *Dairy chemistry and physics*, Marcel Dekker, New York, 1984 (apud Hofland *et al.*, 1999).
- WATANABE, E. O., PESSÔA FILHO, P. A., MIRANDA, E. A., MOHAMED, R. S., Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 124-129, 2006.
- WHEELWRIGHT, S. M., *Designing Downstream Process for Large-Scale Protein Purification. Bio-Technology*, v. 5, p. 789-793, 1987.
- WHEELWRIGHT, S. M., *Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing*, John Wiley & Sons, New York, 228 p., 1991.
- WINTERS, M. A., FRANKEL, D. Z., DEBENEDETTI, P. G., CAREY, J., DEVANEY, M., PRZYBYCIEN, T., M., Protein purification with vapor-phase carbon dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 62, p. 247-258, 1999.
- WINTERSTEIN, O., ABRAMSON, H. A., The isoelectric point of insulin – electrical properties of adsorbed and crystalline insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 99, p. 741-753, 1933.
- WONG, C. S., TISHCHENKO, P. Y., JOHNSON, W. K., Solubility of carbon dioxide in aqueous HCl and NaHCO₃ solutions from 278 to 298 K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 50, p. 817-821, 2005.
- YANG, A. S., GUNNER, M. R., SAMPOGNA, R., SHARP, K., HONIG, B., On the calculation of pK_a s in proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 15, p. 252-265, 1993.

YAO, S. J., GUAN, Y. X., HE, W. Z., QI, X. M., ZHU, Z. Q., Activities of several enzymes in ethanol + water at elevated pressure of carbon dioxide. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 49, p. 1333-1339, 2004.

ZUO, Y. X., GUO, T. M. Extension of the Patel-Teja equation of state to the prediction of the solubility of natural gas in formation water. *Chemical Engineering Science*, v. 46, p. 3251-3258, 1991.

APÊNDICE A – CORRELAÇÕES

A.1. Constante de Henry

A dependência da temperatura do termo $H_i^{(P^s)}$ foi calculada pela equação semiempírica A.1 (Edwards *et al.*, 1978). As constantes da equação são listadas na Tabela A.1:

$$\ln H_i^{(P^s)} = \frac{B_1}{T} + B_2 \ln T + B_3 T + B_4 \quad (\text{A.1})$$

Tabela A.1 – Constantes da equação empírica para o cálculo de $H_{CO_2}^{(P^s)}$ para o CO₂ em água entre 273 e 523 K.

| $H_{CO_2}^{(P^s)}$ | B_1 | B_2 | B_3 | B_4 | T |
|--------------------|----------|----------|-----------|---------|-----|
| kg.atm/mol | -6789,04 | -11,4519 | -0,010454 | 94,4914 | K |

A.2. Pressão de saturação da água

A pressão de saturação da água, P^s , foi calculada pela equação de Saul e Wagner (1987):

$$\ln \frac{P^s}{P_C} = \frac{T_C}{T} (a_1 \theta + a_2 \theta^{1.5} + a_3 \theta^3 + a_4 \theta^{3.5} + a_5 \theta^4 + a_6 \theta^{7.5}) \quad (\text{A.2})$$

em que:

$$\theta = 1 - \frac{T}{T_C} \quad (\text{A.3})$$

Tabela A.2 – Constantes da equação de Saul e Wagner (1987) para o cálculo da pressão de saturação da água.

| T_c | P_c | a_1 | a_2 | a_3 | a_4 | a_5 | a_6 |
|-------------|---------------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| 647,14 K | 220,64 bar | -7,85823 | 1,83991 | -11,7811 | 22,6705 | -15,9393 | 1,77516 |

A.3. Densidade da água

A densidade da água, ρ_s , foi calculada pela equação de Saul e Wagner (1987):

$$\frac{\rho_s}{\rho_c} = 1 + b_1\theta^{1/3} + b_2\theta^{2/3} + b_3\theta^{5/3} + b_4\theta^{16/3} + b_5\theta^{43/3} + b_6\theta^{110/3} \quad (\text{A.4})$$

Tabela A.3 – Constantes da equação de Saul e Wagner (1987) para o cálculo da densidade da água.

| ρ_c | b_1 | b_2 | b_3 | b_4 | b_5 | b_6 |
|-------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|-----------|
| 322,0 kg/m ³ | 1,99206 | 1,10123 | -0,51251 | -1,75263 | -45,4485 | -675615,0 |

A.4. Constante dielétrica da água

A constante dielétrica relativa da água pela equação de Bradley e Pitzer (1979) é:

$$\varepsilon_w = U_1 \exp(U_2 T + U_3 T^2) + C \ln\left(\frac{B + P}{B + 1000}\right) \quad (\text{A.5})$$

$$B = U_7 + \frac{U_8}{T} + U_9 T \quad (\text{A.6})$$

$$C = U_4 + \frac{U_5}{U_6 + T} \quad (\text{A.7})$$

sendo P dada em bar e T em K.

Tabela A.4 – Constantes da equação de Bradley e Pitzer (1979).

| | | | |
|-------|-------------------|-------|----------------|
| U_1 | $3,4279.10^2$ | U_6 | $-1,8289.10^2$ |
| U_2 | $-5,0866.10^{-3}$ | U_7 | $-8,0325.10^3$ |
| U_3 | $9,4690.10^{-7}$ | U_8 | $4,2142.10^6$ |
| U_4 | $-2,0525$ | U_9 | $2,1417$ |
| U_5 | $3,1159.10^3$ | | |

A.5. Constantes de dissociação

As constantes de dissociação são calculadas pela relação empírica A.2 (Edwards *et al.*, 1978). Os parâmetros da equação para K_1 a K_3 são listados na Tabela A.5:

$$\ln K_i = \frac{A_1}{T} + A_2 \ln T + A_3 T + A_4 \quad (\text{A.8})$$



Tabela A.5 – Parâmetros da equação empírica para o cálculo das constantes de dissociação.

| | A_1 | A_2 | A_3 | A_4 | Faixa de T |
|-------|------------|---------|------------------|---------|--------------------------|
| K_1 | -7726,010 | -14,506 | $-2,798.10^{-2}$ | 102,276 | 273 – 498 K ^a |
| K_2 | -9137,258 | -18,112 | $-2,246.10^{-2}$ | 116,737 | 273 – 498 K ^a |
| K_3 | -13445,900 | -22,477 | 0 | 140,932 | 273 – 498 K ^b |

a. Kawazuishi e Prausnitz (1987).

b. Edwards *et al.* (1978).

A.6. Volume molar parcial do CO₂ em água à diluição infinita

O volume molar parcial do CO₂ em água à diluição infinita foi obtido a partir dos valores calculados por Edwards *et al.* (1978) entre 0 e 50°C, que utilizaram a correlação de Brelvi e O'Connell (1972). Os valores estão na Tabela A.6.

Tabela A.6 – Volume molar parcial do CO₂.

| T (°C) | $\bar{v}_{CO_2}^\infty$ (cm ³ /mol) |
|--------|--|
| 0 | 32,4 |
| 50 | 34,0 |

Fazendo-se uma aproximação de variação linear do volume molar parcial entre 0 e 50°C, chega-se à expressão A.6 (nesta expressão, utiliza-se a temperatura em K):

$$\bar{v}_{CO_2}^\infty = 23,6592 + 0,032 \cdot T \quad (\text{A.12})$$

A.7. Segundo coeficiente do virial para o CO₂ puro

O segundo coeficiente do virial do CO₂ puro foi obtido de Rumpf e Maurer (1993):

$$B_{CO_2} = 65,70 - 184,9 \cdot \left(\frac{304,16}{T} \right)^{1,4} \quad (\text{A.13})$$

APÊNDICE B – PARÂMETROS DE INTERAÇÃO DO MODELO DE PITZER

B.1. CO₂ – HCO₃⁻

O parâmetro $\beta_{CO_2, HCO_3^-}^0$ foi obtido de Kurz *et al.* (1995). A dependência da temperatura é dada pela relação B.1, válida para a faixa de temperatura de 313,15 a 473,15 K:

$$\beta_{CO_2, HCO_3^-}^0 = 0,0843 - \frac{16,148}{T} \quad (B.1)$$

B.2. NaHCO₃

Os parâmetros de interação do sal NaHCO₃ são calculados pela equação B.2 (Xia *et al.* 1999, 2000):

$$\beta_{NaHCO_3}^i = q_1 + q_2(T - T_R) + q_3(T - T_R)^2 \quad (B.2)$$

Tabela B.1 – Constantes da equação para o cálculo dos parâmetros do NaHCO₃.

| Parâmetro | q_1 | q_2 (x 10 ³) | q_3 (x 10 ⁵) | T_R (K) |
|-----------|---------|----------------------------|----------------------------|-----------|
| β^0 | 0,00389 | 0,058 | 0,15 | 298,15 |
| β^1 | 0,0401 | 0,298 | 1,94 | 298,15 |

APÊNDICE C – CÁLCULO DA CARGA GLOBAL DA MOLÉCULA DE PROTEÍNA

Proteínas são moléculas relativamente grandes, composta de aminoácidos ligados em cadeias lineares por ligações peptídicas. Parte destes aminoácidos possui grupos laterais ionizáveis, com constantes de ionização características. A presença destes grupos faz com que a proteína em solução possua carga global, função do pH do meio, que pode ser calculada pela equação de Henderson-Hasselbalch (Stryer, 1995). Os aminoácidos ácido glutâmico, ácido aspártico e o aminoácido C-terminal, quando se dissociam, tornam-se negativamente carregados de acordo com a seguinte reação química:



em que HA e A⁻ representam o aminoácido em suas forma neutra e dissociada, respectivamente. A constante de dissociação, desconsiderando-se o coeficiente de atividade, é dada por:

$$K_a = \frac{a_{\text{H}^+} a_{\text{A}^-}}{a_{\text{HA}}} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (\text{C.2})$$

Aplicando-se o logaritmo na base 10 em ambos os lados da equação 27, chega-se à equação de Henderson-Hasselbalch (Stryer, 1995):

$$pK_a = pH - \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (\text{C.3})$$

em que pK_a e pH equivalem à $-\log [K_a]$ e $-\log [\text{H}^+]$, respectivamente. A concentração total do aminoácido, A^T , é a soma das formas neutra e dissociada e, a concentração total de cada aminoácido, considerados individualmente, equivale à concentração total de proteína (P):

$$[A^T] = [\text{HA}] + [\text{A}^-] \quad (\text{C.4})$$

$$[P] = [A^T] \quad (\text{C.5})$$

Denominando-se α a relação entre aminoácido dissociado/aminoácido total, chega-se à proporção de carga por aminoácido total, ou seja, a carga elétrica por unidade de aminoácido total ou por molécula de proteína:

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^T]} = \frac{[A^-]}{[P]} \quad (C.6)$$

Substituindo-se as equações 29 e 31 em 28 e aplicando-se o inverso do logaritmo, obtém-se:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK_a}}{1+10^{pH-pK_a}} \quad (C.7)$$

Para os aminoácidos histidina, lisina, arginina e o N-terminal, cuja forma protonada é positivamente carregada, estabelece-se o seguinte equilíbrio químico:



E este equilíbrio é caracterizado pela constante de dissociação:

$$K_a = \frac{a_{H^+} a_A}{a_{AH^+}} = \frac{[H^+][A]}{[AH^+]} \quad (C.9)$$

Denominando-se α' a relação entre a forma protonada (positivamente carregada) e a concentração total do aminoácido e aplicando-se a mesma metodologia utilizada para os aminoácidos de carga negativa, chega-se à seguinte relação:

$$\alpha' = \frac{1}{1+10^{pH-pK_a}} \quad (C.10)$$

Somando-se as contribuições de todos os aminoácidos ionizáveis, chega-se a carga total por molécula de proteína.

APÊNDICE D – CONSTANTES FUNDAMENTAIS

Tabela D.1 – Valores das constantes utilizadas neste trabalho.

| Constante | Definição | Valor | Unidade |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| ε_0 | Permissividade no vácuo | $8,85419 \cdot 10^{-12}$ | $C^2 N^{-1} m^{-2}$ |
| e | Carga de um elétron | $1,60218 \cdot 10^{-19}$ | C |
| k_B | Constante de Boltzmann | $1,38066 \cdot 10^{-23}$ | $J K^{-1}$ |
| N_A | Número de Avogadro | $6,02205 \cdot 10^{23}$ | mol^{-1} |
| R | Constante universal dos gases | 83,14472 | $bar\ cm^3\ mol^{-1}\ K^{-1}$ |

APÊNDICE E – DADOS EXPERIMENTAIS DOS ESTUDOS CINÉTICOS

Tabela E.1 – Dados experimentais, valores dos parâmetros da função de decaimento exponencial de segunda ordem ajustados aos dados cinéticos de pH das soluções de insulina suína e o tempo necessário para que a variação de pH fosse $< 0,01$ ($t_{0,01}$). Soluções de insulina suína em NaHCO_3 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm e variadas condições de pressão de CO_2 .

| P^* (bar) | C_{IS}^i * (mg/mL) | pH^i * | pH^f * | pH_0 | A_1 | t_1 (h) | A_2 | t_2 (h) | $t_{0,01}$ (h) | R^2 |
|----------------|-------------------------|-----------------|-----------------|---------------|-------|-----------|-------|-----------|-------------------|--------|
| 1,0 | 0,84 | 7,77 | 5,68 | 5,66 | 1,53 | 0,14 | 0,58 | 1,44 | 6,0 | 0,9975 |
| 1,0 | 0,96 | 7,91 | 5,73 | 5,72 | 0,59 | 1,66 | 1,13 | 0,08 | 6,9 | 0,9955 |
| 2,0 | 0,52 | 8,44 | 5,40 | 5,40 | 0,58 | 1,91 | 0,41 | 0,53 | 7,9 | 0,9993 |
| 2,0 | 0,85 | 7,82 | 5,36 | 5,35 | 0,75 | 2,20 | 0,70 | 0,15 | 9,6 | 0,9981 |
| 3,0 | 0,80 | 8,27 | 5,23 | 5,23 | 0,87 | 1,12 | 1,00 | 0,12 | 5,1 | 0,9996 |
| 3,0 | 0,94 | 7,83 | 5,26 | 5,26 | 0,71 | 1,93 | 0,83 | 0,17 | 8,4 | 0,9990 |
| 5,0 | 0,85 | 7,82 | 5,06 | 5,05 | 0,82 | 1,05 | 0,85 | 0,14 | 4,7 | 0,9994 |
| 5,0 | 0,87 | 7,66 | 5,02 | 5,02 | 0,77 | 0,91 | 1,06 | 0,12 | 4,0 | 0,9994 |
| 5,0 | 0,87 | 7,75 | 5,04 | 5,03 | 0,69 | 0,39 | 0,85 | 0,07 | 1,7 | 0,9994 |
| 9,0 | 0,79 | 7,91 | 4,82 | 4,83 | 0,74 | 0,92 | 1,33 | 0,11 | 4,0 | 0,9997 |
| 9,0 | 0,91 | 7,83 | 4,83 | 4,83 | 0,67 | 0,96 | 1,78 | 0,10 | 4,1 | 0,9995 |
| 16,0 | 1,27 | 7,71 | 4,63 | 4,63 | 0,48 | 1,41 | 2,16 | 0,11 | 5,6 | 0,9986 |

* Valores experimentais:

C_{IS}^i é a concentração inicial de insulina suína.

pH^i é o pH inicial da solução

pH^f é o pH final da solução

Tabela E.2 – Dados experimentais, valores dos parâmetros da função de decaimento exponencial de segunda ordem ajustados aos dados cinéticos de pH das soluções de insulina suína e o tempo necessário para que a variação de pH fosse $< 0,01$ ($t_{0,01}$). Soluções de insulina suína em NaHCO_3 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm e variadas condições de pressão de CO_2 .

| P^* (bar) | C_{IS}^i * (mg/mL) | C_{IS}^f * (mg/mL) | C_{IS_0} (mg/mL) | A_1 | t_1 (h) | $t_{0,001}$ (h) | R^2 |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------|-----------|-----------------|--------|
| 1,0 | 0,84 | 0,29 | 0,27 | 0,57 | 0,94 | 6,7 | 0,9864 |
| 1,0 | 0,96 | 0,27 | 0,27 | 0,70 | 2,16 | 15,7 | 0,9947 |
| 2,0 | 0,52 | 0,11 | 0,10 | 0,42 | 1,09 | 7,4 | 0,9987 |
| 2,0 | 0,85 | 0,17 | 0,16 | 0,69 | 0,90 | 6,5 | 0,9989 |
| 3,0 | 0,80 | 0,17 | 0,16 | 0,64 | 0,40 | 2,9 | 0,9838 |
| 3,0 | 0,94 | 0,13 | 0,12 | 0,81 | 0,64 | 4,8 | 0,9970 |
| 5,0 | 0,85 | 0,17 | 0,17 | 0,68 | 0,57 | 4,2 | 0,9968 |
| 5,0 | 0,87 | 0,17 | 0,17 | 0,70 | 0,53 | 3,9 | 0,9946 |
| 5,0 | 0,87 | 0,19 | 0,19 | 0,69 | 0,77 | 5,6 | 0,9992 |
| 9,0 | 0,79 | 0,26 | 0,26 | 0,53 | 0,48 | 3,4 | 0,9886 |
| 9,0 | 0,91 | 0,25 | 0,25 | 0,67 | 0,53 | 3,8 | 0,9955 |
| 16,0 | 1,27 | 0,54 | 0,51 | 0,74 | 0,87 | 6,4 | 0,9241 |

* Valores experimentais:

C_{IS}^i é a concentração inicial de insulina suína.

C_{IS}^f é a concentração final de insulina suína.

APÊNDICE F – DADOS EXPERIMENTAIS DOS ESTUDOS DE EQUILÍBRIO

Tabela F.1 – Dados experimentais de pressão, concentrações iniciais e de equilíbrio de insulina suína e pH de equilíbrio em soluções de NaHCO₃ 10 mM a 5°C sob agitação de 480 rpm.

| <i>P</i> (bar) | C_{IS}^i (mg/mL) | C_{IS}^{eq} (mg/mL) | C_{IS}^i (mol/kg) | C_{IS}^{eq} (mol/kg) | pH ^{eq} |
|----------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------|
| 1,0 | 0,9672 | 0,3342 | $1,674 \cdot 10^{-4}$ | $5,786 \cdot 10^{-5}$ | 5,53 |
| 1,0 | 0,9469 | 0,3922 | $1,639 \cdot 10^{-4}$ | $6,788 \cdot 10^{-5}$ | 5,56 |
| 1,6 | 0,9169 | 0,2771 | $1,587 \cdot 10^{-4}$ | $4,797 \cdot 10^{-5}$ | 5,37 |
| 1,6 | 0,9761 | 0,1961 | $1,690 \cdot 10^{-4}$ | $3,394 \cdot 10^{-5}$ | 5,29 |
| 2,0 | 0,9672 | 0,4130 | $1,674 \cdot 10^{-4}$ | $7,149 \cdot 10^{-5}$ | 5,24 |
| 2,0 | 0,7866 | 0,4477 | $1,362 \cdot 10^{-4}$ | $7,750 \cdot 10^{-5}$ | 5,22 |
| 2,4 | 0,9761 | 0,2387 | $1,690 \cdot 10^{-4}$ | $4,133 \cdot 10^{-5}$ | 5,12 |
| 2,6 | 0,9409 | 0,2153 | $1,629 \cdot 10^{-4}$ | $3,728 \cdot 10^{-5}$ | 5,18 |
| 2,8 | 0,9721 | 0,2291 | $1,683 \cdot 10^{-4}$ | $3,966 \cdot 10^{-5}$ | 5,20 |
| 3,5 | 0,9820 | 0,2984 | $1,700 \cdot 10^{-4}$ | $5,166 \cdot 10^{-5}$ | 5,10 |
| 4,6 | 0,9820 | 0,4375 | $1,700 \cdot 10^{-4}$ | $7,573 \cdot 10^{-5}$ | 4,98 |
| 5,0 | 0,8772 | 0,3780 | $1,518 \cdot 10^{-4}$ | $6,544 \cdot 10^{-5}$ | 4,89 |
| 5,0 | 0,9409 | 0,3574 | $1,629 \cdot 10^{-4}$ | $6,187 \cdot 10^{-5}$ | 4,97 |
| 5,2 | 0,9761 | 0,4586 | $1,690 \cdot 10^{-4}$ | $7,939 \cdot 10^{-5}$ | 4,83 |
| 6,6 | 0,9761 | 0,5972 | $1,690 \cdot 10^{-4}$ | $1,034 \cdot 10^{-4}$ | 4,77 |
| 7,3 | 0,9409 | 0,5742 | $1,629 \cdot 10^{-4}$ | $9,940 \cdot 10^{-5}$ | 4,81 |
| 8,5 | 2,3322 | 0,9783 | $4,037 \cdot 10^{-4}$ | $1,693 \cdot 10^{-4}$ | 4,79 |

Tabela F.1 – Continuação.

| <i>P</i> (bar) | C_{IS}^i (mg/mL) | C_{IS}^{eq} (mg/mL) | C_{IS}^i (mol/kg) | C_{IS}^{eq} (mol/kg) | pH^{eq} |
|-----------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|--|------------------------|
| 9,0 | 0,9469 | 1,0883 | $1,639 \cdot 10^{-4}$ | $1,884 \cdot 10^{-4}$ | 4,69 |
| 9,1 | 1,8801 | 0,9880 | $3,254 \cdot 10^{-4}$ | $1,710 \cdot 10^{-4}$ | 4,52 |
| 9,5 | 1,2649 | 0,8359 | $2,190 \cdot 10^{-4}$ | $1,447 \cdot 10^{-4}$ | 4,73 |
| 11,8 | 1,8619 | 0,8256 | $3,223 \cdot 10^{-4}$ | $1,429 \cdot 10^{-4}$ | 4,53 |
| 11,9 | 2,3322 | 1,4004 | $4,037 \cdot 10^{-4}$ | $2,424 \cdot 10^{-4}$ | 4,68 |
| 16,2 | 1,8619 | 1,0870 | $3,223 \cdot 10^{-4}$ | $1,882 \cdot 10^{-4}$ | 4,45 |
| 16,0 | 2,3322 | 1,8841 | $4,037 \cdot 10^{-4}$ | $3,261 \cdot 10^{-4}$ | 4,59 |

Tabela F.2 – Dados experimentais de pressão, concentrações iniciais e de equilíbrio de insulina suína e pH de equilíbrio em soluções de NaHCO₃ 10 mM a 15°C sob agitação de 480 rpm.

| <i>P</i> (bar) | C_{IS}^i (mg/mL) | C_{IS}^{eq} (mg/mL) | C_{IS}^i (mol/kg) | C_{IS}^{eq} (mol/kg) | pH^{eq} |
|-----------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|--|------------------------|
| 1,0 | 0,9552 | 0,3059 | $1,653 \cdot 10^{-4}$ | $5,296 \cdot 10^{-5}$ | 5,53 |
| 1,0 | 0,9342 | 0,2250 | $1,617 \cdot 10^{-4}$ | $3,894 \cdot 10^{-5}$ | 5,51 |
| 1,4 | 0,9618 | 0,2918 | $1,665 \cdot 10^{-4}$ | $5,051 \cdot 10^{-5}$ | 5,36 |
| 1,5 | 1,5033 | 0,1823 | $2,602 \cdot 10^{-4}$ | $3,156 \cdot 10^{-5}$ | 5,39 |
| 2,0 | 0,9618 | 0,2908 | $1,665 \cdot 10^{-4}$ | $5,034 \cdot 10^{-5}$ | 5,27 |
| 2,0 | 0,9342 | 0,2144 | $1,617 \cdot 10^{-4}$ | $3,711 \cdot 10^{-5}$ | 5,22 |
| 3,1 | 0,9552 | 0,4067 | $1,653 \cdot 10^{-4}$ | $7,040 \cdot 10^{-5}$ | 5,09 |
| 3,2 | 0,9417 | 0,3734 | $1,630 \cdot 10^{-4}$ | $6,463 \cdot 10^{-5}$ | 5,03 |
| 5,0 | 0,9618 | 0,5330 | $1,665 \cdot 10^{-4}$ | $9,227 \cdot 10^{-5}$ | 4,92 |
| 5,0 | 0,9417 | 0,6321 | $1,630 \cdot 10^{-4}$ | $1,094 \cdot 10^{-4}$ | 4,91 |

Tabela F.2 – Continuação.

| <i>P</i> (bar) | C_{IS}^i (mg/mL) | C_{IS}^{eq} (mg/mL) | C_{IS}^i (mol/kg) | C_{IS}^{eq} (mol/kg) | pH^{eq} |
|-----------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|--|------------------------|
| 7,0 | 0,9618 | 0,6070 | $1,665 \cdot 10^{-4}$ | $1,051 \cdot 10^{-4}$ | 4,74 |
| 7,1 | 0,9342 | 0,4518 | $1,617 \cdot 10^{-4}$ | $7,820 \cdot 10^{-5}$ | 4,75 |
| 9,2 | 0,9417 | 0,8373 | $1,630 \cdot 10^{-4}$ | $1,449 \cdot 10^{-4}$ | 4,69 |
| 9,0 | 0,9342 | 0,5451 | $1,617 \cdot 10^{-4}$ | $9,436 \cdot 10^{-5}$ | 4,68 |
| 8,7 | 1,4887 | 0,5245 | $2,577 \cdot 10^{-4}$ | $9,078 \cdot 10^{-5}$ | 4,64 |
| 12,0 | 0,9618 | 0,9212 | $1,665 \cdot 10^{-4}$ | $1,595 \cdot 10^{-4}$ | 4,64 |
| 11,9 | 1,5033 | 0,7573 | $2,602 \cdot 10^{-4}$ | $1,311 \cdot 10^{-4}$ | 4,59 |
| 15,9 | 1,5033 | 1,1065 | $2,602 \cdot 10^{-4}$ | $1,915 \cdot 10^{-4}$ | 4,51 |
| 15,7 | 1,4887 | 1,0847 | $2,577 \cdot 10^{-4}$ | $1,878 \cdot 10^{-4}$ | 4,48 |

Tabela F.3 – Dados experimentais de pressão, concentrações iniciais e de equilíbrio de insulina suína e pH de equilíbrio em soluções de NaHCO₃ 10 mM a 25°C sob agitação de 480 rpm.

| <i>P</i> (bar) | C_{IS}^i (mg/mL) | C_{IS}^{eq} (mg/mL) | C_{IS}^i (mol/kg) | C_{IS}^{eq} (mol/kg) | pH^{eq} |
|-----------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|--|------------------------|
| 1,0 | 0,8363 | 0,2890 | $1,448 \cdot 10^{-4}$ | $5,003 \cdot 10^{-5}$ | 5,68 |
| 1,0 | 0,9595 | 0,2662 | $1,661 \cdot 10^{-4}$ | $4,608 \cdot 10^{-5}$ | 5,73 |
| 1,0 | 0,6065 | 0,3187 | $1,050 \cdot 10^{-4}$ | $5,516 \cdot 10^{-5}$ | 5,71 |
| 1,5 | 0,8404 | 0,1523 | $1,455 \cdot 10^{-4}$ | $2,636 \cdot 10^{-5}$ | 5,54 |
| 2,0 | 0,5193 | 0,1051 | $8,989 \cdot 10^{-5}$ | $1,818 \cdot 10^{-5}$ | 5,40 |
| 2,0 | 0,8516 | 0,1672 | $1,474 \cdot 10^{-4}$ | $2,894 \cdot 10^{-5}$ | 5,36 |
| 2,0 | 0,8404 | 0,1181 | $1,455 \cdot 10^{-4}$ | $2,044 \cdot 10^{-5}$ | 5,39 |
| 3,0 | 0,7970 | 0,1667 | $1,380 \cdot 10^{-4}$ | $2,885 \cdot 10^{-5}$ | 5,23 |

Tabela F.3 – Continuação.

| <i>P</i> (bar) | C_{IS}^i (mg/mL) | C_{IS}^{eq} (mg/mL) | C_{IS}^i (mol/kg) | C_{IS}^{eq} (mol/kg) | pH^{eq} |
|-----------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|--|------------------------|
| 3,0 | 0,9369 | 0,1289 | $1,622 \cdot 10^{-4}$ | $2,232 \cdot 10^{-5}$ | 5,26 |
| 5,0 | 0,8688 | 0,1687 | $1,504 \cdot 10^{-4}$ | $2,920 \cdot 10^{-5}$ | 5,02 |
| 5,0 | 0,8706 | 0,1905 | $1,507 \cdot 10^{-4}$ | $3,298 \cdot 10^{-5}$ | 5,04 |
| 5,0 | 0,8452 | 0,1736 | $1,463 \cdot 10^{-4}$ | $3,005 \cdot 10^{-5}$ | 5,06 |
| 9,0 | 0,7908 | 0,2610 | $1,369 \cdot 10^{-4}$ | $4,517 \cdot 10^{-5}$ | 4,82 |
| 9,0 | 0,9099 | 0,2456 | $1,575 \cdot 10^{-4}$ | $4,252 \cdot 10^{-5}$ | 4,83 |
| 12,0 | 0,8404 | 0,3225 | $1,455 \cdot 10^{-4}$ | $5,582 \cdot 10^{-5}$ | 4,69 |
| 16,0 | 1,2712 | 0,5413 | $2,200 \cdot 10^{-4}$ | $9,370 \cdot 10^{-5}$ | 4,63 |
| 16,0 | 0,7742 | 0,4747 | $1,340 \cdot 10^{-4}$ | $8,217 \cdot 10^{-5}$ | 4,60 |

APÊNDICE G – DADOS DOS SISTEMAS DE ELETRÓLITOS

Tabela G.1 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) com os respectivos erros para o sistema CO₂/H₂O a 25°C.

| P (bar) | pH experimental | pH calculado | Erro |
|----------------|------------------------|---------------------|-------------|
| 1,0 | 4,18 | 3,91 | 0,27 |
| 2,5 | 3,61 | 3,71 | -0,10 |
| 4,7 | 3,49 | 3,58 | -0,09 |
| 8,2 | 3,36 | 3,47 | -0,11 |
| 11,0 | 3,27 | 3,41 | -0,14 |
| 16,2 | 3,22 | 3,33 | -0,11 |
| 20,0 | 3,18 | 3,30 | -0,12 |
| 25,4 | 3,12 | 3,25 | -0,13 |
| 40,0 | 3,05 | 3,18 | -0,13 |
| 59,8 | 3,00 | 3,13 | -0,13 |

Tabela G.2 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) com os respectivos erros para o sistema CO₂/NaHCO₃ 10 mM a 5°C.

| Pressão (bar) | pH experimental | pH calculado | Erro |
|----------------------|------------------------|---------------------|-------------|
| 1,0 | 5,50 | 5,63 | -0,13 |
| 2,7 | 5,05 | 5,21 | -0,16 |
| 8,8 | 4,63 | 4,73 | -0,10 |
| 15,8 | 4,49 | 4,51 | -0,02 |

Tabela G.3 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) com os respectivos erros para o sistema CO₂/NaHCO₃ 10 mM a 15°C.

| Pressão (bar) | pH experimental | pH calculado | Erro |
|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------|
| 1,0 | 5,64 | 5,70 | -0,06 |
| 3,0 | 5,18 | 5,23 | -0,05 |
| 8,9 | 4,78 | 4,79 | -0,01 |
| 15,5 | 4,60 | 4,58 | 0,02 |

Tabela G.4 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) com os respectivos erros para o sistema CO₂/NaHCO₃ 50 mM a 15°C.

| Pressão (bar) | pH experimental | pH calculado | Erro |
|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------|
| 0,0 | 8,40 | 8,33 | 0,07 |
| 1,0 | 6,48 | 6,35 | 0,13 |
| 2,3 | 6,07 | 6,00 | 0,07 |
| 4,9 | 5,74 | 5,68 | 0,06 |
| 8,4 | 5,47 | 5,46 | 0,01 |
| 11,4 | 5,30 | 5,34 | -0,04 |

Tabela G.5 – Valores de pH experimentais e calculados pelo modelo de Edwards *et al.* (1978) com os respectivos erros para o sistema CO₂/NaHCO₃ 10 mM a 25°C.

| Pressão (bar) | pH experimental | pH calculado | Erro |
|--------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------|
| 1,0 | 5,72 | 5,77 | -0,05 |
| 3,0 | 5,23 | 5,30 | -0,07 |
| 8,8 | 4,82 | 4,86 | -0,04 |
| 15,8 | 4,61 | 4,63 | -0,02 |