

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS

**ESTUDO DA PRECIPITAÇÃO DE TRIPSINA
COM USO DE SAIS VOLÁTEIS**

Érika Ohta Watanabe

Orientador: Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed (*in memoriam*)

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos ao título de Mestre em
Engenharia Química

Campinas – São Paulo

Agosto de 2004

INIDADE	BC
1ª CHAMADA	
	TR Unicamp
	W29e
/	EX
OMBO BC/	62396
ROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	14,00
DATA	04.1.05
1ª CPD	

B.10 70 334682

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

W29e Watanabe, Érika Ohta
Estudo da precipitação de tripsina com uso de sais voláteis / Érika Ohta Watanabe. --Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadores: Rahoma Sadeg Mohamed, Pedro de Alcântara Pessoa Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

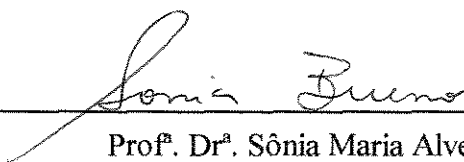
1. Precipitação (Química). 2. Proteínas - Purificação. 3. Tripsina. 4. Sal. 5. Análise enzimática. I. Mohamed, Rahoma Sadeg. II. Pessoa Filho, Pedro de Alcântara. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Dissertação de Mestrado defendida por Érika Ohta Watanabe e aprovada em 24 de agosto de 2004 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



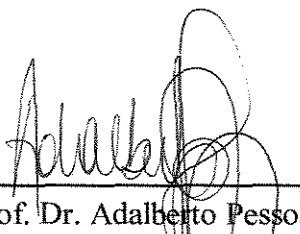
Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed (Orientador)

Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química



Prof.ª Dr.ª Sônia Maria Alves Bueno

Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química



Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

Universidade Estadual de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

500696

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Érika Ohta Watanabe em 24 de agosto de 2004.



p/ Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed

*Esta dissertação de mestrado é dedicada ao orientador
do trabalho Professor Dr. Rahoma Sadeg Mohamed*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu pai, minha irmã e meu cunhado pelo apoio, compreensão e ajuda em todos os momentos. A minha mãe, que apesar de ausente, sempre será exemplo de coragem, perseverança e amor. Aos meus avós por toda a ajuda. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed meus mais sinceros agradecimentos pela orientação e incentivo ao longo deste trabalho e pelas sugestões sempre decisivas. Muito obrigada também pelas demonstrações de profissionalismo, respeito, seriedade e determinação, qualidades que sempre lhe foram intrínsecas.

Ao Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho minha mais profunda gratidão pela disposição em ajudar sempre, sugestões e paciência, fazendo com que a distância fosse um obstáculo imperceptível. Muito obrigada também pela amizade que muito me honrou.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda não apenas pelo empréstimo do seu laboratório, mas também por me ter “adotado” como sua aluna, enriquecendo este trabalho com sugestões, críticas e idéias sempre pertinentes.

Ao Prof. Dr. Watson Loh e à Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno pelas sugestões dadas no exame de qualificação que muito colaboraram na continuidade e finalização da tese.

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

Ao Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pelo empréstimo do equipamento de liofilização.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo suporte financeiro através da bolsa de estudo.

Às amigas de laboratório: Ana Paula, Cibele, Cristiane, Fabiana, Geórgia, Gisele, Isa, Luciana, Mariana, Paula, Romi e Rosana pela ajuda e pelo ótimo ambiente de trabalho que sempre me proporcionaram. Ao Adriano Azzoni pela ajuda e sugestões.

Aos amigos de graduação: Lilian, Marcel e Patrícia pela ajuda e pelos momentos de diversão.

Aos amigos do Laboratório do Prof. Dr. Rahoma Sadeg Mohamed: Alexandre, Álvaro, Rafaela, Ronaldo, Uíram e Vanessa.

RESUMO

A precipitação induzida pela adição de sais é um processo frequentemente utilizado na purificação de proteínas em solução aquosa. Após a separação da proteína, o sal presente no precipitado deve ser removido e a solução remanescente necessita de tratamento para que os eletrólitos sejam recuperados e reutilizados no processo, para reduzir o custo e evitar a contaminação do meio ambiente. A precipitação com uso de sais voláteis pode ser uma alternativa a este tipo de processo pois, por elevação de temperatura ou abaixamento de pressão, o eletrólito passa para a forma gasosa e pode ser reutilizado sem purificação adicional. Neste trabalho foi estudada a precipitação de tripsina suína a 4°C utilizando-se o sal volátil carbamato de amônio ($\text{NH}_4\text{NH}_2\text{COO}$), preparado a partir de carbonato de amônio e hidróxido de amônio de modo que a razão entre as quantidades totais de nitrogênio e carbono ($R_{\text{N/C}}$) fosse igual a 2,0. A solubilidade da tripsina foi determinada experimentalmente: as concentrações de proteína das fases sobrenadante e precipitado foram obtidas por absorção a 280 nm e confirmadas por liofilização. Balanços de massa foram verificados, bem como o tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido. Por ser a tripsina uma enzima proteolítica, que apresenta problemas específicos de autólise em seu pH ótimo igual a 8,0, e devido ao caráter básico do sal carbamato de amônio, ensaios de atividade enzimática e avaliação do nível de autólise foram efetuados. Os estudos realizados demonstram que o carbamato de amônio é capaz de induzir a precipitação por “salting-out” da tripsina, e que o acréscimo de amônia ao sistema reduz a efetividade da precipitação. Da análise do balanço de massa observou-se que a concentração inicial de proteína não afeta sua solubilidade, e que o estado de equilíbrio é atingido após 1 h. Comparando-se os resultados de atividade total recuperada da tripsina precipitada com o sal volátil e com sulfato de amônio verificou-se a diminuição na atividade da proteína precipitada com carbamato de amônio. Este comportamento é devido provavelmente a um efeito desnaturante do carbamato de amônio, conforme observado por meio de eletroforese SDS-PAGE. Estudos para a remoção do sal volátil da solução de tripsina no processo de precipitação por “salting-out” foram realizados, de modo a demonstrar que a utilização do sal para a precipitação em larga escala é factível.

ABSTRACT

Salt-induced precipitation is an extensively used method to purify proteins in aqueous solution. Once precipitation is carried out, additional separation steps are necessary both to remove the salt from the precipitate, which is often accomplished by dialysis, and to treat the remaining aqueous phase to recover biomolecules still in solution and to prepare the solution for final disposal or recycling. This post-precipitation treatment can be very costly. The use of volatile electrolytes, which can be removed from the solution by temperature increase or pressure decrease, can be an economically attractive alternative for the precipitation process by conventional salts. In this work, the precipitation of suine trypsin at 4°C with the volatile salt ammonium carbamate ($\text{NH}_4\text{NH}_2\text{COO}$) was investigated. The solubility curve of trypsin was determined by measuring absorbance at 280 nm of precipitate and supernatant phases, and confirmed by lyophilization. Mass balance was verified as well as the time necessary to reach the equilibrium. Once trypsin is a proteolytic enzyme presenting autolysis problems at pH equal to 8,0, which is close to the pH of ammonium carbamate solutions, the activity recovery and autolysis level in the process were investigated. Experimental results showed that ammonium carbamate is able to induce the trypsin precipitation by salting-out. Mass balance indicated that the solubility of trypsin is independent of the initial protein concentration and the equilibrium is reached after 1 hour. Comparative results of the total activity recovered of the trypsin precipitated with ammonium carbamate and ammonium sulfate showed a decrease of 20% in the activity of the protein precipitated with ammonium carbamate. These results can be related to denaturing effect of ammonium carbamate as suggested by SDS-PAGE analysis. Volatile salt removal in the protein solution after the salting out precipitation was studied to demonstrate the feasibility of this precipitation technique.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
NOMENCLATURA.....	XXIII
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVO	2
1.2. ETAPAS EXECUTADAS	2
CAPÍTULO 2.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	5
2.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM USO DE SAIS VOLÁTEIS	7
2.2.1. <i>Equilíbrio entre as espécies carbamato/ amônia/ dióxido de carbono</i>	8
2.3. CARBAMATO DE AMÔNIO: EMPREGO INDUSTRIAL E EM PESQUISA	10
2.4. TRIPSINA	10
2.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	12
CAPÍTULO 3.....	15
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. MATERIAIS.....	15
3.1.1. <i>Reagentes</i>	15
3.1.2. <i>Equipamentos</i>	15

3.2. PROCEDIMENTOS	16
3.2.1. Determinação da concentração de proteína	16
3.2.2. Preparação do carbamato de amônio	16
3.2.3. Determinação da curva de solubilidade de tripsina em solução de carbamato de amônio R_{NC} igual a 2,0 e solução de sal volátil de R_{NC} igual a 2,5 a 4°C	17
3.2.4. Determinação da atividade enzimática de tripsina e da faixa operacional da taxa de reação.....	18
3.2.5. Determinação da influência do sal carbamato de amônio na atividade enzimática de solução de tripsina	19
3.2.6. Determinação da estabilidade da tripsina em solução de carbamato de amônio	19
3.2.7. Determinação da estabilidade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl	20
3.2.8. Determinação dos balanços de atividade de tripsina e de massa de proteína em precipitações com carbamato de amônio e sulfato de amônio	20
3.2.9. Avaliação do nível de autólise da tripsina precipitada com carbamato de amônio e sulfato de amônio através de eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida.....	21
3.2.10. Remoção do sal volátil por abaixamento de pressão e determinação da atividade enzimática da tripsina após a remoção.....	21
CAPÍTULO 4	23
RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1. ENSAIOS PRELIMINARES	23
4.1.1. Determinação da concentração de proteína	23
4.1.2. Determinação da atividade enzimática da tripsina	24
4.1.3. Determinação da faixa operacional da taxa de reação de hidrólise do BApNA	25
4.1.4. Determinação da influência do sal carbamato de amônio na atividade enzimática de solução de tripsina	27
4.1.5. Determinação da estabilidade da tripsina em solução de carbamato de amônio	28
4.1.6. Determinação da estabilidade da tripsina em solução de Trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH.....	30
4.2. PRECIPITAÇÃO DE TRIPSINA COM CARBAMATO DE AMÔNIO	31

4.2.1. Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio	31
4.2.2. Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sal volátil, R_{NC} igual a 2,5.....	35
4.2.3. Balanços de atividade enzimática de tripsina e de massa de proteína precipitada em solução de carbamato de amônio	36
4.2.4. Precipitação de tripsina com sulfato de amônio e comparação dos dados com a precipitação com o sal volátil	41
4.2.5. Avaliação do nível de autólise da tripsina através de Eletroforese-SDS PAGE.....	43
4.3. REMOÇÃO DO SAL VOLÁTIL CARBAMATO DE AMÔNIO APÓS A PRECIPITAÇÃO DE TRIPSINA.....	45
4.4. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA EQUAÇÃO DE COHN	46
CAPÍTULO 5.....	49
CONCLUSÃO E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	49
5.1. CONCLUSÕES	49
5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura tridimensional da tripsina ligada a um substrato. Fonte: Krieger <i>et al.</i> , 1974.....	12
Figura 3.1: Ilustração do sistema de remoção do carbamato de amônio por abaixamento de pressão.	22
Figura 4.1: Curva de absorção de solução de tripsina suína em água a 280 nm.	24
Figura 4.2: Determinação de atividade enzimática da tripsina utilizando-se BApNA como substrato a uma temperatura de 25°C.	25
Figura 4.3: Determinação da atividade específica da tripsina em solução HCl 0,001 N em função da taxa de reação de hidrólise do BApNA a 25°C para diversas concentrações de tripsina; Δ : ensaio 1; $\square$: ensaio 2.	26
Figura 4.4: Influência do sal carbamato de amônio na atividade da tripsina utilizando-se BApNA como substrato a uma temperatura de 25°C. Concentração de tripsina 240 $\mu\text{g/mL}$ em solução HCl 0,001 N.	27
Figura 4.5: Atividade da tripsina em solução de carbamato de amônio a concentrações de (a) 5,1 mol/kg; (b) 8,1 mol/kg, a temperatura de 25°C. Concentração de tripsina de 4,0 mg/mL; atividade específica no tempo inicial igual a 1,11 UA/mg.	29
Figura 4.6: Atividade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH no tempo inicial, $\square$ e após 1 hora, Δ ; a temperatura de 25°C. Concentração de tripsina de 4,0 mg/mL; atividade específica em pH igual a 7,8 de 1,11 UA/mg.	30
Figura 4.7: Solubilidade da tripsina em soluções de carbamato de amônio a 4°C; $R_{N/C}$ igual a 2,0; concentração de tripsina na alimentação: 10 mg/mL, +; 20 mg/mL, $\blacksquare$; 30 mg/mL, $\blacktriangle$; 40 mg/mL, $\bullet$	32
Figura 4.8: Comparação entre as concentrações de tripsina determinadas por balanço de massa e por medida de absorbância a 280 nm; concentração	

de tripsina na alimentação: 10 mg/mL, +; 20 mg/mL, ■; 30 mg/mL, ▲;
40 mg/mL, ●33

Figura 4.9: Comparação das medidas de massa da tripsina na fase sobrenadante, de precipitações a 4°C, realizadas por absorbância a 280 nm (símbolos “cheios”) e por liofilização (símbolos “vazados”). Concentrações de tripsina: 10 mg/mL, ● e ○; 20 mg/mL, ▲ e △34

Figura 4.10: Variação do parâmetro razão entre as quantidades totais de nitrogênio e carbono ($R_{N/C}$) do sal volátil na precipitação a 4°C de solução de tripsina de concentração de 40 mg/mL; carbamato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 2,0, ■; solução de $R_{N/C}$ igual a 2,5, ▲35

Figura 4.11: Balanço de atividade da tripsina precipitada com carbamato de amônio, $R_{N/C}$ igual a 2,0 a concentrações de (a) 7,1 mol/kg; (b) 9,1 mol/kg a 25°C em duplicata a diferentes tempos de equilíbrio e em relação à atividade alimentada, □: fase sobrenadante; △: precipitado; ×: atividade total recuperada.37

Figura 4.12: Balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio, $R_{N/C}$ igual a 2,0 a concentrações de (a) 7,1 mol/kg e (b) 9,1 mol/kg a 25°C em duplicata a diferentes tempos de equilíbrio e em relação à massa alimentada, □: fase sobrenadante; △: precipitado; ×: massa final recuperada.38

Figura 4.13: SDS-PAGE (gel 15%) de tripsina precipitada a 4°C com carbamato de amônio e sulfato de amônio. Volume injetado em cada pista de 10 µL de proteína de concentração 1,0 mg/mL. Linha 1, marcadores de massa molecular; linha 2, tripsina a pH 3,0; linha 3, precipitado da tripsina em solução de carbamato de amônio (7,1 mol/kg); linha 4, precipitado da tripsina em solução de sulfato de amônio (1,9 mol/kg); linha 5, sobrenadante da tripsina em solução de carbamato de amônio (7,1 mol/kg); linha 6, sobrenadante da tripsina em solução de sulfato de amônio (1,9 mol/kg).44

Figura 4.14: Solubilidade da tripsina suína a 4°C em solução de: carbamato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 2,0, ●; sulfato de amônio, ■; sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5, ▲; concentração inicial de tripsina de 40 mg/mL em solução de carbamato de amônio e em sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 e de 30 mg/mL em solução de sulfato de amônio.47

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Balanços de atividade de tripsina precipitada, em termos de unidades de atividade (UA), com carbamato de amônio $R_{N/C}$ igual a 2,0 a 4 °C.....	39
Tabela 4.2: Balanços de massa de proteína precipitada, em miligramas, com carbamato de amônio, $R_{N/C}$ igual a 2,0 a 4 °C.	40
Tabela 4.3: Balanços de atividade de tripsina precipitada, em termos de unidades de atividade (UA), com sulfato de amônio a 4°C	42
Tabela 4.4: Balanços de massa de proteína precipitada, em miligramas, com sulfato de amônio a 4°C	43
Tabela 4.5: Balanços de atividade de tripsina precipitada, em termos de unidades de atividade (UA), com carbamato de amônio $R_{N/C}$ igual a 2,0 a 4 °C após a remoção do sal volátil	45
Tabela 4.6: Balanços de massa de proteína precipitada, em miligramas, com carbamato de amônio, $R_{N/C}$ igual a 2,0 a 4 °C após a remoção do sal volátil	46
Tabela 4.7: Parâmetros β' e K'_s da equação de Cohn para tripsina em solução de carbamato de amônio e sulfato de amônio a 4°C.	48
Tabela A1: Determinação da curva de absorção de solução de tripsina suína em água a 280 nm.	59
Tabela A2: Determinação da atividade enzimática da tripsina suína utilizando-se BApNA como substrato a 25°C.	59
Tabela A3: Determinação da faixa operacional da taxa de reação de hidrólise do BapNA utilizando-se diversas concentrações de tripsina.	60
Tabela A4: Determinação da influência do sal carbamato de amônio na atividade enzimática de solução de tripsina.	64

Tabela A5: Determinação da estabilidade de tripsina em solução de carbamato de amônio de concentração 5,1 mol/kg	65
Tabela A6: Atividade da tripsina em solução de carbamato de amônio de concentração 5,1 mol/kg em diferentes tempos de envelhecimento	67
Tabela A7: Determinação da estabilidade de tripsina em solução de carbamato de amônio de concentração 8,1 mol/kg	68
Tabela A8: Atividade da tripsina em solução de carbamato de amônio de concentração 8,1 mol/kg em diferentes tempos de envelhecimento	70
Tabela A9: Determinação de estabilidade de tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH, no tempo inicial.	71
Tabela A10: Atividade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH, no tempo inicial	72
Tabela A11: Determinação de estabilidade de tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH, após 1 hora.	72
Tabela A12: Atividade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH, após 1 hora.	73
Tabela A13: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração inicial de tripsina igual a 10 mg/mL.	74
Tabela A14: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração inicial de tripsina igual a 10 mg/mL.	74
Tabela A15: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração inicial de tripsina igual a 20 mg/mL.	74

Tabela A16: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 20 mg/mL.	75
Tabela A17: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração inicial de tripsina igual a 30 mg/mL.	75
Tabela A18: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 30 mg/mL.	76
Tabela A19: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 40 mg/mL.	76
Tabela A20: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 40 mg/mL.	77
Tabela A21: Determinação da quantidade de tripsina na precipitação com carbamato de amônio por secagem utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 10 mg/mL	78
Tabela A22: Determinação da quantidade de tripsina na precipitação com carbamato de amônio por secagem utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 20 mg/mL	78
Tabela A23: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sal volátil, $R_{N/C}$ igual a 2,5 utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 40 mg/mL.....	78
Tabela A24: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sal volátil, $R_{N/C}$ igual a 2,5 utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 40 mg/mL.....	79
Tabela A25: Determinação da solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sulfato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 30 mg/mL.....	79

Tabela A26: Determinação da solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sulfato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 30 mg/mL	80
Tabela A27: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg, em diferentes tempos de equilíbrio	80
Tabela A28: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 9,1 mol/kg em diferentes tempos de equilíbrio	85
Tabela A29: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com sulfato de amônio de concentração de 1,9 mol/kg	89
Tabela A30: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com sulfato de amônio de concentração de 2,7 mol/kg	90
Tabela A31: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com sulfato de amônio de concentração de 3,8 mol/kg	92
Tabela A32: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg	93
Tabela A33: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 9,1 mol/kg	93
Tabela A34: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com sulfato de amônio	94
Tabela A35: Determinação do balanço de atividade de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg a 4°C após a remoção do sal volátil.	94
Tabela A36: Determinação do balanço de atividade de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 9,1 mol/kg a 4°C após a remoção do sal volátil.	95

Tabela A37: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg a 4°C após a remoção do sal volátil.	97
--	----

Tabela A38: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 9,1 mol/kg a 4°C após a remoção do sal volátil.	97
--	----

NOMENCLATURA

RPB – recuperação e purificação de bioprodutos;

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

m_i – molalidade da espécie i ;

BAPNA – N- α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida;

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo o detergente dodecil sulfato de sódio;

TEMED – N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamino;

UA – unidade de atividade da enzima;

UA/mg – unidade de atividade específica da enzima;

V_{total} – volume total (L);

V_{enzima} – volume da solução enzimática (L);

ΔA_{405} – variação da absorbância a 405 nm;

t – tempo (min);

D – fator de diluição;

C – concentração da proteína (mg/cm^3);

A – fração de luz absorvida;

d – distância percorrida pela luz em solução (cm);

a – coeficiente de absorção específica na faixa linear ($\text{cm}^2\text{mg}^{-1}$);

S – solubilidade da proteína em solução (g/kg);

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

I – força iônica (mol/kg);

C_{sal} – concentração de sal (mol/kg);

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

ϵ - coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$);

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Proteínas podem ser utilizadas em uma ampla variedade de aplicações, de insumos industriais a especialidades farmacêuticas de alto valor agregado. Independente da sua forma de produção, as proteínas não são obtidas puras, mas em mistura, e uma seqüência de etapas de separação é necessária para que se obtenha o produto desejado no nível de pureza requerido. Estas operações seqüenciais são conhecidas como Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB) ou “Downstream Processing” e constituem uma das etapas mais difíceis e caras em um bioprocessos. No caso dos fármacos, o custo da RPB no processo produtivo pode atingir até 80% do custo de produção (Narayanan *et al.*, 1994).

A precipitação de proteínas com uso de sais é uma etapa de purificação freqüentemente encontrada em bioprocessos e ocorre geralmente entre uma primeira etapa de separação sólido-líquido, realizada por centrifugação ou filtração, e a purificação final utilizando-se adsorção ou cromatografia (Ladish, 2001). Essa etapa de precipitação é bastante utilizada pela alta capacidade de concentrar a molécula de interesse e pelo seu baixo custo, estando presente em mais de metade dos processos de purificação, segundo Bonnerjea *et al.* (1986). Porém, a necessidade de um tratamento da fase precipitada, para a retirada do sal e obtenção do produto desejado, e da fase sobrenadante, para a recuperação do sal utilizado para reuso ou descarte da fase líquida, torna o processo de precipitação limitado devido ao custo de tratamento e da legislação ambiental.

O uso de eletrólitos voláteis, que podem passar para a fase vapor com aumento de temperatura ou abaixamento da pressão da solução, pode ser uma alternativa a este tipo de processo, aumentando a sua viabilidade e diminuindo o custo de produção. Os eletrólitos voláteis compreendem bases, ácidos e sais voláteis, como o hidróxido de amônio (NH₄OH),

o ácido carbônico (H_2CO_3), o bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), o carbonato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) e o carbamato de amônio ($\text{NH}_4\text{NH}_2\text{COO}$).

Para que a precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis seja realmente uma alternativa viável em processos de purificação, é necessário avaliá-la em detalhe através de dados experimentais, e é essa necessidade que justifica o presente trabalho.

1.1. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar a precipitação de proteínas por “salting-out” com o uso de carbamato de amônio, um sal volátil, com enfoque em purificação de proteínas. A proteína investigada foi a tripsina suína, uma enzima proteolítica pertencente à família das serino proteases, de massa molecular igual a 23 kDa e estável a pH 3,0 (Barret *et al.*, 1998). A tripsina é responsável pela hidrólise de ligações peptídicas, podendo ocasionar a quebra de ligações de outra tripsina, em um processo denominado autólise, que ocorre mais acentuadamente no seu pH ótimo igual a 8,0. O caráter básico de soluções de carbamato de amônio (pH próximo a 9,8) indica a possibilidade de ocorrência da autólise e, portanto, a necessidade de um estudo da atividade enzimática da tripsina.

1.2. ETAPAS EXECUTADAS

Neste trabalho foram realizados os seguintes estudos preliminares:

- a) Determinação da concentração de proteína por absorbância a 280 nm;
- b) Implementação do método da atividade enzimática através de hidrólise do substrato BApNA pela tripsina incluindo a determinação da faixa operacional da taxa de reação e influência do sal carbamato de amônio na atividade da tripsina;
- c) Estabilidade da tripsina em solução de sal volátil;
- d) Estabilidade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl, a diferentes valores de pH.

Posteriormente realizaram-se os seguintes ensaios de precipitação de proteína:

- e) Determinação experimental da curva de solubilidade da tripsina e verificação da influência do sal na quantificação da proteína através de secagem;
- f) Estudo do efeito da razão entre nitrogênio total e carbono total na solubilidade da tripsina;
- g) Cálculo do balanço de massa e determinação do tempo de equilíbrio;
- h) Cálculo do balanço de atividade enzimática da tripsina e comparação com um sal convencional como o sulfato de amônio;
- i) Avaliação do nível de autólise da tripsina precipitada com carbamato de amônio e sulfato de amônio, através de eletroforese SDS-PAGE;
- j) Remoção do sal volátil, através de redução de pressão, tanto da solução quanto da fase sólida e determinação do balanço de massa de proteína e atividade enzimática da tripsina após esta operação.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

A precipitação de proteínas em soluções aquosas, com posterior recuperação do precipitado, constitui uma das mais importantes operações unitárias de processos de recuperação e purificação de proteínas (Hoare, 1982). Dentre os métodos utilizados para a precipitação de proteínas pode-se citar: adição de sais, mudança de pH, adição de solventes ou polímeros orgânicos e desnaturação seletiva. No primeiro caso, a precipitação ocorre pela diminuição da solubilidade ocasionada pela dissolução do sal, chamada de “salting-out”, em que os íons competem com a proteína pelas moléculas de água; uma vez parcialmente removida a camada de hidratação, as interações proteína-proteína, com destaque para as interações hidrofóbicas, se tornam relevantes. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado em “salting-out” devido a sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução (Deutscher, 1990). O uso de “salting-out” com sulfato de amônio é, por exemplo, comum na purificação de enzimas proteolíticas a partir de tecidos animais (Cao *et al.*, 2000) e na purificação de proteínas do plasma sanguíneo (Nair *et al.*, 1999). A precipitação de proteínas pode ser feita também por ajuste de pH, a chamada precipitação isoelétrica: adicionam-se ácidos ou bases até que o pH do meio seja igual ao ponto isoelétrico da proteína. Neste pH, a carga líquida da molécula é nula e a repulsão eletrostática entre as moléculas é mínima, prevalecendo as interações hidrofóbicas proteína-proteína. Como exemplo de operação industrial que possui etapas de precipitação isoelétrica pode-se citar o processo de purificação da insulina (McGregor, 1983). A precipitação ocasionada pela adição de eletrólitos, seja por “salting-out”, seja por ajuste de pH, produz um sistema

bifásico que contém o sal precipitado e uma suspensão concentrada em eletrólito. A presença do sal na fração (principalmente na fração precipitada) que contém a proteína alvo é muitas vezes deletéria às etapas de Recuperação e Purificação de Bioprodutos que seguem, sendo necessário removê-lo (por exemplo, por diálise ou diafiltração antes de cromatografia de troca iônica). Após a separação da proteína, esta solução mãe pode ser processada para que os eletrólitos sejam recuperados e reutilizados no processo, enquanto os demais remanescentes da mistura em que se encontrava a proteína são tratados para disposição final.

O principal efeito da adição de solventes orgânicos em soluções aquosas que contém proteínas é a redução da atividade da água: a capacidade de solvatação da água diminui em uma proteína, com o aumento da concentração do solvente orgânico. Isto ocorre devido à diminuição da constante dielétrica do solvente aliada ao deslocamento da água e à imobilização parcial das moléculas de água pela hidratação do solvente orgânico. A estrutura ordenada da água ao redor das áreas hidrofóbicas na superfície da proteína pode ser deslocada pelo solvente orgânico causando maior solubilidade destas áreas e um aumento das forças de atração entre cargas opostas da proteína. Como resultado, as moléculas de proteína tendem a se agregar e precipitar. A acetona e o etanol são os solventes orgânicos mais utilizados na precipitação, pois são completamente miscíveis na água (Scopes, 1988). A acetona é utilizada, por exemplo, na purificação de enzimas encontradas no músculo de coelhos (Matsuishi e Okitani, 2003) e o etanol na purificação de proteínas do sangue (Moure *et al.*, 2003) e, industrialmente para a produção de bromelina de pedúnculo de abacaxi (Miranda, comunicação pessoal, 2004).

A utilização de polímeros não iônicos, de alta massa molecular e solúveis em água, para a precipitação fracionada de proteínas foi introduzida por Polson *et al.*, em 1964. O mecanismo de precipitação de proteínas utilizando-se polímeros é similar à precipitação com uso de solventes orgânicos. O polímero mais utilizado é o polietilenoglicol devido à variedade de graus de polimerização, sendo freqüentemente utilizados os de massas moleculares de 6000 Da e 20000 Da; o de massa molecular de 4000 Da é o mais efetivo para a precipitação de proteínas. A adição de polímeros é utilizada na purificação de proteínas do plasma sangüíneo humano (Ryzewski e Hsu, 1993) e na purificação de enzimas de tecido animal (Ozturk-Urek e Tarhan, 2001).

Na desnaturação seletiva impõem-se condições em que a enzima desejada não é totalmente desnaturada (perde-se no máximo 10 a 20% da atividade da enzima), enquanto que os outros componentes da solução são desnaturados e precipitados por mudança de temperatura ou pH. A desnaturação por aquecimento é utilizada principalmente na purificação de enzimas que são relativamente estáveis com o calor como a xantine oxidase (Maia e Mira, 2002). Como exemplo de aplicação da desnaturação seletiva por pH, tem-se a purificação (com finalidade de caracterização) de polipeptídeos que se ligam ao sítio central do vírus *Moloney murine*, causador de leucemia (Wang e Speck, 1992).

2.2. PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM USO DE SAIS VOLÁTEIS

A necessidade de um tratamento posterior à precipitação para recuperação do sal e purificação da proteína torna o processo de precipitação com uso de sais convencionais oneroso, além de limitado pelas leis de regulamentação ambiental. Diante disso, o uso de sais voláteis, que podem migrar à fase vapor com aumento de temperatura ou abaixamento da pressão da solução, pode aumentar a viabilidade do processo de precipitação na purificação de proteínas pela diminuição do custo de operação. Como exemplos de sais voláteis pode-se citar o bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), o carbonato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) e o carbamato de amônio ($\text{NH}_4\text{NH}_2\text{COO}$).

Em soluções aquosas, os eletrólitos voláteis coexistem nas formas iônica e molecular (não dissociada), mas na fase vapor somente a forma molecular é encontrada (Prausnitz *et al.*, 1999). Por elevação de temperatura ou abaixamento de pressão, a solubilidade da forma molecular em água reduz-se drasticamente, diminuindo também a concentração da forma iônica. Assim, o eletrólito converte-se à forma molecular gasosa e pode ser diretamente reutilizado, sem necessidade de purificação adicional.

A eficiência dos sais voláteis em um processo de precipitação por “salting-out” é sugerida pela formação de sistemas aquosos bifásicos em substituição ao fosfato de potássio relatado por van Berlo *et al.* (2000). Apesar destas manifestações, ao nosso conhecimento os sais voláteis não foram ainda utilizados para a indução do “salting-out” de soluções contendo proteínas; já a precipitação isoeletrica com ácidos ou bases voláteis é apenas recente, e estudos sistemáticos foram conduzidos somente sobre o uso de um ácido

volátil, o dióxido de carbono, na precipitação isoeletrica de caseína (Tomasula *et al.*, 1997) e de proteínas de soja (Hofland *et al.*, 2000).

2.2.1. Equilíbrio entre as espécies carbamato/ amônia/ dióxido de carbono

A descrição termodinâmica de sistemas contendo eletrólitos voláteis tem recebido bastante atenção na literatura, mesmo nos estudos concentrados na determinação experimental de condições de equilíbrio. Os primeiros estudos realizados por Edwards *et al.* (1975) visavam a estabelecer uma modelagem termodinâmica de soluções diluídas contendo eletrólitos voláteis (soluções aquosas de amônia, dióxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, dióxido de enxofre e cianeto de hidrogênio) comumente encontrados na indústria química.

Nos sistemas que envolvem diversas espécies iônicas, o equilíbrio é calculado através de reações de dissociação. Para a amônia, o equilíbrio a ser considerado é:



e na dissolução de dióxido de carbono:



Na dissolução simultânea de amônia e dióxido de carbono, deve-se levar em conta o equilíbrio de formação do íon carbamato:



Investigações experimentais de soluções aquosas de amônia e dióxido de carbono foram realizadas por Göppert e Maurer (1988) comparando-se os dados obtidos com o modelo apresentado por Edwards *et al.* (1978). Esse artigo mostra que a pressão em equilíbrio com uma solução de amônia e dióxido de carbono é mínima para uma razão entre

nitrogênio e carbono próxima a 2,0 – equivalente a uma solução de carbamato de amônio. De maneira geral, os dados permitem inferir que a condução dos experimentos de precipitação pode ser realizada como na precipitação com outros sais (como sulfato de amônio), sendo necessária apenas a preocupação de vedar os recipientes em que ocorrerá a precipitação: embora a quantidade eventualmente perdida seja muito pequena, a manutenção contínua de um estado de não-equilíbrio pode levar a uma perda significativa.

Além do estudo do equilíbrio líquido-vapor de soluções aquosas de amônia e dióxido de carbono, Kurz *et al.* (1995) investigaram a precipitação de bicarbonato de amônio sólido. Essa precipitação corresponde a uma limitação da quantidade de sal que se pode dissolver. Outras determinações experimentais foram obtidas por Rumpf *et al.* (1998). As informações obtidas por estes autores podem ser sintetizadas em função da razão entre as concentrações totais de nitrogênio e carbono no sal. Essa razão foi definida por van Berlo *et al.* (2000):

$$R_{N/C} = \frac{m_{NH_3}^{(i)} + m_{NH_4^+} + m_{NH_2COO^-}}{m_{CO_2}^{(i)} + m_{HCO_3^-} + m_{CO_3^{2-}} + m_{NH_2COO^-}} \quad (2.5)$$

em que m_i é a molalidade da espécie i .

De acordo com as reações de dissociação e a definição da razão $R_{N/C}$ (Equações 2.1-2.5), considera-se uma solução de carbamato de amônio àquela que possui $R_{N/C}$ igual a 2,0, solução de bicarbonato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 1,0 e solução de carbonato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 1,4 – cabe salientar que o carbonato de amônio comercial não corresponde ao sal da fórmula $(NH_4)_2CO_3$, mas a uma mistura de bicarbonato e carbamato de amônio cuja fração de amônia é de aproximadamente 30% em massa. O estado de equilíbrio de uma solução depende da quantidade de solutos adicionados e da razão $R_{N/C}$, mas não do estado em que o soluto é adicionado à solução. Assim, uma solução de carbamato de amônio é idêntica a uma solução de bicarbonato de amônio e hidróxido de amônio que possua a mesma razão $R_{N/C}$. Desse modo, soluções de $R_{N/C}$ igual a 2,0 serão referenciadas nesse trabalho como soluções de carbamato de amônio, apesar do complexo equilíbrio químico que se estabelece.

Neste trabalho, o sal volátil será referenciado pela razão entre nitrogênio e carbono ($R_{N/C}$) conforme definida pela Equação 2.5. Como exemplo da importância desse parâmetro, van Berlo *et al.* (2000) sugerem que somente sais voláteis com $R_{N/C}$ maior ou igual a 2,0 são efetivos para a separação de duas fases aquosas. Além disso, essa razão influencia bastante a solubilidade dos sais em água. De acordo com dados fornecidos pela BASF (1998, 1999, 2000), a solubilidade a 25°C do carbamato de amônio é de 790 g/L, do carbonato de amônio ($R_{N/C}$ aproximadamente igual a 1,4) é de 320 g/L e do bicarbonato de amônio é de 220 g/L¹.

2.3. CARBAMATO DE AMÔNIO: EMPREGO INDUSTRIAL E EM PESQUISA

Carbamato de amônio foi primeiramente obtido no início do século XIV em mistura com bicarbonato de amônio e carbonato de amônio. Esta mistura era produzida pela destilação de chifres, casco e couro de animais e utilizada como fermento para pães devido à sua decomposição em produtos gasosos e pela facilidade de manuseio (Gerhartz, 1985). Após o desenvolvimento industrial de síntese da amônia, o carbamato de amônio tem sido preparado a partir de amônia e dióxido de carbono (Brooks e Audrieth, 1946) e utilizado industrialmente como inseticida, agente neutralizador e na produção de carbonato de amônio (Gerhartz, 1985). Em pesquisa, o carbamato de amônio tem sido utilizado para aumentar a estabilidade operacional da lipase como enantioseletivo (Du *et al.*, 2003), na síntese de glicoseaminas a partir da reação de hexoses, pentoses ou dissacarídeos (Likhoshesterov *et al.*, 2002), em sistemas aquosos bifásicos na partição de aminoácidos (van Berlo *et al.*, 2000) e na produção de uréia (Claudel *et al.*, 1986).

2.4. TRIPSINA

Enzimas proteolíticas constituem um extenso grupo de proteínas cuja função é alterar ou decompor outras proteínas pela quebra de ligações peptídicas. Neste grupo

¹ Cogitou-se também utilizar carbonato e bicarbonato de amônio para a precipitação de tripsina, mas a limitação de concentrações induzida pela menor solubilidade fez com que o estudo ficasse restrito ao carbamato de amônio.

encontra-se a família das serino proteases, a mais estudada e fisiologicamente mais versátil família das proteases (Beynon *et al.*, 1989). As serino proteases participam da digestão, formação e dissolução de coágulos do sangue, em imuno reações a organismos e células externas e na fertilização de óvulos. Ainda que as funções fisiológicas sejam diversas, as serino proteases utilizam o mesmo mecanismo de catálise para promover um mesmo processo químico: a quebra de ligações peptídicas (Stroud, 1974).

As enzimas digestivas, entre as quais se encontra a tripsina, estão entre as serino proteases mais conhecidas devido à facilidade de isolamento e purificação. A tripsina foi primeiramente descrita e nomeada por Kühne em 1876 como a atividade proteolítica em secreções do pâncreas. Posteriormente quando se teve conhecimento das proteases pancreáticas individuais, a tripsina foi associada à atividade proteolítica responsável pela quebra de ligações peptídicas na cadeia C-terminal adjacente aos aminoácidos arginina e lisina (Barret *et al.*, 1998). A tripsina β é uma proteína globular de cadeia simples contendo 223 resíduos de aminoácidos e estabilizada por seis pontes dissulfeto. A tripsina α é proveniente da quebra de uma cadeia simples nos resíduos Lisina 131-Serina 132, enquanto que a tripsina γ é formada a partir da tripsina α com uma quebra adicional entre os resíduos Lisina 176 e Ácido Aspártico 177 (Martins *et al.*, 2003).

Dentre as serino proteases encontradas no sistema digestivo, tripsina é a enzima mais difícil de se trabalhar devido a sua alta atividade e possibilidade de ocorrência de autólise, em que uma molécula da enzima destrói outra molécula da mesma enzima. A atividade da enzima varia com o pH, sendo mais ativa entre pH 7 e 8 (Stroud, 1974). A Figura 2.1 apresenta a estrutura tridimensional da tripsina e um substrato ligado à proteína pela sua forma complementar e estabilizado por ligações de hidrogênio. A orientação do substrato é determinada por uma “bolsa de ligação” que recebe os resíduos lisina e arginina do substrato, aminoácidos positivamente carregados que interagem por forças eletrostáticas com grupos carboxila da enzima; devido a esta “bolsa de ligação”, a tripsina cliva ligações peptídicas específicas: adjacentes aos resíduos de lisina e arginina (Krieger *et al.*, 1974). A reação enzimática da tripsina ocorre na região em que se encontram os sítios ativos: Serina 195, Histidina 57 e Ácido Aspártico 102, aminoácidos referidos como tríade catalítica (Lehninger *et al.*, 1993).

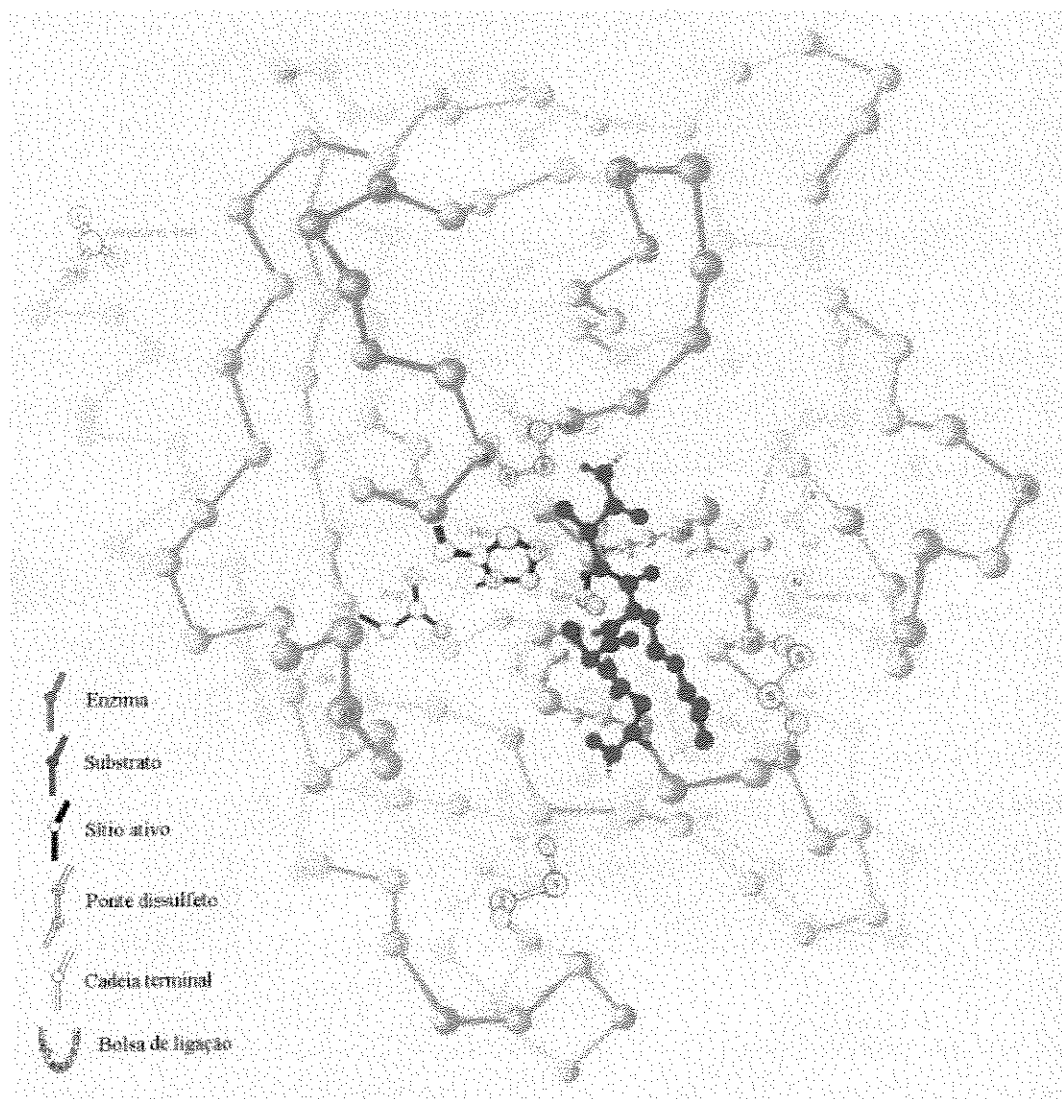


Figura 2.1: Estrutura tridimensional da tripsina ligada a um substrato. Fonte: Krieger *et al.*, 1974.

2.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Em processos de extração e purificação de enzimas, os problemas de atividade enzimática representam um dos maiores obstáculos, superando até mesmo a perda de material durante o processo (Wiseman, 1985). A atividade enzimática é afetada pela concentração de substratos, ativadores e inibidores específicos para a enzima e efeitos não específicos de compostos como o sal, solução tampão, pH, força iônica, temperatura e em

alguns casos interações com outras proteínas ou outras substâncias que podem estar presentes (Scopes, 1988). Devido aos fatores que podem influenciar na atividade enzimática, métodos foram desenvolvidos para a determinação da atividade da proteína. Um dos mais utilizados é o método contínuo, que implica na observação da reação de formação do produto ou perda de substrato por meio da variação da absorbância com o tempo.

No caso da tripsina, a proteína utilizada, problemas específicos de autólise e desnaturação têm levado a investigações sistemáticas da perda de atividade da proteína. Vários fatores podem alterar a atividade e a autólise de tripsina: por exemplo, a adição de íons cálcio e magnésio ocasionaram uma redução da autólise da tripsina (Vajda e Garai, 1981). Simon *et al.* em 2001, verificaram que acima de 50°C em 20 minutos de incubação a pH 4,0, a atividade da tripsina é reduzida aproximadamente em 80%. O efeito da pressão na atividade enzimática da tripsina foi estudado por Ruan *et al.* em 1999 e determinou-se que a pressão de 650 MPa, ocorre desnaturação total da tripsina a pH 3,0.

Nenhum estudo sobre a estabilidade da tripsina em soluções de carbamato de amônio foi encontrado na literatura consultada.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

A tripsina suína² utilizada foi fornecida pela Biobrás, Brasil e cedida pelo Prof. Dr. Everson Alves Miranda, coordenador do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, FEQ, UNICAMP. O substrato para a tripsina, N- α -benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), e a trietanolamina foram obtidos da Sigma, EUA. O sulfato de amônio utilizado foi obtido da Ecibra, Brasil. Para a preparação da solução de carbamato de amônio foram utilizados carbonato de amônio e hidróxido de amônio obtidos da LabSynth, Brasil, e água ultrapura obtida com a utilização do aparelho Milli-Q da Millipore, EUA. Para utilização na eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE), as soluções de acrilamida e dodecil sulfato de sódio foram obtidas da Bio-Rad, EUA; β -mercaptoetanol, persulfato de amônio e TEMED foram obtidos da Amersham Biosciences, Suécia e o tampão Tris da Merck, EUA.

3.1.2. Equipamentos

Durante a precipitação, a temperatura foi mantida constante através de um banho termostático Tecnal TE-2000, Brasil, de precisão de 0,2°C. Uma centrífuga Nova Técnica NT800, Brasil, foi utilizada para a separação da fase precipitado e fase sobrenadante após a

² Conforme informações fornecidas pela Biobrás, a atividade da tripsina suína determinada com o substrato BAEE é de 3101 UA/mg e com o substrato ATEE é de 32 UA/mg.

precipitação da tripsina. Para a determinação da concentração da tripsina presente em cada fase foi utilizado um espectrofotômetro Beckman modelo DU650, EUA. O espectrofotômetro foi também utilizado para a determinação da atividade enzimática. Durante esses ensaios, a temperatura foi mantida constante com o auxílio de um banho termostático Lauda modelo RMT6, Alemanha. Para a secagem do precipitado, visando a validação do método de determinação da concentração de tripsina por absorção a 280 nm, utilizou-se o liofilizador FTS Systems, EUA e determinou-se a massa de proteína utilizando-se uma balança analítica Quimis, Brasil, de precisão 0,1 mg. Para a avaliação do nível de autólise utilizou-se um sistema de eletroforese Mini Protean[®]3 da Bio-Rad, EUA. A remoção do sal volátil foi realizada utilizando-se uma bomba à vácuo Q-355B2 da Quimis, Brasil.

3.2. PROCEDIMENTOS

3.2.1. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína em solução foi feita através de medidas de absorbância a 280 nm. O valor do coeficiente de absorção para tripsina foi determinado previamente, pois a proteína utilizada no trabalho não era de alta pureza, e é igual a $0,8672 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$. Para essa medida, cada amostra era diluída (50x).

3.2.2. Preparação do carbamato de amônio

O sal carbamato de amônio foi preparado a partir do sal carbonato de amônio em forma sólida e hidróxido de amônio de tal modo que a razão entre nitrogênio e carbono (equação 2.5) fosse igual a 2,0. Fixou-se uma massa de carbonato de amônio de 10 g e calculou-se a quantidade de amônia e dióxido de carbono presente no carbonato. Como o carbonato de amônio utilizado não corresponde ao sal da fórmula $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, mas uma mistura de bicarbonato e carbamato de amônio cuja fração de amônia é 30% em massa, para se alcançar a razão $R_{\text{N/C}}$ igual a 2,0, hidróxido de amônio teve de ser adicionado. Sabendo-se ainda a quantidade de água contida na solução de hidróxido de amônio e que a

solubilidade do carbamato de amônio em água é de 790 g/L (BASF A. G., 2002), determinou-se a quantidade de água a ser acrescida à solução de modo a produzir uma solução saturada. O recipiente contendo o sal era vedado e o carbamato de amônio era preparado cerca de 10 horas antes do uso e mantido a temperatura ambiente. Posteriormente, preparou-se de modo análogo uma solução de sal volátil de razão $R_{N/C}$ igual a 2,5.

3.2.3. Determinação da curva de solubilidade de tripsina em solução de carbamato de amônio $R_{N/C}$ igual a 2,0 e solução de sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 a 4°C

Adicionou-se, a um frasco tipo Eppendorf de 1,5 mL de capacidade, tripsina (10, 20, 30 e 40 mg) água deionizada e solução de carbamato de amônio previamente preparada, de modo a produzir 1,0 mL de solução de composição desejada. Vedou-se o frasco e agitou-se lentamente. A seguir, o frasco foi mantido em repouso em banho termostático a 4°C, por um período de 24 horas, após o qual separou-se o sobrenadante e o precipitado por centrifugação a 5000 g. As fases ‘sobrenadante’ e ‘precipitado’ foram dissolvidas em água até completar 50 mL e a concentração de proteína em cada uma das soluções foi determinada por absorbância a 280 nm. O mesmo procedimento foi realizado para a determinação da curva de solubilidade de tripsina em solução de sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5. A determinação da curva de solubilidade constituiu-se de um gráfico de concentração de tripsina na fase sobrenadante em miligramas por mililitro em função da concentração de sal em mol de carbamato de amônio por quilograma de água.

O método para determinação da concentração de tripsina nas fases ‘sobrenadante’ e ‘precipitado’ por absorbância a 280 nm foi conferido através de secagem da proteína por liofilização. Após a precipitação da tripsina com carbamato de amônio, as fases ‘sobrenadante’ e ‘precipitado’ foram separadas e congeladas. A seguir, procedeu-se a liofilização das amostras, operação em que o sal carbamato de amônio é volatilizado, permitindo a determinação da massa de tripsina contida em cada uma das fases.

3.2.4. Determinação da atividade enzimática de tripsina e da faixa operacional da taxa de reação

A determinação da atividade enzimática de tripsina foi adaptada a partir do método apresentado por Kassel (1970) e consistiu no acompanhamento da taxa de hidrólise do substrato BApNA pela tripsina, medida através da variação da absorbância a 405 nm com o tempo. Em uma cubeta de polipropileno de capacidade 1,0 mL adicionou-se 67 µL de solução de tripsina 120 µg/mL em solução de HCl 0,001 mol/L e 600 µL de tampão trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a pH 7,8 com 0,02 mol/L de CaCl₂. Esta mistura foi agitada e mantida a 25°C por 3 min. Em seguida, adicionaram-se 333 µL de solução de BApNA 0,1% (m/v) em água deionizada e, após rápida homogeneização, registrou-se a variação da absorbância a 405 nm com o tempo, utilizando-se um espectrofotômetro acoplado a um banho termostatizado a 25°C. A unidade de atividade (UA) é dada pela quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 µmol de BApNA por minuto nessas condições. A atividade específica, que expressa o número de unidades de atividade por miligrama de proteína, foi calculada pela equação:

$$\text{Atividade específica (UA/mg)} = \left\{ \left[\frac{(\Delta A_{405} / t)}{\epsilon} V_{\text{Total}} \left(\frac{I}{V_{\text{Enzima}}} \right) (D) \right] \frac{I}{C} \right\} \quad (3.1)$$

em que $\Delta A_{405}/t$ é a inclinação obtida da curva absorbância a 405 nm em função do tempo; ϵ é o coeficiente de extinção para o BApNA a 405 nm (8800 M⁻¹cm⁻¹, Pereira *et al.*, 2001); D é o fator de diluição; C é a concentração de proteína da solução enzimática; V_{Total} é o volume total da solução; V_{Enzima} é o volume de enzima adicionado na reação de hidrólise.

Como parte da implementação do ensaio de atividade da tripsina determinou-se a faixa operacional da taxa de reação de hidrólise do substrato BApNA a ser utilizada. O procedimento realizado foi a determinação da atividade enzimática pelo método de Kassel (1970), já detalhado anteriormente, exceto pela variação da concentração de tripsina utilizada (0,012 a 1,2 mg/mL em solução de HCl 0,001 mol/L) na reação de hidrólise do substrato. A seguir, procedeu-se a determinação da atividade específica (equação 3.1) para cada ensaio a diferentes concentrações de tripsina e, como o valor da unidade de atividade específica (UA/mg) da tripsina é único para qualquer concentração de proteína, pode-se

determinar a faixa operacional da taxa de reação de hidrólise do BApNA em que isto se verifica, ou seja, a faixa de $\Delta 405/t$ no qual a atividade específica da tripsina determinada era constante.

3.2.5. Determinação da influência do sal carbamato de amônio na atividade enzimática de solução de tripsina

Para a verificação da influência do sal carbamato de amônio na atividade da proteína colocaram-se em um frasco tipo Eppendorf de capacidade 1,5 mL, 33,5 μL de solução de tripsina 240 $\mu\text{g/mL}$ em solução de HCl 0,001 mol/L, 33,5 μL de solução de carbamato de amônio de concentração 0,05, 0,10, 0,15, 0,25 e 0,40 mol/kg e 600 μL de tampão trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a pH 7,8 com 0,02 mol/L de CaCl_2 . Esta mistura foi agitada e mantida a 25°C por 3 min. Em seguida, adicionaram-se 333 μL de solução de BApNA 0,1% (m/v) em água deionizada e, após rápida homogeneização, registrou-se a variação da absorbância a 405 nm com o tempo, utilizando-se um espectrofotômetro acoplado a um banho termostatizado a 25°C. A verificação da influência do sal na atividade da proteína foi determinada calculando-se a atividade específica da tripsina para cada ensaio a diferentes concentrações de carbamato de amônio.

3.2.6. Determinação da estabilidade da tripsina em solução de carbamato de amônio

Adicionaram-se, em um frasco tipo Eppendorf de capacidade de 2,0 mL, carbamato de amônio, água deionizada e uma quantidade de tripsina correspondente à metade da concentração de solubilidade determinada no item 3.2.3. Esta solução foi armazenada em banho termostático a 4°C e em tempos pré-determinados uma alíquota desta solução era retirada e diluída em água até uma concentração de tripsina de 120 $\mu\text{g/mL}$. Após a diluição, mediu-se a atividade enzimática e calculou-se a atividade específica da tripsina. Para a verificação da estabilidade da tripsina construiu-se um gráfico de atividade específica (UA/mg) em função do tempo em que a tripsina permaneceu em solução de sal.

3.2.7. Determinação da estabilidade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl

Em um frasco tipo Eppendorf de capacidade 1,5 mL preparou-se uma solução de tripsina 120 µg/mL em solução de tampão trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH (7,8, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0). Em outro frasco tipo Eppendorf, colocou-se 67 µL desta solução de tripsina, 600 µL de solução tampão trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a pH 7,8 com 0,02 mol/L de CaCl_2 . Esta mistura foi agitada e mantida a 25°C por 3 min. Em seguida, adicionaram-se 333 µL de solução de BApNA 0,1% (m/v) em água deionizada e, após rápida homogeneização, registrou-se a variação da absorbância a 405 nm com o tempo, utilizando-se um espectrofotômetro acoplado a um banho termostatizado a 25°C. A determinação da atividade da tripsina em tampão foi realizada no tempo inicial e após 1 hora de permanência da proteína em solução de trietanolamina-HCl a diferentes valores de pH.

3.2.8. Determinação dos balanços de atividade de tripsina e de massa de proteína em precipitações com carbamato de amônio e sulfato de amônio

Em um frasco tipo Eppendorf de 1,5 mL adicionou-se tripsina, água e carbamato de amônio ou sulfato de amônio de modo a produzir uma solução de 1,0 mL. Vedou-se o frasco e agitou-se lentamente. A seguir, a solução foi deixada em repouso, em banho termostático a 4°C, por períodos pré-determinados (1, 3, 5 e 8 h), após o qual centrifugou-se e separou-se o sobrenadante e o precipitado. A tripsina em solução foi diluída em 25 mL e o precipitado em 50 mL, ambas em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a pH 7,8. A determinação das concentrações de tripsina nas fases sobrenadante e precipitado foram realizadas por absorbância a 280 nm. Para a determinação da atividade enzimática procedeu-se nova diluição das fases até a concentração de tripsina de 0,2 mg/mL e iniciou-se o procedimento de atividade conforme descrito em 3.2.4.

3.2.9. Avaliação do nível de autólise da tripsina precipitada com carbamato de amônio e sulfato de amônio através de eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida

As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970). O gel foi preparado na concentração de 15% e espessura de 1 mm. A tripsina (30 mg) foi precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg e sulfato de amônio de concentração de 1,9 mol/kg e as fases sobrenadante e precipitado foram diluídas em tampão Trietanolamina-HCl 0,2 mol/L pH 7,8 até a concentração de 1,0 mg/mL de solução de tripsina. Em seguida, as amostras de tripsina das fases precipitado e sobrenadante foram preparadas em tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol e foram aquecidas por sete minutos a 100°C (condição desnaturante). Uma amostra de 10 μ L das soluções de tripsina foi aplicada no gel de acrilamida. A separação das proteínas foi conduzida utilizando-se uma cuba com voltagem constante de 180V. O procedimento de coloração foi realizado com solução de nitrato de prata segundo protocolo descrito por Moryssey (1981).

3.2.10. Remoção do sal volátil por abaixamento de pressão e determinação da atividade enzimática da tripsina após a remoção.

A remoção do sal volátil carbamato de amônio foi realizada com equipamento esquematizado na Figura 3.1. Amostras das fases sobrenadante e precipitado de tripsina, após precipitação com carbamato de amônio, foram armazenadas em um dessecador conectado a um frasco com solução de ácido fosfórico 1,0 mol/L, que evitava que a amônia fosse lançada ao ambiente. Um recipiente para evitar a entrada de líquido na bomba foi ligado ao frasco de solução ácida e à bomba à vácuo. Após a remoção do sal volátil, procederam-se ensaios de atividade da proteína (fases precipitado e sobrenadante), conforme descritos no item 3.2.4 e de determinação de massa por absorbância a 280 nm.

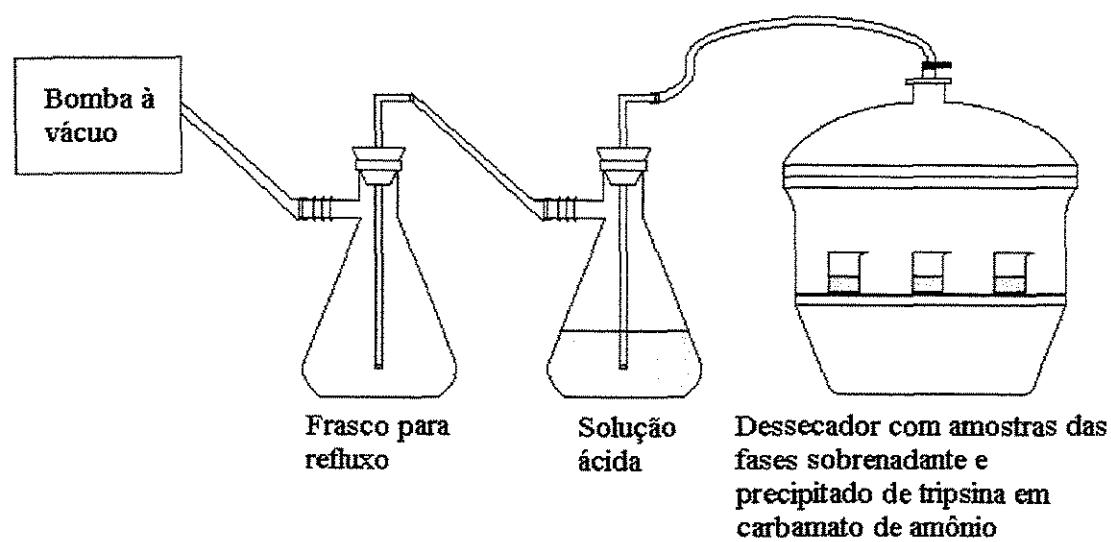


Figura 3.1: Ilustração do sistema de remoção do carbamato de amônio por abaixamento de pressão.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ENSAIOS PRELIMINARES

4.1.1. Determinação da concentração de proteína

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

$$A = a \times C \times d \quad (4.1)$$

em que A é a fração de luz absorvida, conhecida como absorbância; C é a concentração de proteína em solução em mg/cm³; d é a distância que a luz percorre através da solução da amostra, neste caso 1 cm, e a é o coeficiente de absorção específico na faixa linear da curva A versus C em unidades de cm²mg⁻¹.

Na Figura 4.1 tem-se a curva de absorção a 280 nm de solução de tripsina em água. O coeficiente de absorção obtido foi de 0,8672 cm²mg⁻¹ e o fator de correlação foi igual a 0,99998 indicando que os dados experimentais são bem correlacionados por uma reta passando pela origem. A partir do coeficiente de absorção a 280 nm e da equação 4.1 pode-se determinar a concentração de tripsina em qualquer solução desejada nesta faixa de concentração.

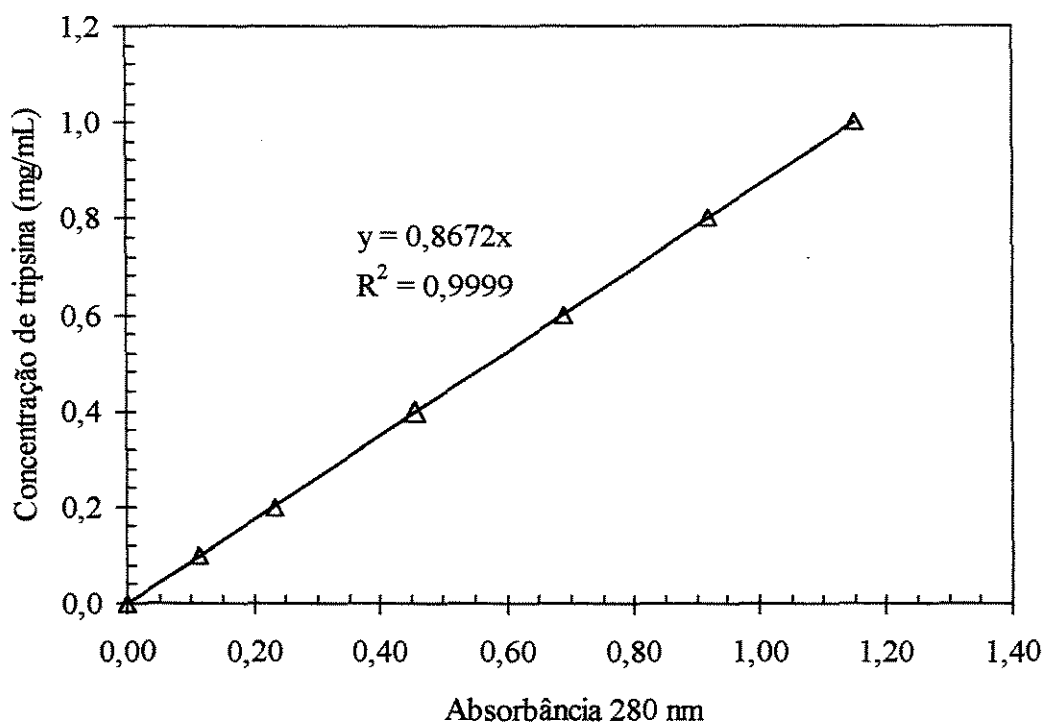


Figura 4.1: Curva de absorção de solução de tripsina suína em água a 280 nm.

4.1.2. Determinação da atividade enzimática da tripsina

A atividade enzimática da tripsina foi determinada a partir do método apresentado por Kassel (1970), através da reação de hidrólise do substrato BApNA. A reação de hidrólise do BApNA foi medida pela variação da absorbância a 405 nm com o tempo. A Figura 4.2 mostra uma curva típica obtida nos ensaios de atividade. A atividade específica média da tripsina utilizada nos ensaios foi de 1,11 UA/mg (média de oito ensaios de determinação de atividade realizados em dias diferentes), com um desvio padrão de 0,0026 UA/mg.

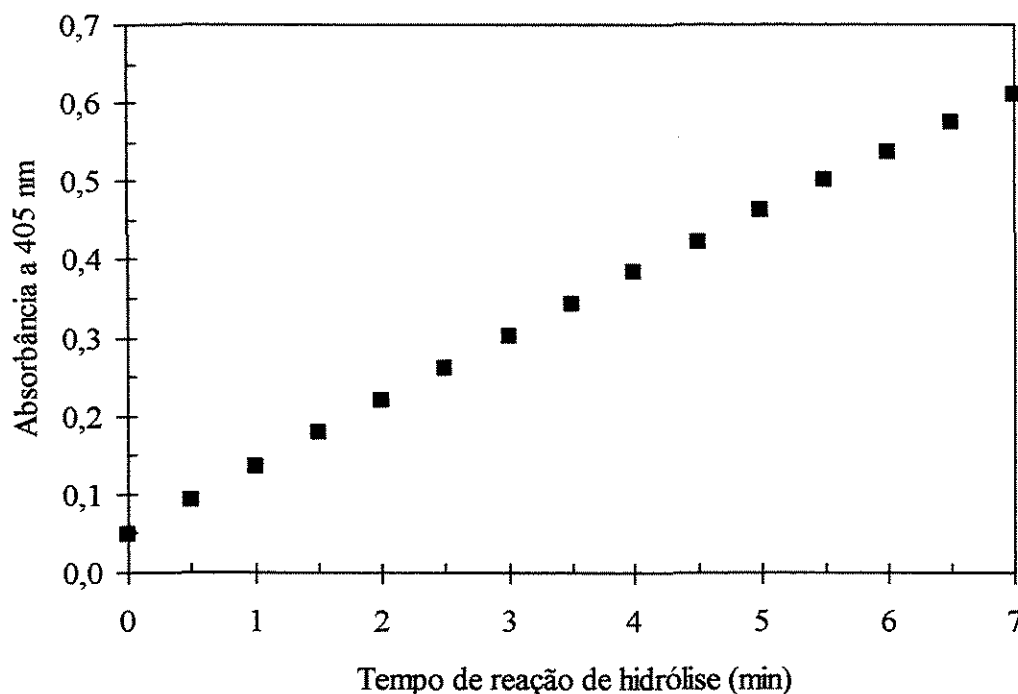


Figura 4.2: Determinação de atividade enzimática da tripsina utilizando-se BApNA como substrato a uma temperatura de 25°C.

4.1.3. Determinação da faixa operacional da taxa de reação de hidrólise do BApNA

Para a determinação da faixa operacional da taxa de reação de hidrólise do BApNA obteve-se a atividade enzimática da tripsina para diversas concentrações da proteína. A seguir, calculou-se a atividade específica da proteína (UA/mg) que, independente da concentração da tripsina, deve possuir um valor único.

A Figura 4.3 apresenta os dados de atividade específica da tripsina em relação à taxa de hidrólise do substrato BApNA. Foram realizados dois ensaios independentes com a mesma metodologia de modo a se verificar a consistência dos resultados obtidos. Observou-se que para valores da taxa de reação de hidrólise abaixo de $0,04 \text{ min}^{-1}$ e acima de $0,6 \text{ min}^{-1}$ a atividade específica da tripsina variou significativamente, enquanto que os valores intermediários de taxa de reação apresentaram duas faixas em que a atividade específica era constante. Verificou-se que uma faixa da taxa de reação ocorreu entre 0,04 e

$0,20 \text{ min}^{-1}$ (Faixa 1) fornecendo um valor de atividade específica de aproximadamente $1,15 \text{ UA/mg}$ e a outra estava entre $0,37$ e $0,58 \text{ min}^{-1}$ (Faixa 2) correspondendo a um valor de $1,04 \text{ UA/mg}$ para a atividade específica.

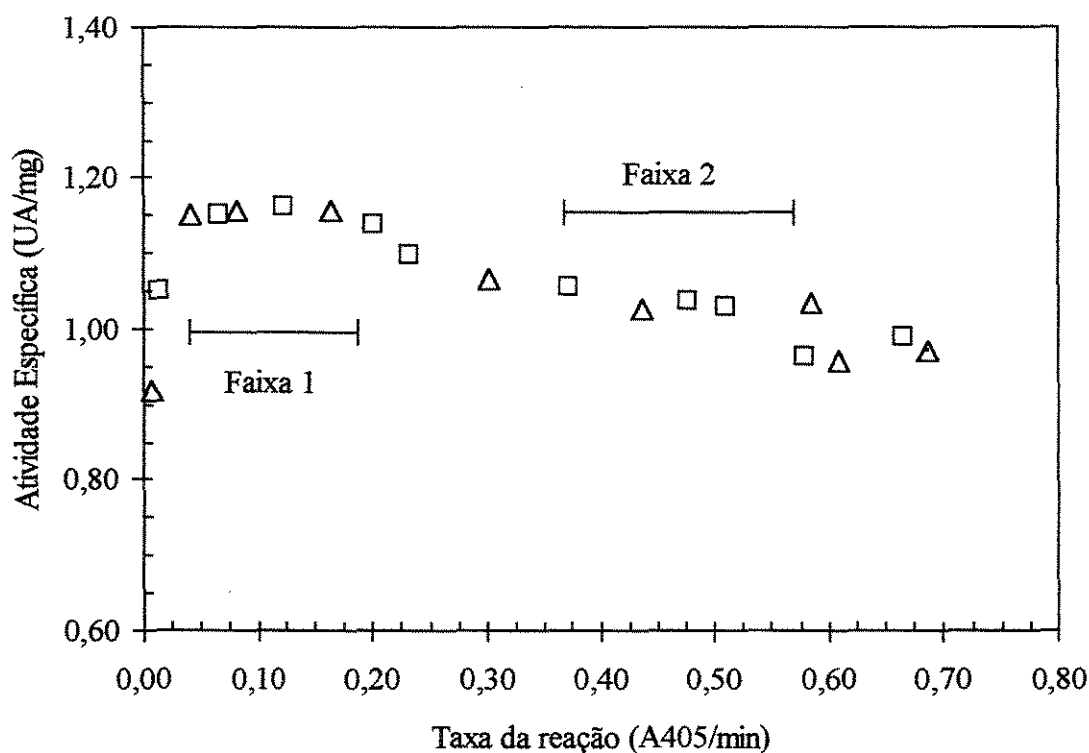


Figura 4.3: Determinação da atividade específica da tripsina em solução HCl 0,001 N em função da taxa de reação de hidrólise do BApNA a 25°C para diversas concentrações de tripsina; Δ: ensaio 1; □: ensaio 2.

Neste trabalho escolheu-se a Faixa 1 como a faixa operacional da taxa de hidrólise $\Delta A_{405}/t$ de $0,04$ e $0,20 \text{ min}^{-1}$ (correspondente à concentração de tripsina de $0,06$ e $0,3 \text{ mg/mL}$, respectivamente, em solução HCl 0,001 N) por apresentar uma menor variação nos valores de atividade específica da tripsina. Além disso, ao se adicionar sal volátil à solução de proteína para precipitação, a faixa escolhida corrobora para que o carbamato de amônio não interfira na determinação da atividade enzimática da proteína, devido à alta diluição requerida.

4.1.4. Determinação da influência do sal carbamato de amônio na atividade enzimática de solução de tripsina

A influência do sal volátil na atividade enzimática da tripsina foi verificada através da adição do carbamato de amônio diretamente na solução de reação de hidrólise do substrato BApNA. As concentrações de carbamato de amônio utilizadas foram de 0,05, 0,10, 0,15, 0,25 e 0,40 mol/kg. A Figura 4.4 contém os valores de atividade específica da tripsina em função da concentração de sal adicionada à reação. A reação de hidrólise do substrato não foi afetada pelas diferentes concentrações de sal carbamato de amônio já que os valores de atividade específica da tripsina variaram pouco (desvio padrão de 0,025 UA/mg) quando comparados à atividade da proteína sem a adição do sal. Desta maneira, verificou-se com este estudo que para uma concentração de carbamato de amônio de 10 mol/kg diluída pelo menos 25 vezes, o sal tem pouca influência na atividade da proteína.

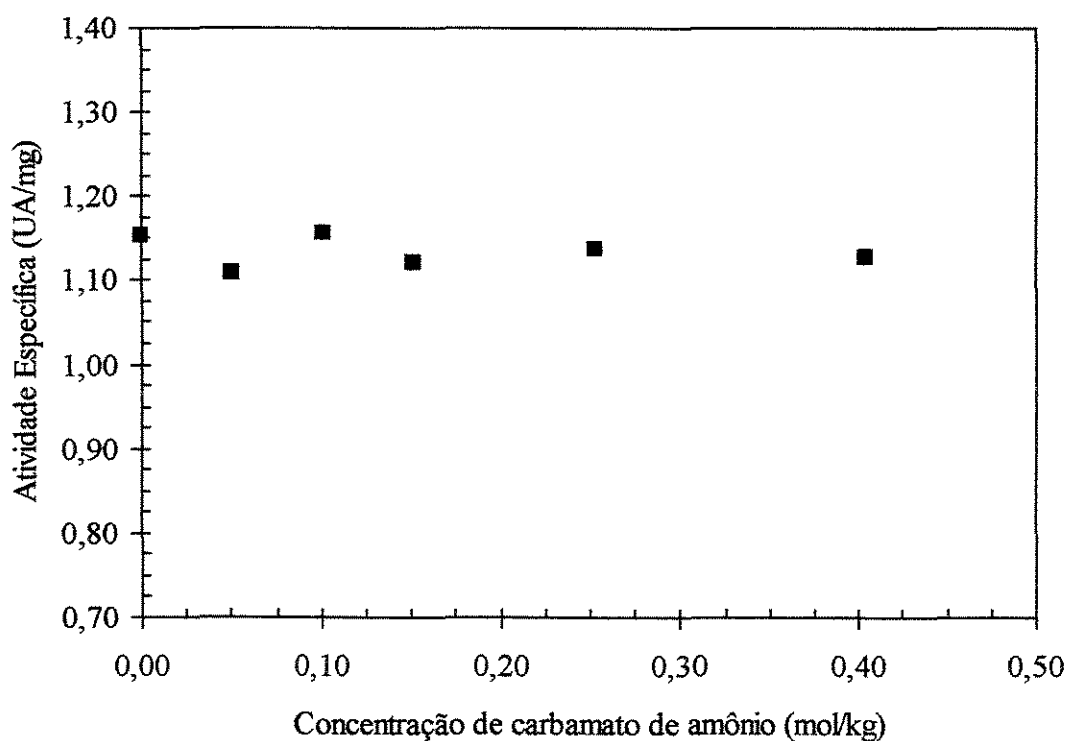


Figura 4.4: Influência do sal carbamato de amônio na atividade da tripsina utilizando-se BApNA como substrato a uma temperatura de 25°C. Concentração de tripsina 240 µg/mL em solução HCl 0,001 N.

4.1.5. Determinação da estabilidade da tripsina em solução de carbamato de amônio

A verificação da influência do sal na estabilidade da tripsina com o tempo se fez necessária devido à possibilidade de autólise da tripsina, fato este que ocorre de modo mais intenso no seu pH ótimo igual a 8,0, e também devido a ação desnaturante do sal volátil. Como a solução de carbamato de amônio possui pH aproximadamente igual a 10,0, seu caráter altamente básico favorece a autólise da tripsina e, conseqüentemente a perda de atividade da mesma. Desta maneira, procederam-se os ensaios de atividade da enzima em soluções de carbamato de amônio de concentração 5,1 e 8,1 mol/kg com concentração de tripsina de 4,0 mg/mL, de tal modo que não ocorresse a separação de uma fase sólida na solução.

A determinação da atividade da tripsina foi realizada após intervalos de tempo pré-determinados em que a proteína esteve em solução de sal volátil (Figura 4.5) até o tempo de 24 h, pois é o período suficiente para que o sistema alcance o equilíbrio. Observou-se que para a concentração de carbamato de amônio de 5,1 mol/kg ocorreu um decréscimo da atividade da proteína em aproximadamente 5% enquanto que na concentração de sal de 8,1 mol/kg esta redução foi de 10% até o tempo de 10 horas.

Comparando-se as atividades da tripsina em solução de carbamato de amônio e em solução de HCl 0,001 mol/L e pH 3,0, verificou-se que após 24 h o sal, a concentrações de 5,1 e 8,1 mol/kg, ocasionou uma perda de atividade significativa da proteína de aproximadamente 16 e 18%, respectivamente. Apesar da diminuição da atividade da tripsina, este resultado não pode ser considerado ruim ao se comparar com a perda de atividade obtida por Simon *et al.* (2001) que foi de 78% para a tripsina em solução pH 9,0 após 1 hora e pelos resultados relatados por Wu *et al.* (1982) que determinaram 30 minutos como o tempo necessário para que a tripsina perdesse metade da sua atividade em solução de barbital a pH 8,2. Desta maneira, mesmo em condições desfavoráveis como elevado pH do sal volátil e tempo de contato prolongado da tripsina em solução de sal, os dados parecem sugerir que o carbamato de amônio é um sal não fortemente desnaturante de tripsina e que permitiu uma boa recuperação de atividade da proteína.

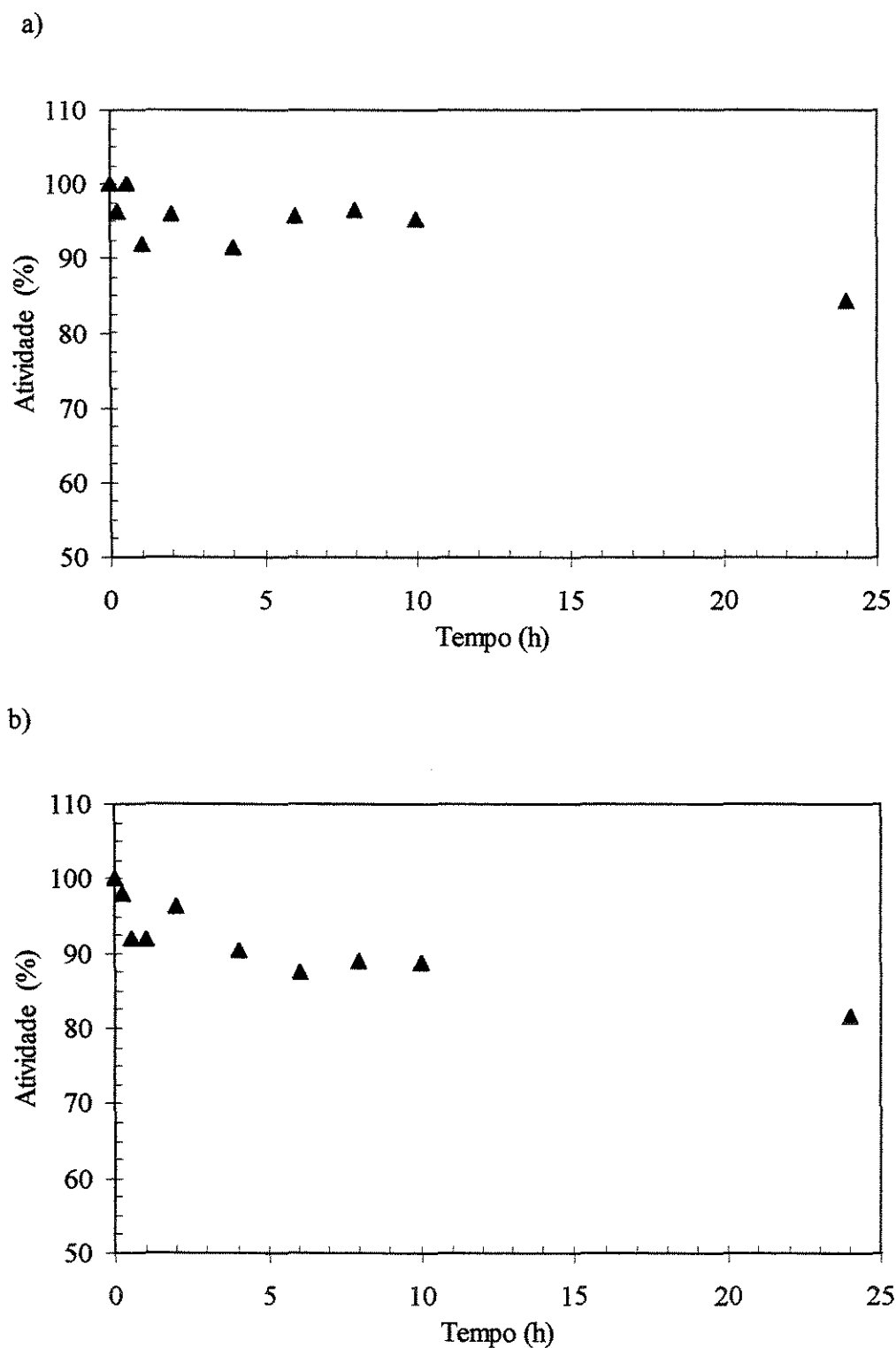


Figura 4.5: Atividade da tripsina em solução de carbamato de amônio a concentrações de (a) 5,1 mol/kg; (b) 8,1 mol/kg, a temperatura de 25°C. Concentração de tripsina de 4,0 mg/mL; atividade específica no tempo inicial igual a 1,11 UA/mg.

4.1.6. Determinação da estabilidade da tripsina em solução de Trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH

A possibilidade de ocorrência de autólise da tripsina em soluções de caráter básico foi avaliada através de ensaios de atividade da enzima em soluções de trietanolamina-HCl, tida como não desnaturante de proteína, a diferentes valores de pH. A determinação da atividade da tripsina foi realizada no tempo inicial e após 1 hora em que a proteína esteve em solução de pH 7,8, 8,5, 9,0, 9,5 e 10,0 (Figura 4.6). Este estudo deve auxiliar a compreensão sobre o comportamento desnaturante ou não do sal carbamato de amônio.

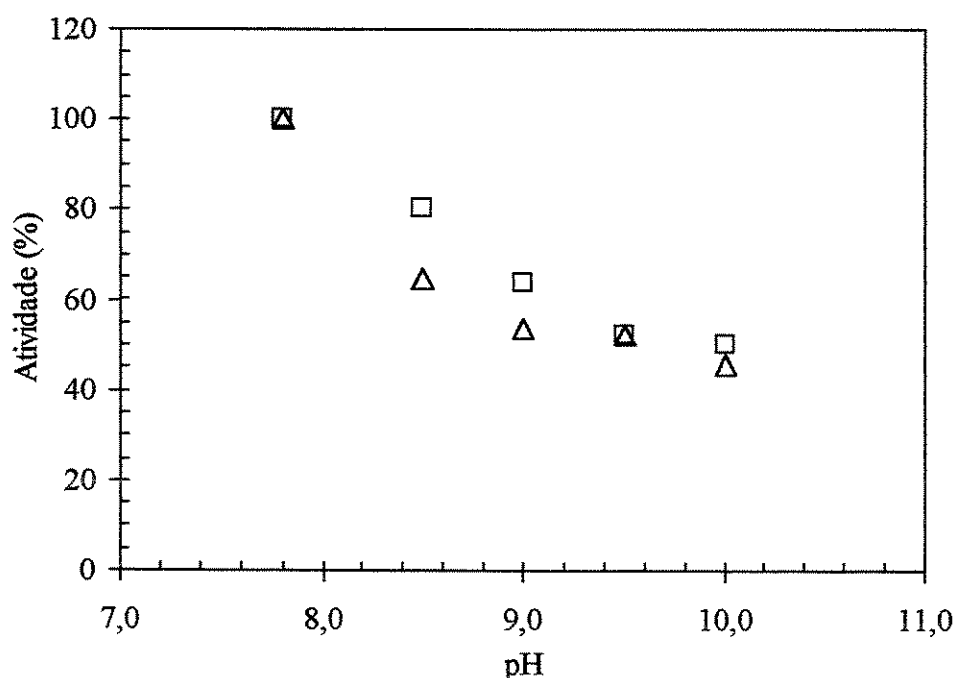


Figura 4.6: Atividade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH no tempo inicial, □ e após 1 hora, Δ; a temperatura de 25°C. Concentração de tripsina de 4,0 mg/mL; atividade específica em pH igual a 7,8 de 1,11 UA/mg.

Observou-se que com o aumento dos valores de pH da solução de trietanolamina-HCl ocorreu uma diminuição da atividade da tripsina tanto para o tempo inicial como após 1 hora. A proximidade dos valores de atividade de tripsina no tempo inicial e após 1 hora

indica a ocorrência de desnaturação por pH devido ao desnovelamento da proteína, pois somente uma diferença significativa entre os valores de atividade de tripsina indicaria a ocorrência de autólise da proteína. Comparando-se as atividades da tripsina em solução de HCl 0,001mol/L e pH 3,0 e em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L e pH 10,0, verificou-se que o elevado pH levou a uma perda de aproximadamente 50% da atividade da proteína em ambos os tempos estudados, provavelmente devido à desnaturação por pH da tripsina. Comparando-se ainda a atividade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl a pH 10,0 e a solução de carbamato de amônio (item 4.1.5), verificou-se que, embora o pH da solução de sal volátil seja próximo a 10,0, ele não favorece a desnaturação da enzima, pois a diminuição de sua atividade foi mínima no mesmo intervalo de tempo.

4.2. PRECIPITAÇÃO DE TRIPSINA COM CARBAMATO DE AMÔNIO

4.2.1. Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio

As concentrações de tripsina na fase sobrenadante, representando a solubilidade da proteína, foram determinadas a 4°C em função da concentração total de carbamato de amônio. A curva de solubilidade da tripsina em solução de carbamato de amônio (Figura 4.7) mostrou uma diminuição da concentração de proteína na fase sobrenadante com o aumento da concentração de sal, evidenciando o efeito “salting-out” na precipitação da proteína.

A curva de solubilidade foi determinada a partir de diversas concentrações de proteína (10, 20, 30 e 40 mg/mL). Neste trabalho, como era esperado, a concentração inicial de tripsina não teve influência sobre a solubilidade da proteína na fase sobrenadante, diferentemente do que foi relatado por Shih *et al.* (1992) que observaram uma variação da solubilidade da quimotripsina e da albumina de soro bovino (BSA) em solução de fosfato de sódio de duas a três vezes com a alteração da concentração inicial de proteína.

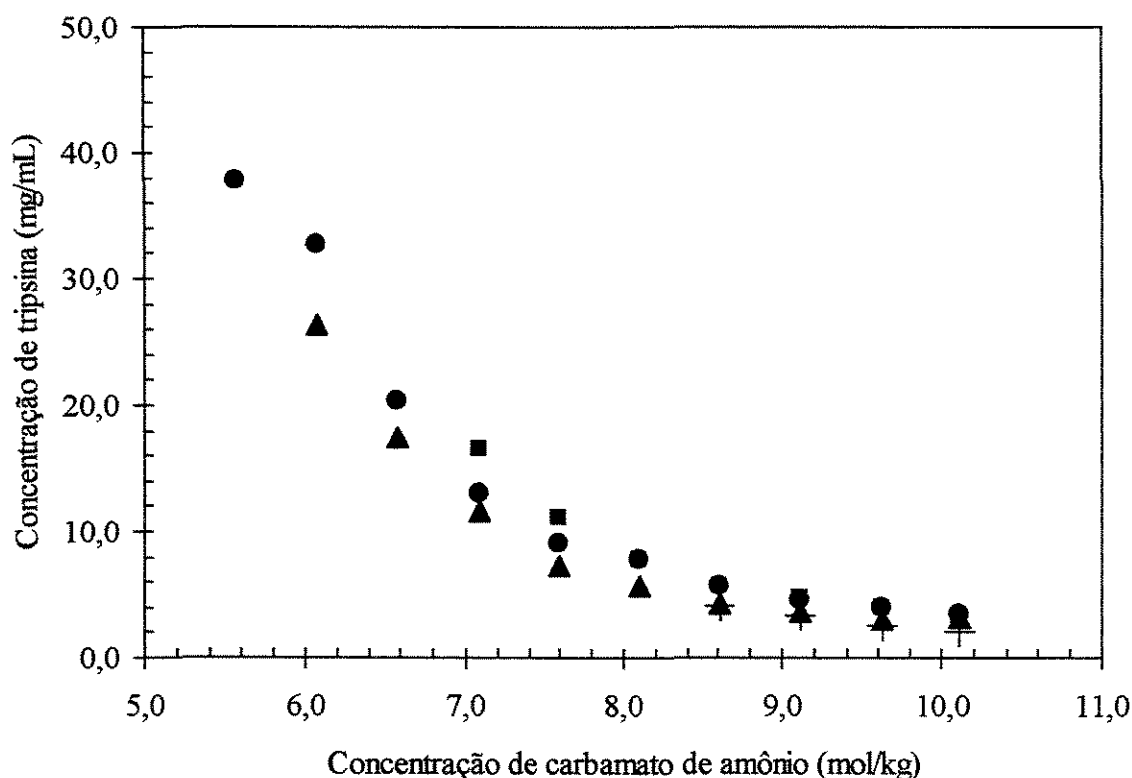


Figura 4.7: Solubilidade da tripsina em soluções de carbamato de amônio a 4°C; $R_{N/C}$ igual a 2,0; concentração de tripsina na alimentação: 10 mg/mL, +; 20 mg/mL, ■; 30 mg/mL, ▲; 40 mg/mL, ●.

A validade do método de medida de concentração por absorção pode ser verificada pela Figura 4.8, em que se apresenta a concentração de tripsina na fase precipitada, determinada pela medida de absorbância a 280 nm, em função do valor esperado pelo balanço de massa (valor obtido subtraindo-se da massa inicial de tripsina a massa de proteína da fase sobrenadante determinada por medida de absorbância). Observa-se que os pontos experimentais aproximam-se da reta da função identidade indicando que os valores de concentração de proteína na fase sólida determinados por absorbância a 280 nm são praticamente idênticos àqueles calculados através do balanço.

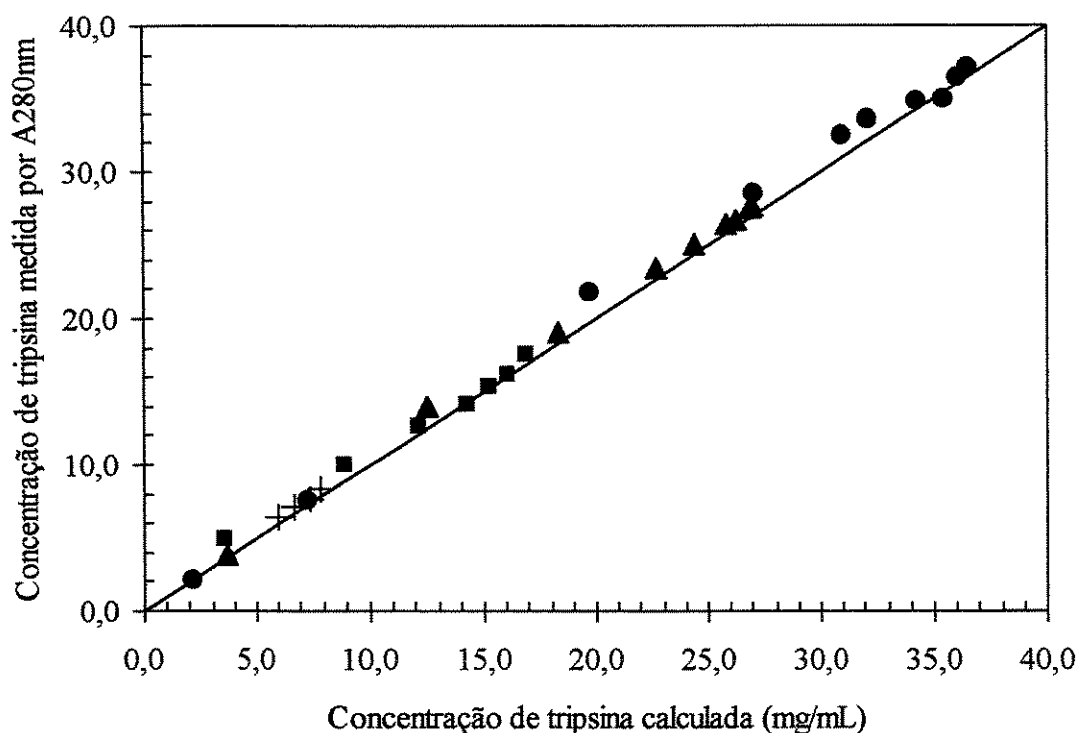


Figura 4.8: Comparação entre as concentrações de tripsina determinadas por balanço de massa e por medida de absorvância a 280 nm; concentração de tripsina na alimentação: 10 mg/mL, +; 20 mg/mL, ■; 30 mg/mL, ▲; 40 mg/mL, ●.

As concentrações de proteína determinadas por absorção a 280 nm foram confirmadas por análise de massa de tripsina na fase sobrenadante e na fase precipitado por secagem através de liofilização. Neste ensaio foram utilizadas apenas amostras de concentração inicial de 10 e 20 mg/mL. A Figura 4.9 apresenta as massas de tripsina das amostras na fase sobrenadante medidas por absorvância e por medida direta de massa das amostras após liofilização. Observou-se que a diferença entre os valores de massa obtidos por absorvância e por liofilização foi pequena (desvio médio de 0,15 mg para concentração de 10 mg/mL e de 1,4 mg para concentração de 20 mg/mL) e estatisticamente não significativa com intervalo de confiança de 95%, validando assim o método de medida de concentração da fase sobrenadante da proteína por absorvância a 280 nm. Uma vez que se

comprovou a ausência da influência do sal na medida de absorbância, a determinação da concentração de tripsina foi realizada apenas por absorbância a 280 nm no restante deste trabalho.

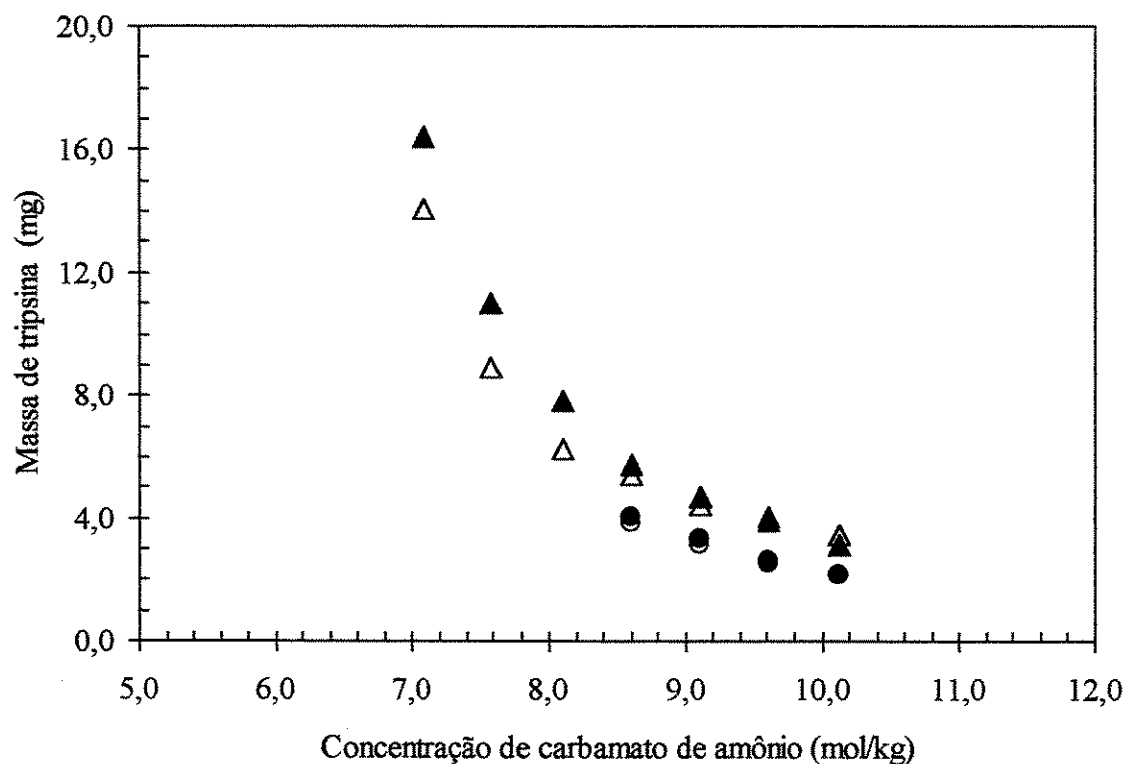


Figura 4.9: Comparação das medidas de massa da tripsina na fase sobrenadante, de precipitações a 4°C, realizadas por absorbância a 280 nm (símbolos “cheios”) e por liofilização (símbolos “vazados”). Concentrações de tripsina: 10 mg/mL, ●e ○; 20 mg/mL, ▲e △.

4.2.2. Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sal volátil, $R_{N/C}$ igual a 2,5

Para avaliação do efeito do parâmetro de razão entre as quantidades totais de nitrogênio e carbono dos sais voláteis ($R_{N/C}$), determinou-se a curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 (Figura 4.10). Neste ensaio, utilizou-se apenas uma solução de tripsina de concentração igual a 40 mg/mL. Para efeito de comparação entre as soluções de diferentes $R_{N/C}$, a concentração de sal de razão igual a 2,5 é descrita em função da quantidade de dióxido de carbono.

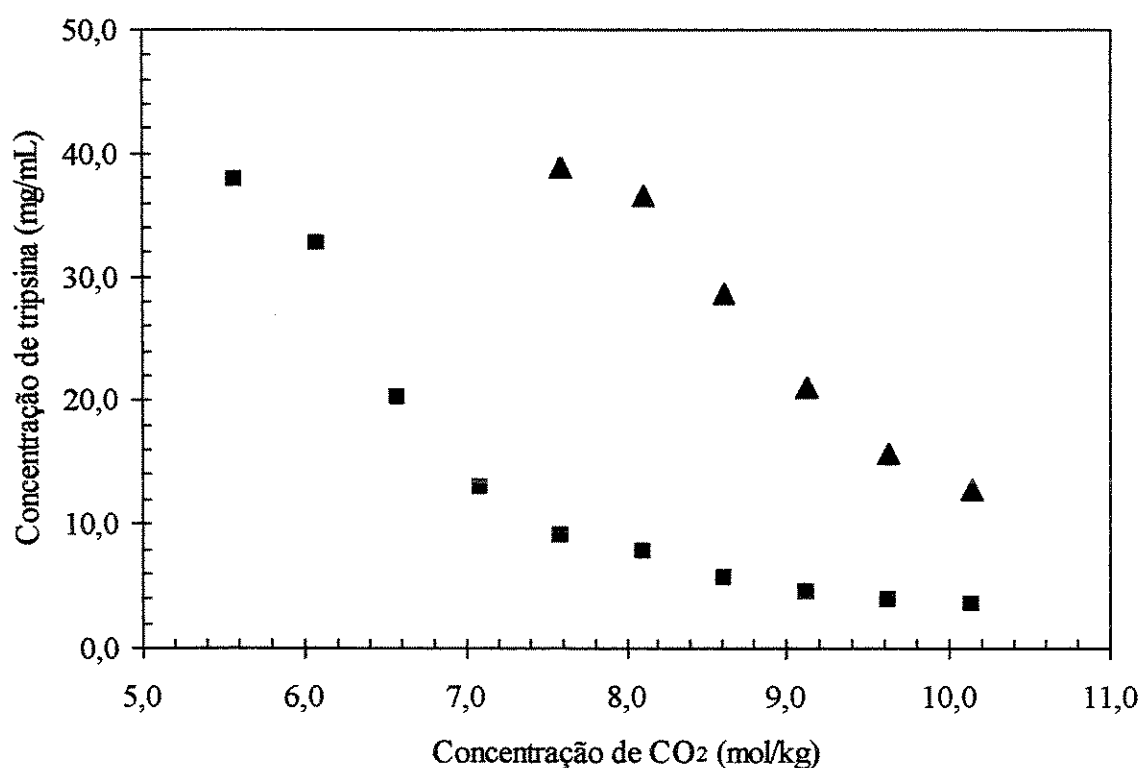


Figura 4.10: Variação do parâmetro razão entre as quantidades totais de nitrogênio e carbono ($R_{N/C}$) do sal volátil na precipitação a 4°C de solução de tripsina de concentração de 40 mg/mL; carbamato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 2,0, ■; solução de $R_{N/C}$ igual a 2,5, ▲.

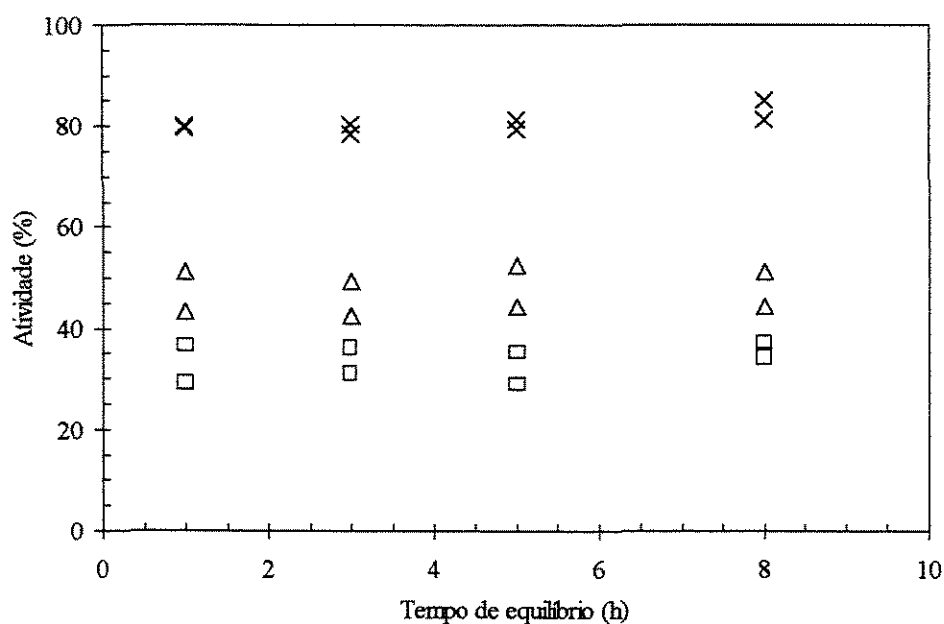
Observou-se que de forma análoga à precipitação de proteína com o sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,0, ocorre uma redução da concentração de tripsina na fase sobrenadante com aumento da concentração de carbamato de amônio. Apesar da verificação do efeito “salting-out” na precipitação da proteína com a solução de $R_{N/C}$ igual a 2,5, os resultados de precipitação não se mostraram efetivos como aqueles obtidos com o sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,0; para a concentração de dióxido de carbono de 9,1 mol/kg, tem-se aproximadamente 90% de proteína precipitada utilizando-se carbamato de amônio e com o uso da solução de sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 este percentual é reduzido para 50%.

Uma possível explicação para esse fato está na concentração de íons carbonato (CO_3^{2-}) em solução. Para altas concentrações de sal, a concentração de carbonato é proporcionalmente maior para uma razão $R_{N/C}$ igual a 2,0. Um aumento na concentração de amônia faz com que parte dos íons carbonato se converta a carbamato (Lichtfers, 2000), o que em princípio faz com que a capacidade de induzir o “salting-out” diminua, pois o íon carbonato é um íon bivalente de tamanho próximo ao carbamato, e um aumento na densidade de cargas é, de modo geral, relacionado um aumento na capacidade de induzir o “salting-out”.

4.2.3. Balanços de atividade enzimática de tripsina e de massa de proteína precipitada em solução de carbamato de amônio

A determinação conjunta do balanço de atividade de tripsina e de massa da proteína proveniente da precipitação com carbamato de amônio foi realizada em duplicata para as concentrações de sal de 7,1 e 9,1 mol/kg com tempos de equilíbrio de 1, 3, 5 e 8 horas (Figuras 4.11 e 4.12). Observou-se que para uma mesma concentração de sal volátil, as atividades e as quantidades de tripsina obtidas tanto em solução como em fase sólida foram praticamente iguais para todos os tempos de equilíbrio, indicando que o equilíbrio foi atingido em 1 hora. O fato do equilíbrio ser atingido tão rapidamente é bastante importante neste trabalho, pois isto significa um tempo menor da proteína em solução de sal carbamato de amônio e, conseqüentemente, uma redução da autólise e desnaturação da tripsina.

(a)



(b)

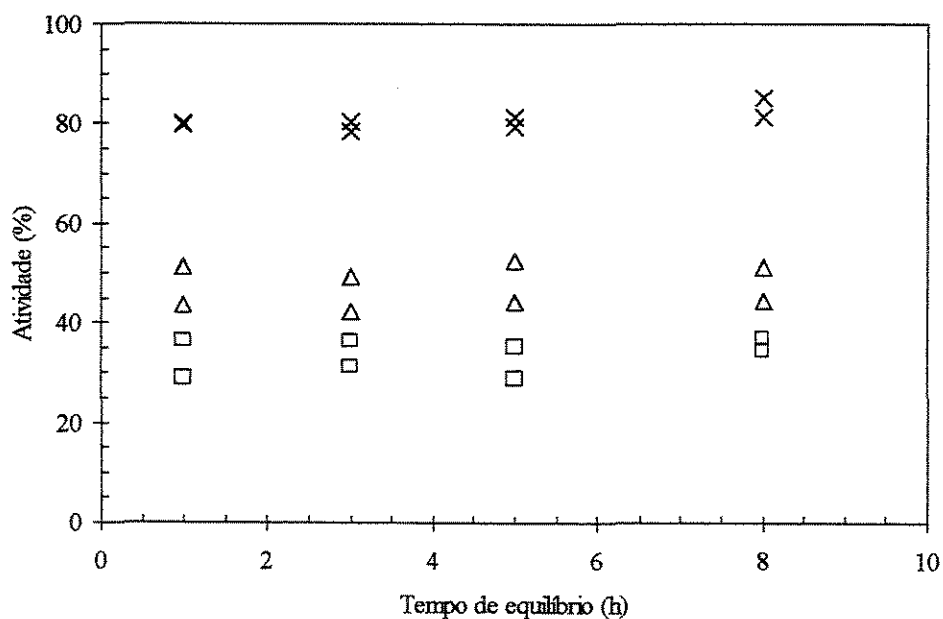
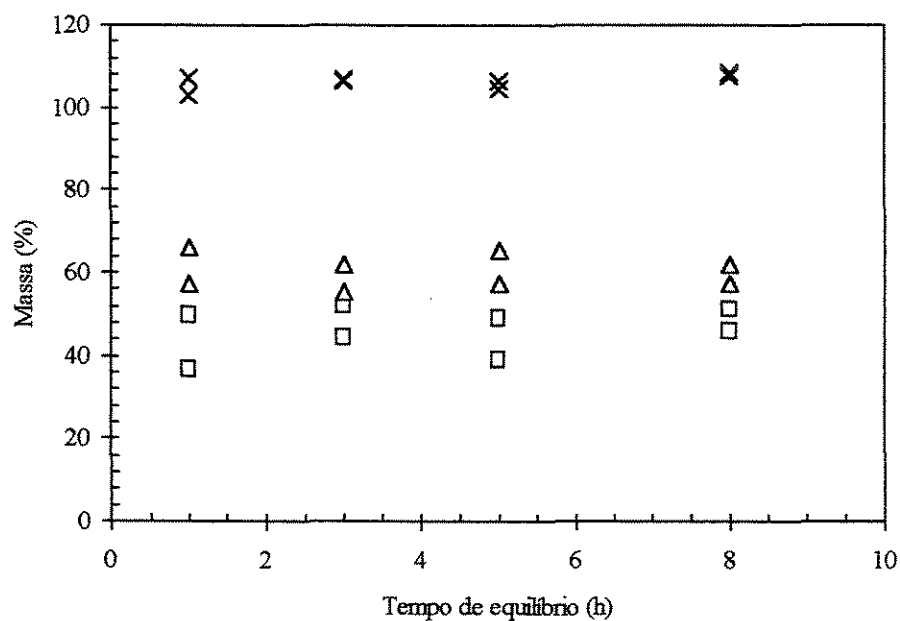


Figura 4.11: Balanço de atividade da tripsina precipitada com carbamato de amônio, $R_{N/C}$ igual a 2,0 a concentrações de (a) 7,1 mol/kg; (b) 9,1 mol/kg a 25°C em duplicata a diferentes tempos de equilíbrio e em relação à atividade alimentada, □: fase sobrenadante; Δ: precipitado; X: atividade total recuperada.

(a)



(b)

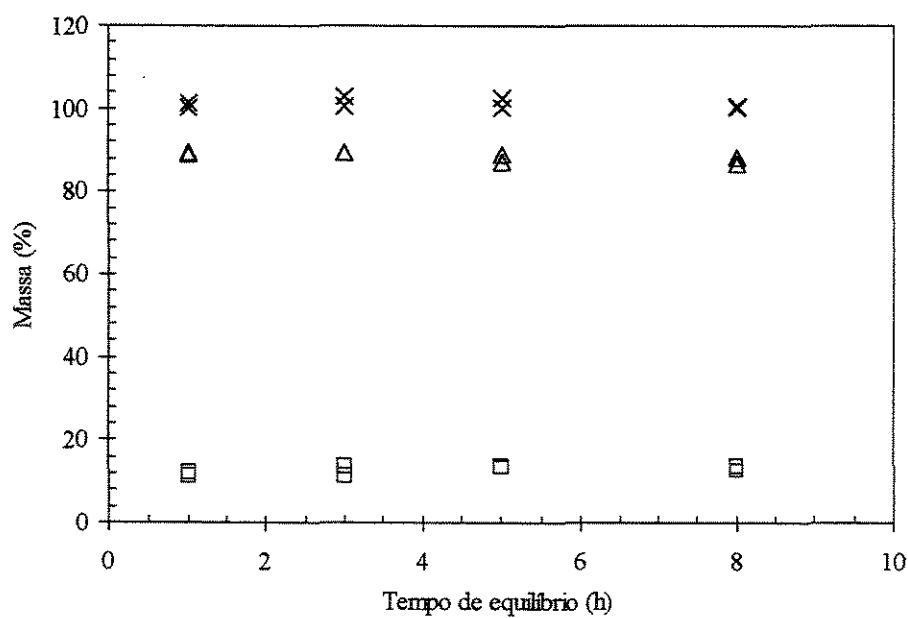


Figura 4.12: Balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio, $R_{N/C}$ igual a 2,0 a concentrações de (a) 7,1 mol/kg e (b) 9,1 mol/kg a 25°C em duplicata a diferentes tempos de equilíbrio e em relação à massa alimentada, $\square$: fase sobrenadante; Δ : precipitado; $\times$: massa final recuperada.

Uma vez que os diferentes tempos de envelhecimento não afetaram a recuperação de atividade e de massa de tripsina nas fases ‘precipitado’ e ‘sobrenadante’, pode-se resumir os resultados pela média dos valores obtidos nas oito precipitações realizadas (Tabelas 4.1 e 4.2). Verificou-se que a perda de atividade da tripsina ocorreu tanto na fase sólida como em solução, nas concentrações de sal de 7,1 e 9,1 mol/kg, pois em ambas as fases a recuperação de atividade foi mais baixa que a recuperação de proteína. Observou-se também uma redução da atividade total da tripsina precipitada com carbamato de amônio quando comparada àquela alimentada (atividade alimentada para concentração de sal de 7,1 mol/kg foi de 33,26 UA e para a concentração de 9,1 mol/kg foi de 22,24 UA). Esta diminuição foi de aproximadamente 20%, igualmente para a tripsina em presença de carbamato de amônio nas concentrações de 7,1 e 9,1 mol/kg. Este resultado não era esperado já que se verificou uma perda de aproximadamente 5 a 10% quando a tripsina encontrava-se em solução de sal por até 8 horas como mostrado no item 4.1.5.

Tabela 4.1: Balanços de atividade de tripsina precipitada, em termos de unidades de atividade (UA), com carbamato de amônio $R_{N/C}$ igual a 2,0 a 4 °C

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Fase Sobrenadante	Fase Precipitado	Recuperação Total
7,1	$11,1 \pm 1,2$ ³	$15,8 \pm 1,3$	$26,9 \pm 0,7$
	(33%) ⁴	(48%)	(81%)
9,1	$1,3 \pm 0,1$	$16,4 \pm 0,4$	$17,7 \pm 0,3$
	(6%)	(74%)	(80%)

³ Os valores de massa e atividade de tripsina referem-se à média de oito ensaios $\pm$ desvio padrão.

O balanço de massa determinado em tempos de envelhecimento de 1, 3, 5 e 8 horas, mostrou uma recuperação de proteína muito próxima à concentração inicial utilizada (30 mg/mL para concentração de carbamato de amônio de 7,1 mol/kg e 20 mg/mL para 9,1 mol/kg) considerando-se as incertezas experimentais. Comparou-se também este balanço de massa (Tabela 4.2) com a curva de solubilidade (Figura 4.7) e verificou-se uma proximidade dos resultados obtidos. Na curva de solubilidade determinou-se 3,5 mg de tripsina para concentração de sal de 9,1 mol/kg e 13,7 mg para a concentração de sal de 7,1 mol/kg, enquanto que pelo balanço de massa tem-se 2,5 mg e 13,8 mg de tripsina para concentração de sal de 9,1 e 7,1 mol/kg respectivamente, demonstrando que de fato o tempo de equilíbrio não afetou a recuperação de massa, já que o ensaio de determinação da curva de solubilidade foi realizado em 24 horas.

Tabela 4.2: Balanços de massa de proteína precipitada, em miligramas, com carbamato de amônio, $R_{N/C}$ igual a 2,0 a 4 °C.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Fase Sobrenadante	Fase Precipitado	Recuperação Total
7,1	$13,8 \pm 1,71$ ¹	$18,1 \pm 1,2$	$31,9 \pm 0,6$
	(46%) ⁵	(60%)	(106%)
9,1	$2,5 \pm 0,2$	$17,8 \pm 0,3$	$20,3 \pm 0,3$
	(13%)	(89%)	(102%)

⁴ Valores em porcentagem representam fração em relação à quantidade alimentada. Atividade alimentada para concentração de sal de 7,1 mol/kg foi de 33,26 UA e para a concentração de 9,1 mol/kg foi de 22,24 UA.

⁵ Valores em porcentagem representam fração em relação à quantidade alimentada. Massa alimentada de 30 mg para concentração de carbamato de amônio de 7,1 mol/kg e 20 mg para 9,1 mol/kg.

4.2.4. Precipitação de tripsina com sulfato de amônio e comparação dos dados com a precipitação com o sal volátil

A precipitação da tripsina foi realizada a 4°C com sulfato de amônio, o sal mais utilizado em precipitação de proteínas, em concentrações de 1,9, 2,7 e 3,8 mol/kg e tempo de envelhecimento de 1 hora (Tabelas 4.3 e 4.4). Observou-se que a atividade total recuperada da tripsina aproximou-se da atividade alimentada (33,3 UA) com a diminuição da concentração de sulfato de amônio. Análises estatísticas comprovaram que as atividades totais recuperadas para as concentrações de sal de 1,9 e 2,7 mol/kg são estatisticamente iguais para um intervalo de confiança de 95%; assim, para a concentração de 1,9 mol/kg há uma redução de até 6% da atividade demonstrando que de fato o sulfato de amônio não favorece a desnaturação da tripsina. O resultado obtido foi de acordo com o esperado já que, como relatado por Dias e Rogana (1986), a perda de atividade pode chegar a 5,0% mesmo em pH 3,0, tido como condição estável.

Para uma concentração de 3,8 mol/kg de sulfato de amônio, verificou-se uma diminuição da atividade total recuperada de cerca de 10%, estatisticamente significativa para um intervalo de confiança de 95%. A redução da atividade da tripsina com aumento da concentração de sulfato de amônio pode ter sido ocasionada pela ocorrência de autólise, em virtude da elevada quantidade de proteína precipitada. Isto porque a fase precipitado (como ocorreria com qualquer outra proteína nessas circunstâncias) constitui um colóide altamente concentrado em tripsina, o que nesse caso específico pode ocasionar perda de atividade por autólise. Esse resultado sugere que uma recuperação de atividade de 100% de tripsina é um objetivo inexecutável.

A quantificação da massa de tripsina nas fases sobrenadante e precipitado (Tabela 4.4) apresentou o aumento da quantidade de proteína na fase sólida com a elevação da concentração de sal, evidenciando o efeito “salting-out” ocasionado pelo sulfato de amônio, em que aproximadamente 100% da proteína foi precipitada para uma concentração de sal de 3,8 mol/kg.

Comparando-se a recuperação de atividade da tripsina precipitada com o sal sulfato de amônio de concentração de 2,7 mol/kg (Tabela 4.3) em relação à determinada com carbamato de amônio de concentração 9,1 mol/kg (Tabela 4.1) observou-se que a precipitação com o sal volátil levou a uma perda de aproximadamente 20% da atividade

enzimática da tripsina, possivelmente devido tanto à ocorrência de alguma desnaturação da proteína pelo elevado pH do sal volátil quanto por autólise da fração não desnaturada ⁶.

A recuperação de massa de proteína foi de 95% para a concentração de sulfato de amônio de 2,7 mol/kg enquanto que para a concentração de carbamato de amônio foi de 89%.

Tabela 4.3: Balanços de atividade de tripsina precipitada, em termos de unidades de atividade (UA), com sulfato de amônio a 4°C

Concentração de sulfato de amônio (mol/kg)	Fase Sobrenadante	Fase Precipitado	Recuperação Total
1,9	$22,3 \pm 0,1^7$	$10,7 \pm 0,2$	$32,9 \pm 0,2$
	(67%) ⁸	(32%)	(99%)
2,7	$1,6 \pm 0,2$	$29,6 \pm 0,9$	$31,1 \pm 0,7$
	(5%)	(89%)	(94%)
3,8	$0,4 \pm 0,8$	$29,6 \pm 0,7$	$30,0 \pm 0,1$
	(1%)	(89%)	(90%)

⁶ A comparação das atividades da tripsina foi realizada com as concentrações de carbamato de amônio de 9,1 e de sulfato de amônio de 2,7 mol/kg, pois se observa que concentrações maiores dos sais não implicam em maior recuperação de massa ou atividade.

⁷ Os valores de atividade e massa de tripsina referem-se à média de dois ensaios $\pm$ desvio padrão.

⁸ Valores em porcentagem representam fração em relação à quantidade alimentada. Atividade alimentada foi de 33,33UA.

Tabela 4.4: Balanços de massa de proteína precipitada, em miligramas, com sulfato de amônio a 4°C

Concentração de sulfato de amônio (mol/kg)	Fase Sobrenadante	Fase Precipitado	Recuperação Total
1,9	18,3 ± 0,1	11,7 ± 0,7	30,0 ± 0,7
	(61%) ⁹	(39%)	(100%)
2,7	2,0 ± 0,2	28,6 ± 0,2	30,6 ± 0,1
	(7%)	(95%)	(102%)
3,8	0,6 ± 0,7	29,4 ± 0,3	30,0 ± 1,0
	(2%)	(98%)	(100%)

4.2.5. Avaliação do nível de autólise da tripsina através de Eletroforese-SDS PAGE

A redução da atividade enzimática da tripsina em 20% após a precipitação com carbamato de amônio indicou a necessidade de investigação da ocorrência de eventual autólise da proteína e do efeito desnaturante do sal volátil. A Figura 4.13 mostra o perfil protéico obtido por eletroforese SDS-PAGE da tripsina a pH 3,0, condição de autólise mínima, e tripsina precipitada com carbamato de amônio e sulfato de amônio. Comparando-se as linhas 3 e 4, verificou-se que as fases precipitados com sulfato de amônio e carbamato de amônio apresentaram praticamente a mesma quantidade de proteína abaixo de 23 kDa, a massa molecular da tripsina. O mesmo fato é verificado comparando-se as linhas 5 e 6 (fases sobrenadantes). Isto indica que a tripsina precipitada com sulfato de amônio apresenta o mesmo nível de autólise quando comparada à precipitada com carbamato de amônio, na fase sobrenadante como no precipitado. Quando analisados em conjunto com os dados anteriores sobre o balanço de atividade (Tabelas 4.1 e 4.3), estes resultados confirmam que a perda de atividade notada para a tripsina precipitada com

⁹ Valores em porcentagem representam fração em relação à quantidade alimentada. Massa alimentada de 30,0 mg.

carbamato de amônio se dá por desnovelamento e não por autólise, embora se deva reafirmar que o mecanismo pode não ser tão simples quanto possa parecer à primeira vista: a perda de atividade deve ser relacionada ao pH, mas é substancialmente inferior à esperada, como visto na seção 4.1.6.

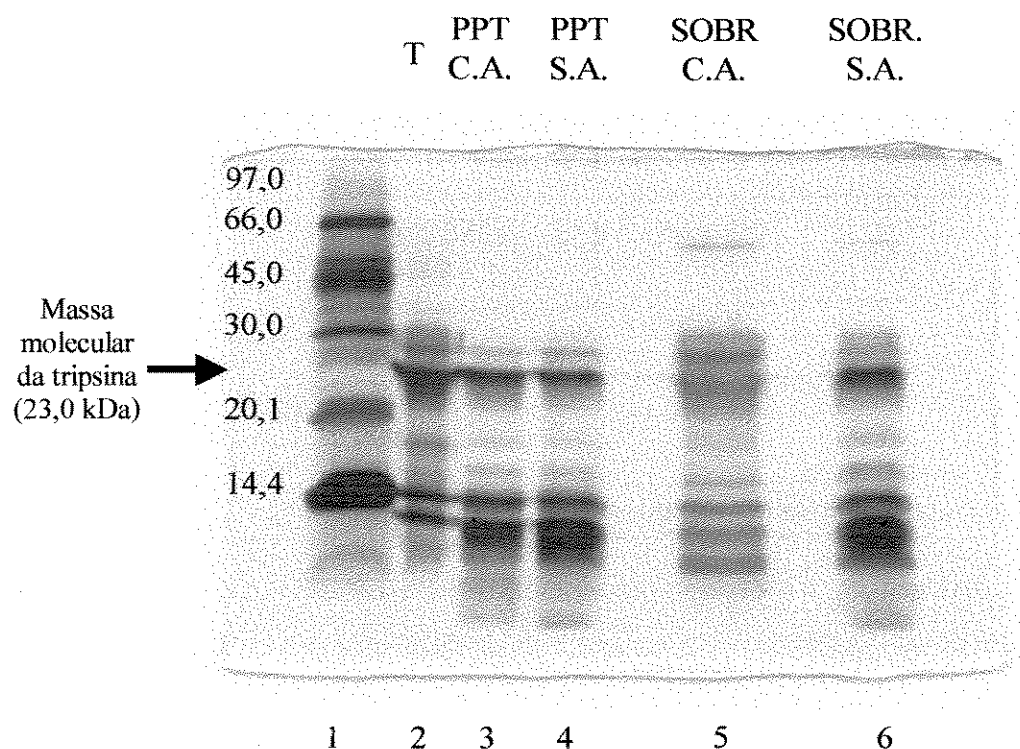


Figura 4.13: SDS-PAGE (gel 15%) de tripsina precipitada a 4°C com carbamato de amônio e sulfato de amônio. Volume injetado em cada pista de 10 μ L de proteína de concentração 1,0 mg/mL. **Linha 1**, marcadores de massa molecular; **linha 2**, tripsina a pH 3,0; **linha 3**, precipitado da tripsina em solução de carbamato de amônio (7,1 mol/kg); **linha 4**, precipitado da tripsina em solução de sulfato de amônio (1,9 mol/kg); **linha 5**, sobrenadante da tripsina em solução de carbamato de amônio (7,1 mol/kg); **linha 6**, sobrenadante da tripsina em solução de sulfato de amônio (1,9 mol/kg).

4.3. REMOÇÃO DO SAL VOLÁTIL CARBAMATO DE AMÔNIO APÓS A PRECIPITAÇÃO DE TRIPSINA

A remoção do sal volátil carbamato de amônio, após a precipitação de tripsina, foi realizada através do método de redução da pressão. Uma vez que o carbamato de amônio foi retirado das fases sobrenadante e precipitado, realizou-se a determinação do balanço de atividade de tripsina e de massa de proteína das fases (Tabelas 4.5 e 4.6). Observou-se que houve uma redução da atividade da proteína quando comparada àquela obtida após a precipitação de tripsina com carbamato de amônio (aproximadamente 10% para a concentração de 7,1 mol/kg e 20% para a concentração de sal de 9,1 mol/kg). A recuperação de massa de tripsina foi de 100% demonstrando que o método de redução de pressão é factível para a retirada de todo o carbamato de amônio das fases precipitado e sobrenadante.

Tabela 4.5: Balanços de atividade de tripsina precipitada, em termos de unidades de atividade (UA), com carbamato de amônio $R_{N/C}$ igual a 2,0 a 4 °C após a remoção do sal volátil

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Fase Sobrenadante	Fase Precipitado	Recuperação Total
7,1	$14,5 \pm 2,2^{10}$	$8,9 \pm 2,3$	$23,5 \pm 0,1$
	(44%)	(26%)	(70%)
9,1	$2,2 \pm 0,4$	$11,7 \pm 1,1$	$13,9 \pm 0,7$
	(10%)	(52%)	(62%)

¹⁰ Os valores de atividade de tripsina após a remoção do sal volátil referem-se à média de dois ensaios $\pm$ desvio padrão para concentração de carbamato de amônio de 7,1 mol/kg e à média de três ensaios para concentração de sal de 9,1 mol/kg.

Tabela 4.6: Balanços de massa de proteína precipitada, em miligramas, com carbamato de amônio, $R_{N/C}$ igual a 2,0 a 4 °C após a remoção do sal volátil

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Fase Sobrenadante	Fase Precipitado	Recuperação Total
7,1	$16,0 \pm 0,6^{11}$	$14,3 \pm 0,8$	$30,4 \pm 0,2$
	(53%)	(47%)	(100%)
9,1	$2,9 \pm 0,3$	$17,5 \pm 0,2$	$20,4 \pm 0,1$
	(14%)	(86%)	(100%)

Os resultados apresentados anteriormente mostram que há uma perda de atividade associada ao processo de remoção do sal por abaixamento de pressão. Entretanto, deve-se notar que essa operação foi conduzida somente para demonstrar a viabilidade do processo, sem controle específico das condições de temperatura e pressão. A otimização da remoção do sal é possível, o que deve levar a maiores recuperações de atividade, mas seu estudo foge do escopo deste trabalho.

4.4. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA EQUAÇÃO DE COHN

A solubilidade da tripsina determinada experimentalmente pode ser expressa matematicamente pela expressão de Cohn (1925):

$$\log S = \beta - K_s I \quad (4.2)$$

em que S é a solubilidade da proteína em g/kg de água, I é a força iônica em mol de sal/kg de água, K_s é uma constante específica do sal e da proteína e β é uma constante que depende da temperatura, do pH e da proteína utilizada.

¹¹ Os valores de massa de tripsina referem-se à média de dois ensaios $\pm$ desvio padrão para concentração de carbamato de amônio igual a 7,1 mol/kg e à média de três ensaios para concentração de sal de 9,1 mol/kg.

A equação 4.2 também pode ser expressa de modo mais conveniente em termos da concentração de sal:

$$\log S = \beta' - K'_s C_{\text{sal}} \quad (4.3)$$

em que S é a solubilidade da proteína em miligramas por mililitro, C_{sal} é a concentração do sal em mol por quilograma de água, K'_s é uma constante específica do sal e da proteína e β' é uma constante que depende da temperatura, do pH e da proteína utilizada.

Na Figura 4.14 tem-se a curva de solubilidade da tripsina em função das concentrações de soluções de sulfato de amônio, carbamato de amônio e da solução de sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5; e na Tabela 4.7 apresentam-se os valores de K'_s e β' . Para a obtenção da Figura 4.14 procedeu-se a precipitação com sulfato de amônio em diferentes concentrações de sal e os resultados de precipitação com carbamato de amônio e solução de sal volátil utilizados foram apresentados em 4.2.1 e 4.2.2, respectivamente.

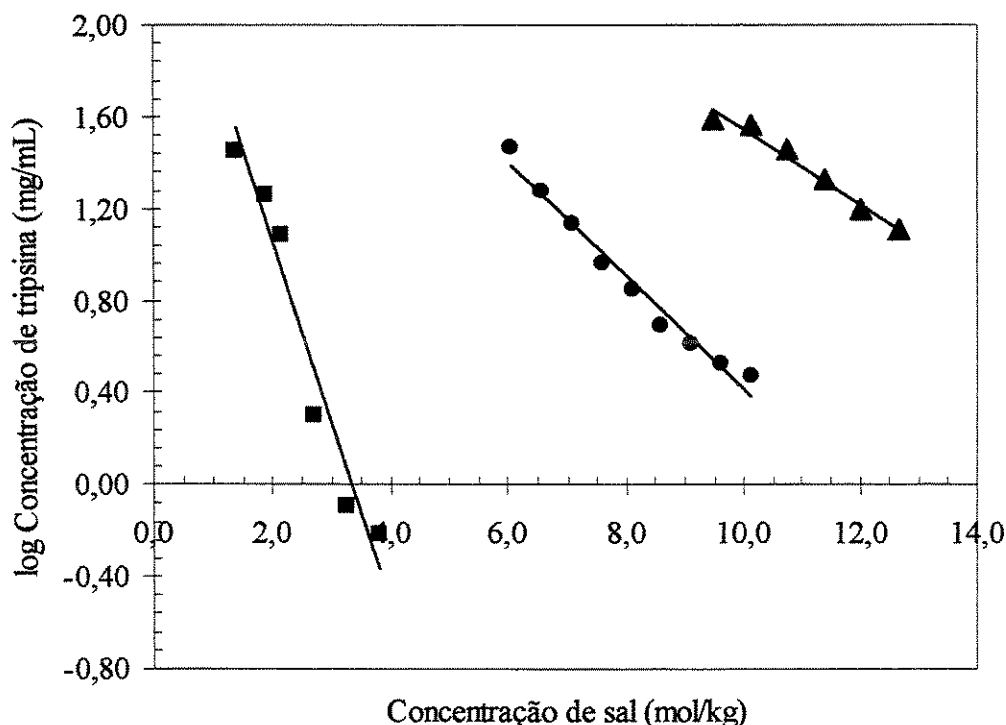


Figura 4.14: Solubilidade da tripsina suína a 4°C em solução de: carbamato de amônio de $R_{N/C}$ igual a 2,0, ●; sulfato de amônio, ■; sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5, ▲; concentração inicial de tripsina de 40 mg/mL em solução de carbamato de amônio e em sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 e de 30 mg/mL em solução de sulfato de amônio.

Tabela 4.7: Parâmetros β' e K'_s da equação de Cohn para tripsina em solução de carbamato de amônio e sulfato de amônio a 4°C.

Sal utilizado	K'_s	β'
Sulfato de amônio	0,78	2,62
Carbarnato de amônio ($R_{N/C}$ igual a 2,0)	0,25	2,96
Sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5	0,16	3,19

A constante K'_s pode ser relacionada às interações eletrostáticas no meio e à variação da tensão superficial pela presença do sal (Melander e Horváth, 1977) e constitui a base teórica da série de Hofmeister. Deste modo, um sal com alta capacidade de induzir o “salting-out” de uma proteína deve ter um elevado valor para a constante K'_s . Nos ensaios aqui apresentados o parâmetro K'_s apresentou valores distintos para as soluções salinas utilizadas, sendo que a solução de sulfato de amônio apresentou o maior valor para o parâmetro K'_s seguido pelo sal carbarnato de amônio e o sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5, respectivamente. Estes resultados indicam uma menor efetividade de precipitação de proteína por parte dos sais voláteis comparando-se com a solução de sulfato de amônio. O parâmetro β' , que varia independentemente da natureza do sal usado, mas é influenciado pela proteína, pH e temperatura, apresentou valores relativamente próximos, mas não totalmente iguais uma vez que os valores de pH das soluções salinas são diferentes (pH da solução de sulfato de amônio é igual a 5,4, de carbarnato de amônio é aproximadamente igual a 10,0, e da solução de sal volátil de $R_{N/C}$ igual a 2,5 é aproximadamente 10,5).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

5.1. CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objetivo o estudo da precipitação por “salting-out” de tripsina suína com o uso do sal volátil carbamato de amônio. Para tal, foram realizados ensaios preliminares de determinação da concentração de proteína, atividade enzimática e estabilidade da tripsina. Posteriormente foram determinados: a solubilidade da tripsina, balanços de massa e atividade enzimática e comparação com sulfato de amônio, avaliação do nível de autólise e, finalmente, a remoção do sal volátil.

A principal conclusão resultante deste trabalho foi: que o sal volátil carbamato de amônio foi capaz de induzir a precipitação por “salting-out” da tripsina. A recuperação da atividade enzimática da tripsina precipitada com o sal volátil tanto para a concentração de sal de 7,1 como 9,1 mol/kg apresentou-se igual a 80%, possivelmente devido à desnaturação pelo elevado pH do carbamato de amônio (pH cerca de 9,8). Porém, este efeito desnaturante não se mostrou demasiado elevado quanto ao obtido com a tripsina em solução de trietanolamina-HCl a pH 10,0 em que a redução da atividade enzimática foi de aproximadamente 50%. A remoção do sal volátil foi realizada com abaixamento de pressão e a retirada total do sal foi observada, o que demonstrou que o método é factível e, portanto, é possível a utilização do carbamato de amônio. Ensaio de atividade de tripsina após a remoção do carbamato de amônio indicaram uma redução da atividade enzimática em 30%, o que indica que existe uma perda de atividade associada ao método de remoção do sal volátil tal como utilizado.

Outras conclusões relevantes obtidas foram:

- a) O acréscimo da proporção de amônia não ajudou a diminuir a solubilidade da proteína;
- b) Para a determinação da atividade enzimática da tripsina foi necessário observar a faixa operacional da taxa de reação de hidrólise do substrato. Duas faixas de valores foram obtidas e optou-se por aquela entre 0,04 e 0,20 min⁻¹ por apresentar menor desvio e pela maior diluição requerida, o que diminui a interferência do sal na medida de atividade enzimática;
- c) O sal carbamato de amônio em concentrações inferiores a 0,40 mol/kg mostrou não ter influência sobre a atividade enzimática da tripsina pelo método de reação de hidrólise do substrato BApNA;
- d) A tripsina apresentou uma pequena diminuição da atividade em solução de carbamato de amônio após 10 horas a 4°C. Após 24 horas, verificou-se uma perda da atividade total de 16 e 18% para concentrações de sal de 5,1 e 8,1 mol/kg, respectivamente;
- e) A concentração inicial de tripsina não teve influência sobre a solubilidade da proteína na faixa de valores investigados;
- f) Os dados de solubilidade em soluções de carbamato de amônio, sal volátil de R_{N/C} igual a 2,5 e sulfato de amônio puderam ser corretamente ajustados à equação de Cohn (Equação 4.3). A comparação dos valores de β mostra que os dados são coerentes com o comportamento esperado, mostrando uma ligeira dependência de pH. Os valores de K's mostram que são necessárias concentrações maiores de carbamato de amônio, em termos de concentração molar, para reduzir a solubilidade da tripsina de maneira equivalente à apresentada com solução de sulfato de amônio;
- g) O tempo de envelhecimento não afetou a recuperação de atividade e de massa de tripsina, indicando que o tempo de equilíbrio é atingido após 1 hora, o que possibilita a diminuição de eventual autólise e desnaturação da proteína;
- h) Os resultados de atividade total recuperada da tripsina encontrados com sal volátil foram comparados com os dados de precipitação obtidos com o sulfato de amônio. Os resultados do balanço de atividade do sal volátil e do sal convencional

mostraram que a tripsina teve sua atividade diminuída em 15% quando em solução de carbamato de amônio;

- i) A avaliação do nível de autólise da tripsina através de eletroforese SDS-PAGE indicou que a autólise ocorre em pequena proporção e de modo semelhante quando a proteína é precipitada com sulfato de amônio; isto indica que a redução da atividade na precipitação com carbamato de amônio é ocasionada pelo efeito desnaturante do sal volátil devido ao seu elevado pH.

5.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalho futuros que venham a complementar o que foi realizado, tem-se:

- a) Precipitação de outras proteínas com o sal carbamato de amônio a fim de se mensurar a capacidade de indução do “salting-out” por este sal volátil;
- b) Determinação da atividade de proteínas, que não tenham problemas específicos de autólise, para avaliação do efeito desnaturante do sal volátil carbamato de amônio na precipitação de proteínas;
- c) Remoção do sal volátil através de aumento de temperatura e determinação da atividade da proteína após a retirada do sal;
- d) Otimização do processo de remoção do sal volátil com vistas à preservação da atividade enzimática;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barret, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F., *Handbook of Proteolytic Enzymes*, San Diego, Academic Press, 12-21, 1998.
- BASF A. G., *Ammonium carbonate – Technical data sheet*, Ludwigshafen, 1998.
- BASF A. G., *Ammonium bicarbonate – Technical data sheet*, Ludwigshafen, 1999.
- BASF A. G., *Ammonium carbamate – Technical Data Sheet*, Ludwigshafen, 2002.
- Beynon, R. J., Bond, J. S., *Proteolytic Enzymes-A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1989.
- Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, M., Dunnill, P., Protein Purification: The Right Step at The Right Time, *Biotechnology*, 4, 954-958, 1986.
- Brooks, L. A., Audrieth L. F., Ammonium Carbamate, *Inorganic Syntheses*, 2, 85-86, 1946.
- Cao M.J., Osatomi K., Suzuki M., Hara K., Tachibana K., Ishihara T., Purification and Characterization of Two Anionic Trypsins from the Hepatopancreas of Carp, *Fisheries Sci.*, 66, 1172-1179, 2000.
- Claudel, B., Brousse, E., Shehadeh, G., Novel Thermodynamic and Kinetic Investigation of Ammonium Carbamate Decomposition into Urea and Water, *Thermochim. Acta*, 102, 357-371, 1986.
- Cohn, E. J., The Physical Chemistry of the Proteins, *Physiol. Rvs.*, 5, 349-428, 1925.
- Deutscher, M. P. (ed.), *Methods in Enzymology volume 182*, San Diego, Academic Press, 285-306, 1990.
- Dias, C. L. F., Rogana, E., Autolysis of β -Trypsin at pH 3.0, *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 19, 11-18, 1986.

- Du W., Zong M.H., Guo Y., Liu D.H., Lipase-catalysed Enantioselective Ammonolysis of Phenylglycine Methyl Ester in Organic Solvent, *Biotechnol. Appl. Bioc.*, 38, 107-110, 2003.
- Edwards, T. J., Newman, J., Prausnitz, J. M., Thermodynamics of Aqueous Solutions Containing Volatile Weak Electrolytes, *AIChE J.*, 21, 248-259, 1975.
- Edwards, T. J.; Maurer, G.; Newman, J., Prausnitz, J.M., Vapor-Liquid Equilibria in Multicomponent Aqueous Solutions of Volatile Weak Electrolytes, *AIChE J.*, 24, 966-976, 1978.
- Gerhartz, W., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th ed., v.A2, Germany, 261-265, 1985.
- Göppert, U., Maurer, G., Vapor-liquid Equilibria in Aqueous Solution of Ammonia and Carbon Dioxide at Temperatures between 333 and 393 K and Pressures up to 7 MPa, *Fluid Phase Equilibria*, 41, 153-185, 1988.
- Hoare, M., Protein Precipitation and Precipitate Ageing – Part I: Salting-out and Ageing of Casein Precipitates, *Trans. IChemE.*, 60, 79-87, 1982.
- Hofland, G. W., de Rijke, R., Thiering, R., van der Wielen, L. A. M., Witkamp, G. J., Isoelectric Precipitation of Soybean Protein using Carbon Dioxide as a Volatile Acid, *J. Chromatogr. B*, 743, 357-368, 2000.
- Kassel, B., Bovine Trypsin-Kallikrein Inhibitor (Kunitz Inhibitor, Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor, Polyvalent Inhibitor from Bovine Organs), *Methods in Enzymology*, 19, 844-852, 1970.
- Krieger, M., Kay, L. M., Stroud, R. M., Structure and Specific Binding of trypsin: Comparison of Inhibited Derivative and a Model for Substrate Binding, *J. Mol. Biol.*, 83, 209-230, 1974.
- 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 410K: New Experimental Data and Modeling, *Fluid Phase Equilib.*, 104, 261-275, 1995.
- Ladisch, M. R., *Bioseparations Engineering*, New York, John Wiley & Sons, 116-151, 2001.

- Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685, 1970.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., *Principles of Biochemistry*, New York, Worth Publishers Inc., 147-177, 1993.
- Lichtfers, U., Spektroskopische Untersuchungen zur Ermittlung von Speziesverteilungen im System Ammoniak-Kohlendioxid-Wasser. Dissertação de doutorado, Universität Kaiserslautern, 2000.
- Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Shibaev V.N., New Efficient Synthesis of Beta-Glucosylamines of Mono- and Disaccharides with the Use of Ammonium Carbamate, *Dokl. Chem.*, 383, 89-92, 2002.
- Maia L., Mira L., Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase: A Simple Procedure for the Simultaneous Purification from Rat Liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, 400, 48-53, 2002.
- Martins, N. F., Ferreira, E., Torres, K. C. L., Santoro, M. M., *Protein Pept. Lett.*, 10, 73-81, 2003.
- Matsuishi M., Okitani A., Purification and Properties of Cysteine Proteinase Inhibitors from Rabbit Skeletal Muscle, *Comp. Biochem. Phys. B*, 136, 309-316, 2003.
- McGregor, W. C., Large Scale Isolation and Purification of Proteins from Recombinant *E. coli*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 413, 231, 1983.
- Melander, W. R., Horváth, C., Salt Effects on Hydrophobic Interactions in Precipitation and Chromatography of Proteins: an Interpretation of the Lyotropic Series, *Arc. Biochem. Biophys.*, 183, 200-215, 1977.
- Morrissey, J.H., Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels: a Modified Procedure with Enhance Uniform Sensitivity, *Anal. Biochem.*, 117,307-310,1981.
- Moure F., Rendueles M., Diaz M., Coupling Process for Plasma Protein Fractionation using Ethanol Precipitation and Ion Exchange Chromatography, *Meat Sci.*, 64, 391-398, 2003.
- Nair P.S., Robinson W.E., Purification and Characterization of a Histidine-Rich Glycoprotein that Binds Cadmium from the Blood Plasma of the Bivalve *Mytilus edulis*, *Arc. Biochem. Biophys.*, 366, 8-14, 1999.

- Narayanan, S.R., Preparative Affinity Chromatography of Proteins, *J. Chromatogr.*, 658, 237-258, 1994.
- Ozturk-Urek R., Tarhan L., Purification and Characterization of Superoxide Dismutase from Chicken Liver, *Comp. Biochem. Phys. B*, 128, 205-212, 2001
- Pereira, M. T., Lopes, M. T. P., Meira, W. O., Salas, C. E., Purification of a Cysteine Proteinase from *Carica candamarcensis* L. and Cloning of a Genomic Putative Fragment Coding for this Enzyme, *Protein Express. Purif.*, 22, 249-257, 2001.
- Polson, A., Potgieter, G. M., Largier, J. F., Joubert, F. J., Mears G. E. F., Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight, *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 463, 1964
- Prausnitz, J. M., Lichtenthaler, R. N., Azevedo, E. G., *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*, 3rd ed., New Jersey, Prentice Hall, 1999.
- Ruan, K., Lange, R., Meersman, F., Heremas, K., Balny, C., Fluorescence and FTIR Study of the Pressure-Induced Denaturation of Bovine Pancreas Trypsin, *Eur. J. Biochem.*, 265, 79-85, 1999.
- Rumpf, G., Weyrich, F., Maurer, G., Enthalpy Changes upon Partial Evaporation of Aqueous Solutions Containing Ammonia and Carbon Dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, 2983-2995, 1998.
- Ryzewski, C. N., Hsu, J. T., Purification of Protein-C from Human Plasma by Precipitation and Aqueous 2-Phase Partitioning, *Biotechnol. Tech.*, 7, 815-820, 1993.
- Scopes, R. K., *Protein Purification*, 2nd ed., New York, Springer-Verlag New York Inc., 41-71, 1988.
- Shih, Y. C., Prausnitz, J. M., Blanch, H. W., Some Characteristics of Protein Precipitation by Salts, *Biotech. Bioeng.*, 40, 1155-1164, 1992.
- Simon, M. L., László, K., Kotormán, M., Szajáni, B., A Comparative Study of the Conformational Stabilities of Trypsin and α -Chymotrypsin, *Acta Biol. Szeged.*, v. 45, 43-49, 2001.
- Stroud, M., A Family of protein-Cutting Proteins, *Sci. Amer.*, 231, 74-88, 1974.

- Tomasula, P. M., Craig, J. C., Boswell, R. T., A Continuous Process for Casein Production Using High-Pressure Carbon Dioxide, *J. Food Eng.*, 33, 405-419, 1997.
- Vajda, T., Garai, A., Comparison of the Effect of Calcium (II) and Manganese (II) Ions on Trypsin Autolysis, *J. Inorg. Biochem.*, 15, 307-315, 1981.
- van Berlo, M., Luyben, K. C. A. M., van der Wielen, L. A. M., Poly(ethylene glycol)-Salt Aqueous Two-Phase Systems with Easily Recyclable Volatile Salts, *J. Chromatogr. B*, 711, 61-68, 1998.
- van Berlo, M., Ottens, M., Luyben, K. C. A. M., van der Wielen, L. A. M., Partitioning Behavior of Aminoacids in Aqueous Two-Phase Systems with Recyclable Volatile Salts, *J. Chromatogr. B*, v. 743, 317-325, 2000.
- Wang, S.W., Speck N. A., Purification of Core-Binding Factor, a Protein that Binds the Conserved Core Site in Murine Leukemia-Virus Enhancers, *Mol. Cell. Biol.*, 12, 89-102, 1992.
- Wiseman, A., *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd. ed., New York, John Wiley & Sons, 1985.
- Wu, H. L., Kundrot, C., Bender, M.L., The Denaturation of Trypsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.107, 742-745, 1982.

APÊNDICE

Neste apêndice encontram-se todos os dados determinados experimentalmente e que foram utilizados para a obtenção de gráficos e tabelas apresentados neste trabalho.

Tabela A1: Determinação da curva de absorção de solução de tripsina suína em água a 280 nm.

Concentração de tripsina (mg/mL)	Absorbância a 280 nm
0,1	0,1108
0,2	0,2326
0,4	0,4562
0,6	0,6895
0,8	0,9221
1,0	1,1499

Tabela A2: Determinação da atividade enzimática da tripsina suína utilizando-se BApNA como substrato a 25°C.

Tempo (min)	Absorbância a 405 nm
0,0	0,0488
0,5	0,0927
1,0	0,1359
1,5	0,1780
2,0	0,2201

2,5	0,2616
3,0	0,3027
3,5	0,3431
4,0	0,3833
4,5	0,4227
5,0	0,4614
5,5	0,5001
6,0	0,5372
6,5	0,5740
7,0	0,6107

Tabela A3: Determinação da faixa operacional da taxa de reação de hidrólise do BapNA utilizando-se diversas concentrações de tripsina.

Tempo (min)	Concentração de tripsina (mg/mL)						
	1,2	1,2	1,14	1,08	1,02	0,96	0,84
0,0	0,5598	0,3580	0,3715	0,3509	0,3687	0,3286	0,3193
0,5	0,9579	0,7488	0,7480	0,7179	0,7125	0,6738	0,6133
1,0	1,2962	1,0891	1,0798	1,0451	1,0182	0,9829	0,8810
1,5	1,5922	1,3884	1,3701	1,3256	1,2864	1,2573	1,1196
2,0	1,8419	1,6467	1,6169	1,5717	1,5290	1,5001	1,3407
2,5	2,0677	1,8678	1,8472	1,7915	1,7439	1,7168	1,5409
3,0	2,2413	2,0726	2,0531	1,9805	1,9305	1,9265	1,7206
3,5	2,4101	2,2323	2,2172	2,1411	2,1066	2,0905	1,8839
4,0	2,5498	2,4084	2,3304	2,2816	2,2423	2,2491	2,0370

4,5	2,6697	2,5334	2,4584	2,3885	2,3672	2,3765	2,1786
5,0	2,7569	2,6223	2,6046	2,5168	2,4641	2,5148	2,2995
5,5	2,9330	2,7343	2,6408	2,6240	2,5732	2,6582	2,3803
6,0	2,9708	2,8855	2,7238	2,6602	2,6402	2,6775	2,4923
6,5	3,1671	2,9647	2,8564	2,7432	2,6982	2,8439	2,5613
7,0	3,2340	3,1196	2,8264	2,7667	2,8163	2,8158	2,6088
7,5	3,2340	3,0616	2,8564	2,8458	2,7651	2,9786	2,7450
8,0	3,1091	3,1196	2,9611	2,8758	2,8743	3,0199	2,7227
8,5	3,5350	2,9647	3,0483	2,9428	2,9065	2,9408	2,7933
9,0	3,4101	3,0105	2,9233	2,9428	2,9065	3,0199	2,8776
9,5	3,4101	3,2658	3,0483	2,9428	2,8743	3,2418	2,9446
10,0	3,4101	3,2658	3,0483	2,9805	2,9412	3,1169	2,8776
Inclinação (A405/t)	0,6871	0,6863	0,6655	0,6099	0,5789	0,5853	0,5098
Atividade Específica (UA/mg)	0,97	0,97	0,99	0,96	0,96	1,03	1,03

Tempo (min)	Concentração de tripsina (mg/mL)						
	0,78	0,72	0,60	0,48	0,36	0,30	0,24
0,0	0,2717	0,2306	0,2350	0,2059	0,1219	0,1233	0,1040
0,5	0,5555	0,5032	0,4580	0,3947	0,2561	0,2394	0,1976
1,0	0,8155	0,7468	0,6649	0,5705	0,3866	0,3507	0,2880
1,5	1,0519	0,9751	0,8564	0,7342	0,5095	0,4559	0,3758
2,0	1,2697	1,1819	1,0366	0,8904	0,6274	0,5582	0,4610
2,5	1,4647	1,3706	1,2005	1,0368	0,7417	0,6573	0,5426

3,0	1,6453	1,5427	1,3589	1,1707	0,8494	0,7513	0,6198
3,5	1,8138	1,6924	1,5056	1,2963	0,9548	0,8424	0,6960
4,0	1,9639	1,8318	1,6373	1,4171	1,0569	0,9294	0,7690
4,5	2,0928	1,9687	1,7641	1,5272	1,1560	1,0137	0,8411
5,0	2,2231	2,0830	1,8817	1,6340	1,2474	1,0937	0,9084
5,5	2,3292	2,1892	1,9868	1,7313	1,3336	1,1725	0,9740
6,0	2,4698	2,2778	2,0930	1,8282	1,4158	1,2486	1,0385
6,5	2,5389	2,3686	2,1796	1,9141	1,5000	1,3233	1,1024
7,0	2,6034	2,4580	2,2961	2,0043	1,5787	1,3907	1,1645
7,5	2,7225	2,5397	2,3686	2,0769	1,6519	1,4585	1,2225
8,0	2,7972	2,6219	2,4323	2,1405	1,7267	1,5262	1,2816
8,5	2,7972	2,6041	2,5497	2,2152	1,7933	1,5902	1,3373
9,0	2,9599	2,7010	2,5971	2,2890	1,8568	1,6447	1,3922
9,5	2,9599	2,7010	2,6899	2,3401	1,9208	1,7114	1,4412
10,0	2,9221	2,7980	2,7816	2,3779	1,9758	1,7607	1,4939
Inclinação (A405/t)	0,4768	0,4362	0,3735	0,3018	0,2331	0,2012	0,1635
Atividade Específica (UA/mg)	1,04	1,03	1,06	1,07	1,10	1,14	1,16

Tempo (min)	Concentração de tripsina (mg/mL)					
	0,18	0,12	0,096	0,06	0,024	0,012
0,0	0,0712	0,0419	0,0421	0,0164	0,0206	-0,0093
0,5	0,1412	0,0885	0,0786	0,0388	0,0295	-0,0068
1,0	0,2087	0,1352	0,1146	0,0609	0,0380	-0,0035

1,5	0,2740	0,1796	0,1489	0,0828	0,0465	-0,0001
2,0	0,3382	0,2236	0,1833	0,1038	0,0547	0,0038
2,5	0,4010	0,2672	0,2172	0,1249	0,0629	0,0084
3,0	0,4623	0,3097	0,2510	0,1453	0,0711	0,0102
3,5	0,5206	0,3510	0,2835	0,1663	0,0790	0,0136
4,0	0,5774	0,3912	0,3157	0,1862	0,0870	0,0169
4,5	0,6340	0,4312	0,3474	0,2060	0,0948	0,0205
5,0	0,6887	0,4691	0,3788	0,2254	0,1024	0,0238
5,5	0,7420	0,5066	0,4095	0,2448	0,1101	0,0272
6,0	0,7942	0,5433	0,4401	0,2642	0,1176	0,0305
6,5	0,8462	0,5796	0,4698	0,2834	0,1254	0,0332
7,0	0,8963	0,6149	0,4985	0,3015	0,1329	0,0365
7,5	0,9462	0,6503	0,5273	0,3194	0,1407	0,0396
8,0	0,9948	0,6847	0,5558	0,3376	0,1483	0,0428
8,5	1,0403	0,7184	0,5834	0,3549	0,1554	0,0461
9,0	1,0860	0,7522	0,6106	0,3726	0,1627	0,0492
9,5	1,1309	0,7847	0,6374	0,3899	0,1700	0,0525
10,0	1,1753	0,8171	0,6645	0,4067	0,1771	0,0556
Inclinação (A405/t)	0,1233	0,0818	0,0652	0,0407	0,0149	0,0065
Atividade Específica (UA/mg)	1,16	1,16	1,15	1,15	1,05	0,92

Tabela A4: Determinação da influência do sal carbamato de amônio na atividade enzimática de solução de tripsina.

Tempo (min)	Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)					
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,25	0,40
0,0	0,0493	0,0291	0,0436	0,0387	0,0470	0,0434
0,5	0,0903	0,0685	0,0870	0,0771	0,0885	0,0834
1,0	0,1303	0,1072	0,1291	0,1175	0,1294	0,1229
1,5	0,1700	0,1457	0,1705	0,1555	0,1695	0,1617
2,0	0,2092	0,1837	0,2110	0,1942	0,2089	0,1994
2,5	0,2479	0,2211	0,2508	0,2322	0,2475	0,2361
3,0	0,2862	0,2583	0,2898	0,2694	0,2856	0,2728
3,5	0,3248	0,2947	0,3281	0,3065	0,3229	0,3092
4,0	0,3616	0,3311	0,3657	0,3415	0,3594	0,3454
4,5	0,3981	0,3669	0,4025	0,3774	0,3956	0,3812
5,0	0,4340	0,4020	0,4386	0,4134	0,4315	0,4166
5,5	0,4701	0,4367	0,4740	0,4489	0,4676	0,4518
6,0	0,5054	0,4714	0,5089	0,4843	0,5030	0,4863
6,5	0,5398	0,5057	0,5440	0,5190	0,5375	0,5206
7,0	0,5731	0,5392	0,5784	0,5531	0,5722	0,5540
7,5	0,6048	0,5726	0,6132	0,5874	0,6058	0,5874
8,0	0,6364	0,6054	0,6473	0,6209	0,6397	0,6198
8,5	0,6666	0,6371	0,6809	0,6537	0,6723	0,6519
9,0	0,6997	0,6685	0,7141	0,6857	0,7044	0,6834
9,5	0,7322	0,6991	0,7472	0,7173	0,7361	0,7145

10,0	0,7648	0,7303	0,7791	0,7490	0,7667	0,7454
Atividade específica (UA/mg)	1,15	1,11	1,16	1,12	1,14	1,13

Tabela A5: Determinação da estabilidade de tripsina em solução de carbamato de amônio de concentração 5,1 mol/kg

Tempo de reação (min)	Tempo de envelhecimento em solução de carbamato de amônio				
	Inicial	15 min	30 min	60 min	120 min
0,0	0,0450	0,0422	0,0467	0,0335	0,0386
0,5	0,0844	0,0831	0,0923	0,0732	0,0782
1,0	0,1235	0,1239	0,1369	0,1127	0,1218
1,5	0,1620	0,1637	0,1788	0,1513	0,1568
2,0	0,1996	0,2029	0,2216	0,1893	0,1955
2,5	0,2363	0,2419	0,2640	0,2261	0,2338
3,0	0,2727	0,2803	0,3058	0,2629	0,2723
3,5	0,3080	0,3186	0,3466	0,2988	0,3103
4,0	0,3426	0,3557	0,3866	0,3344	0,3479
4,5	0,3766	0,3929	0,4260	0,3696	0,3850
5,0	0,4103	0,4292	0,4644	0,4043	0,4217
5,5	0,4440	0,4651	0,5027	0,4385	0,4581
6,0	0,4776	0,5004	0,5404	0,4724	0,4944
6,5	0,5109	0,5356	0,5772	0,5059	0,5299
7,0	0,5441	0,5701	0,6140	0,5388	0,5653
7,5	0,5766	0,6045	0,6495	0,5716	0,6001
8,0	0,6087	0,6384	0,6853	0,6037	0,6339

8,5	0,6399	0,6720	0,7194	0,6355	0,6675
9,0	0,6714	0,7050	0,7540	0,6666	0,7005
9,5	0,7021	0,7373	0,7882	0,6965	0,7330
10,0	0,7324	0,7695	0,8218	0,7274	0,7645
Atividade Específica (UA/mg)	1,09	1,07	1,11	1,02	1,06

Tempo de reação (min)	Tempo de envelhecimento em solução de carbamato de amônio				
	240 min	360 min	480 min	600 min	1440 min
0,0	0,0569	0,0546	0,0506	0,0461	0,0395
0,5	0,0961	0,0962	0,0932	0,0879	0,0780
1,0	0,1353	0,1368	0,1346	0,1292	0,1119
1,5	0,1738	0,1766	0,1739	0,1711	0,1479
2,0	0,2117	0,2153	0,2129	0,2086	0,1821
2,5	0,2487	0,2531	0,2528	0,2474	0,2161
3,0	0,2856	0,2909	0,2919	0,2857	0,2500
3,5	0,3214	0,3291	0,3300	0,3236	0,2832
4,0	0,3569	0,3667	0,3678	0,3604	0,3158
4,5	0,3919	0,4034	0,4047	0,3963	0,3478
5,0	0,4266	0,4401	0,4408	0,4322	0,3793
5,5	0,4608	0,4757	0,4764	0,4672	0,4111
6,0	0,4943	0,5113	0,5112	0,5025	0,4420
6,5	0,5208	0,5462	0,5460	0,5364	0,4729
7,0	0,5613	0,5803	0,5803	0,5701	0,5035

7,5	0,5939	0,6139	0,6140	0,6037	0,5338
8,0	0,6255	0,6467	0,6476	0,6363	0,5638
8,5	0,6573	0,6805	0,6800	0,6685	0,5931
9,0	0,6891	0,7126	0,7124	0,6998	0,6226
9,5	0,7210	0,7445	0,7441	0,7317	0,6517
10,0	0,7514	0,7763	0,7765	0,7629	0,6799
Atividade Específica (UA/mg)	1,01	1,06	1,07	1,06	0,93

Tabela A6: Atividade da tripsina em solução de carbamato de amônio de concentração 5,1 mol/kg em diferentes tempos de envelhecimento

Tempo (min)	Atividade ¹²(%)
0	99
15	96
30	100
60	92
120	96
240	91
360	96
480	97
600	95
1440	84

¹² O valor de 100% para a atividade refere-se ao ensaio de atividade enzimática de tripsina sem a presença de carbamato de amônio.

Tabela A7: Determinação da estabilidade de tripsina em solução de carbamato de amônio de concentração 8,1 mol/kg

Tempo de reação (min)	Tempo de envelhecimento em solução de carbamato de amônio				
	Inicial	15 min	30 min	60 min	120 min
0,0	0,0336	0,0451	0,0512	0,0410	0,0418
0,5	0,0746	0,0813	0,0912	0,0810	0,0819
1,0	0,1151	0,1224	0,1313	0,1207	0,1226
1,5	0,1552	0,1642	0,1696	0,1598	0,1620
2,0	0,1940	0,2029	0,2076	0,1987	0,2013
2,5	0,2325	0,2427	0,2447	0,2372	0,2401
3,0	0,2706	0,2816	0,2814	0,2746	0,2780
3,5	0,3091	0,3206	0,3174	0,3121	0,3159
4,0	0,3461	0,3588	0,3521	0,3486	0,3532
4,5	0,3830	0,3967	0,3869	0,3851	0,3904
5,0	0,4192	0,4341	0,4214	0,4216	0,4277
5,5	0,4556	0,4711	0,4564	0,4576	0,4636
6,0	0,4915	0,5078	0,4913	0,4930	0,4996
6,5	0,5269	0,5439	0,5253	0,5275	0,5353
7,0	0,5616	0,5798	0,5584	0,5627	0,5701
7,5	0,5963	0,6145	0,5921	0,5961	0,6050
8,0	0,6308	0,6496	0,6249	0,6303	0,6393
8,5	0,6642	0,6841	0,6574	0,6640	0,6736
9,0	0,6983	0,7178	0,6899	0,6974	0,7066
9,5	0,7311	0,7520	0,7217	0,7305	0,7394

10,0	0,7636	0,7849	0,7526	0,7640	0,7721
Atividade Específica (UA/mg)	1,09	1,09	1,02	1,02	1,07

Tempo de reação (min)	Tempo de envelhecimento em solução de carbamato de amônio				
	240 min	360 min	480 min	600 min	1440 min
0,0	0,0379	0,0351	0,0324	0,0438	0,0460
0,5	0,0762	0,0718	0,0706	0,0811	0,0810
1,0	0,1138	0,1083	0,1079	0,1181	0,1130
1,5	0,1512	0,1441	0,1441	0,1547	0,1463
2,0	0,1879	0,1796	0,1799	0,1910	0,1793
2,5	0,2245	0,2148	0,2153	0,2262	0,2121
3,0	0,2604	0,2495	0,2505	0,2608	0,2449
3,5	0,2958	0,2840	0,2853	0,2953	0,2770
4,0	0,3311	0,3183	0,3207	0,3302	0,3088
4,5	0,3656	0,3520	0,3546	0,3645	0,3404
5,0	0,3999	0,3850	0,3890	0,3986	0,3716
5,5	0,4341	0,4182	0,4225	0,4322	0,4028
6,0	0,4678	0,4505	0,4559	0,4657	0,4333
6,5	0,5014	0,4827	0,4888	0,4986	0,4640
7,0	0,5348	0,5148	0,5215	0,5307	0,4941
7,5	0,5670	0,5460	0,5533	0,5624	0,5239
8,0	0,5997	0,5780	0,5848	0,5940	0,5531
8,5	0,6323	0,6088	0,6161	0,6248	0,5825

9,0	0,6633	0,6399	0,6477	0,6560	0,6110
9,5	0,6948	0,6704	0,6785	0,6864	0,6390
10,0	0,7255	0,7005	0,7081	0,7162	0,6668
Atividade Específica (UA/mg)	1,00	0,97	0,99	0,98	0,90

Tabela A8: Atividade da tripsina em solução de carbamato de amônio de concentração 8,1 mol/kg em diferentes tempos de envelhecimento

Tempo (min)	Atividade ¹³(%)
0	98
15	98
30	92
60	92
120	96
240	90
360	87
480	89
600	89
1440	82

¹³ O valor de 100% para a atividade refere-se ao ensaio de atividade enzimática de tripsina sem a presença de carbamato de amônio.

Tabela A9: Determinação de estabilidade de tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH, no tempo inicial.

Tempo (min)	pH 7,8	pH 8,5	pH 9,0	pH 9,5	pH 10,0
0,0	0,0441	0,0740	0,0441	0,0371	0,0542
0,5	0,0924	0,1109	0,0707	0,0613	0,0794
1,0	0,1387	0,1455	0,0984	0,0846	0,0986
1,5	0,1836	0,1800	0,1244	0,1069	0,1189
2,0	0,2277	0,2131	0,1497	0,1286	0,1395
2,5	0,2717	0,2462	0,1764	0,1508	0,1598
3,0	0,3145	0,2787	0,2015	0,1713	0,1784
3,5	0,3559	0,3087	0,2268	0,1922	0,1994
4,0	0,3974	0,3406	0,2512	0,2131	0,2175
4,5	0,4373	0,3703	0,2758	0,2339	0,2370
5,0	0,4772	0,4010	0,2996	0,2546	0,2567
5,5	0,5159	0,4307	0,3235	0,2754	0,2755
6,0	0,5539	0,4598	0,3471	0,2959	0,2935
6,5	0,5912	0,4892	0,3715	0,3158	0,3133
7,0	0,6279	0,5167	0,3943	0,3360	0,3319
7,5	0,6633	0,5450	0,4164	0,3556	0,3503
8,0	0,6985	0,5726	0,4388	0,3751	0,3691
8,5	0,7333	0,5995	0,4613	0,3945	0,3873
9,0	0,7672	0,6271	0,4833	0,4136	0,4056
9,5	0,7993	0,6530	0,5046	0,4321	0,4236

10,0	0,8330	0,6783	0,5267	0,4500	0,4412
Atividade Específica (UA/mg)	1,11	0,89	0,71	0,58	0,55

Tabela A10: Atividade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH, no tempo inicial.

pH	% Atividade
7,8	100
8,5	80
9,0	64
9,5	52
10,0	50

Tabela A11: Determinação de estabilidade de tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH, após 1 hora.

Tempo (min)	pH 7,8	pH 8,5	pH 9,0	pH 9,5	pH 10,0
0,0	0,0558	0,0295	0,0239	0,0240	0,0143
0,5	0,1036	0,0575	0,0580	0,0475	0,0327
1,0	0,1501	0,0855	0,0679	0,0702	0,0533
1,5	0,1950	0,1126	0,0884	0,0926	0,0700
2,0	0,2396	0,1394	0,1217	0,1152	0,0879
2,5	0,2836	0,1664	0,1388	0,1364	0,1076
3,0	0,3262	0,1920	0,1702	0,1573	0,1271
3,5	0,3685	0,2176	0,1757	0,1784	0,1451

4,0	0,4092	0,2428	0,2035	0,1991	0,1633
4,5	0,4494	0,2676	0,2290	0,2194	0,1817
5,0	0,4891	0,2920	0,2367	0,2392	0,1988
5,5	0,5280	0,3163	0,2749	0,2589	0,2166
6,0	0,5664	0,3402	0,2826	0,2787	0,2345
6,5	0,6034	0,3637	0,2937	0,2982	0,2509
7,0	0,6406	0,3869	0,3177	0,3174	0,2679
7,5	0,6772	0,4100	0,3530	0,3364	0,2856
8,0	0,7121	0,4333	0,3728	0,3554	0,3015
8,5	0,7476	0,4560	0,3895	0,3738	0,3224
9,0	0,7822	0,4780	0,4110	0,3927	0,3369
9,5	0,8163	0,5003	0,4314	0,4108	0,3558
10,0	0,8496	0,5224	0,4506	0,4287	0,3685
Atividade Específica (UA/mg)	1,12	0,72	0,60	0,58	0,51

Tabela A12: Atividade da tripsina em solução de trietanolamina-HCl 0,2 mol/L a diferentes valores de pH, após 1 hora.

pH	% Atividade
7,8	100
8,5	64
9,0	53
9,5	52
10,0	46

Tabela A13: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração inicial de tripsina igual a 10 mg/mL.

Concentração de sal (mol/kg)	Absorbância a 280 nm			
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata
10,12	0,2301	0,2301	0,2585	0,2583
9,61	0,2660	0,2664	0,3302	0,3302
9,11	0,3468	0,3471	0,4100	0,4100
8,60	0,4498	0,4500	0,4798	0,4798

Tabela A14: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração inicial de tripsina igual a 10 mg/mL.

Concentração de sal (mol/kg)	Concentração de tripsina na fase sobrenadante (mg/mL)				
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata	Média
10,12	2,02	2,02	2,26	2,26	2,14
9,61	2,33	2,33	2,88	2,88	2,61
9,11	3,03	3,03	3,58	3,58	3,30
8,60	3,92	3,92	4,18	4,18	4,05

Tabela A15: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração inicial de tripsina igual a 20 mg/mL.

Concentração de sal (mol/kg)	Absorbância a 280 nm			
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata
10,12	0,0604	0,0606	0,1596	0,1594
9,61	0,0760	0,0763	0,2027	0,2029
9,11	0,0965	0,0965	0,2333	0,2333
8,60	0,1189	0,1190	0,2837	0,2840

8,10	0,1581	0,1578	0,3986	0,3989
7,59	0,2225	0,2223	0,5639	0,5692
7,08	0,3401	0,3403	0,8303	0,8298

Tabela A16: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 20 mg/mL.

Concentração de sal (mol/kg)	Concentração de tripsina na fase sobrenadante (mg/mL)				
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata	Média
10,12	2,72	2,73	3,51	3,51	3,12
9,61	3,40	3,41	4,44	4,45	3,92
9,11	4,28	4,28	5,11	5,11	4,70
8,60	5,26	5,26	6,20	6,21	5,73
8,10	6,96	6,94	8,69	8,70	7,82
7,59	9,75	9,74	12,28	12,39	11,04
7,08	14,85	14,86	18,05	18,04	16,45

Tabela A17: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração inicial de tripsina igual a 30 mg/mL.

Concentração de sal (mol/kg)	Absorbância a 280 nm			
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata
10,12	0,1587	0,1584	0,0624	0,0621
9,61	0,1573	0,1574	0,0598	0,0598
9,11	0,1718	0,1715	0,0817	0,0818
8,60	0,1980	0,1980	0,0929	0,0925
8,10	0,2487	0,2488	0,1336	0,1336

7,59	0,3299	0,3300	0,1690	0,1691
7,08	0,5751	0,5755	0,2476	0,2461
6,58	0,8615	0,8647	0,3713	0,3716
6,07	1,3035	1,3048	0,5595	0,5590

Tabela A18: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 30 mg/mL.

Concentração de sal (mol/kg)	Concentração de tripsina na fase sobrenadante (mg/mL)				
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata	Média
10,12	3,49	3,48	2,81	2,79	3,14
9,61	3,46	3,46	2,69	2,69	3,08
9,11	3,77	3,77	3,64	3,65	3,71
8,60	4,34	4,34	4,13	4,11	4,23
8,10	5,44	5,44	5,89	5,89	5,67
7,59	7,20	7,20	7,43	7,43	7,32
7,08	12,52	12,53	10,84	10,77	11,66
6,58	18,73	18,80	16,20	16,21	17,48
6,07	28,31	28,34	24,36	24,34	26,34

Tabela A19: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 40 mg/mL.

Concentração de sal (mol/kg)	Absorbância a 280 nm			
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata
10,12	0,0755	0,0756	0,0820	0,0818
9,61	0,0801	0,0800	0,0951	0,0958

9,11	0,0964	0,0963	0,1093	0,1097
8,60	0,1168	0,1167	0,1434	0,1434
8,10	0,1512	0,1512	0,2051	0,2046
7,59	0,1925	0,1922	0,2191	0,2190
7,08	0,2656	0,2653	0,3283	0,3284
6,58	0,4019	0,4019	0,5297	0,5297
6,07	0,7571	0,7579	0,7437	0,7434
5,57	0,8634	0,8653	0,8763	0,8768

Tabela A20: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de carbamato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 40 mg/mL.

Concentração de sal (mol/kg)	Concentração de tripsina na fase sobrenadante (mg/mL)				
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata	Média
10,12	3,37	3,38	3,66	3,65	3,51
9,61	3,57	3,57	4,22	4,25	3,90
9,11	4,28	4,28	4,84	4,86	4,56
8,60	5,16	5,16	6,32	6,32	5,74
8,10	6,66	6,66	8,99	8,97	7,82
7,59	8,45	8,43	9,60	9,60	9,02
7,08	11,62	11,60	14,34	14,34	12,97
6,58	17,53	17,53	23,07	23,07	20,30
6,07	32,93	32,96	32,35	32,33	32,64
5,57	37,54	37,62	38,10	38,12	37,84

Tabela A21: Determinação da quantidade de tripsina na precipitação com carbamato de amônio por secagem utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 10 mg/mL

Concentração de sal (mol/kg)	Massa de tripsina na fase sobrenadante (mg)
10,12	2,17
9,61	2,54
9,11	3,11
8,60	3,82

Tabela A22: Determinação da quantidade de tripsina na precipitação com carbamato de amônio por secagem utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 20 mg/mL

Concentração de sal (mol/kg)	Massa de tripsina na fase sobrenadante (mg)
10,12	3,47
9,61	4,01
9,11	4,41
8,60	5,42
8,10	6,25
7,59	8,93
7,08	14,06

Tabela A23: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sal volátil, R_{NC} igual a 2,5 utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 40 mg/mL

Concentração de sal (mol/kg)	Absorbância a 280 nm			
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata
10,12	0,3056	0,3059	0,2825	0,2825
9,61	0,3732	0,3726	0,3445	0,3440

9,11	0,4830	0,4832	0,4855	0,4856
8,60	0,6802	0,6805	0,6370	0,6371
8,10	0,8566	0,8580	0,8265	0,8287
7,59	0,8805	0,8820	0,9065	0,9067
7,08	0,8945	0,8961	0,9018	0,9020

Tabela A24: Determinação da curva de solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sal volátil, $R_{N/C}$ igual a 2,5 utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 40 mg/mL

Concentração de sal (mol/kg)	Concentração de tripsina na fase sobrenadante (mg/mL)				
	Ensaio 1	Duplicata	Ensaio 2	Duplicata	Média
10,12	13,35	13,36	12,35	12,35	12,85
9,61	16,28	16,26	15,04	15,02	15,65
9,11	21,04	21,05	21,15	21,16	21,10
8,60	29,59	29,61	27,72	27,72	28,66
8,10	37,24	37,30	35,94	36,03	36,63
7,59	38,28	38,34	39,41	39,41	38,86
7,08	38,89	38,95	39,20	39,21	39,06

Tabela A25: Determinação da solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sulfato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 30 mg/mL

Concentração de sal (mol/kg)	Absorbância a 280 nm	
	Ensaio 1	Ensaio 2
1,36	0,3221	0,3301
1,90	0,4370	0,4030
2,17	0,7025	0,7016

2,71	0,2005	0,2530
3,25	0,9105	0,9362
3,80	0,0714	0,0642

Tabela A26: Determinação da solubilidade da tripsina a 4°C em solução de sulfato de amônio utilizando-se uma concentração de tripsina igual a 30 mg/mL

Concentração de sal (mol/kg)	Concentração de tripsina na fase sobrenadante (mg/mL)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Média
1,36	28,13	28,83	28,48
1,90	19,05	17,57	18,31
2,17	12,22	12,21	12,22
2,71	1,76	2,21	1,99
3,25	0,79	0,81	0,80
3,80	0,64	0,58	0,61

Tabela A27: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg, em diferentes tempos de equilíbrio

Tempo de reação (min)	Tempo de equilíbrio igual a 1 hora			
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0861	0,0652	0,0431	0,1032
0,5	0,1349	0,1161	0,0954	0,1543
1,0	0,1833	0,1667	0,1481	0,2055
1,5	0,2322	0,2182	0,2003	0,2557
2,0	0,2809	0,2690	0,2537	0,3071

2,5	0,3312	0,3210	0,3068	0,3597
3,0	0,3798	0,3726	0,3608	0,4126
3,5	0,4296	0,4236	0,4140	0,4633
4,0	0,4781	0,4741	0,4665	0,5164
4,5	0,5264	0,5235	0,5182	0,5642
5,0	0,5739	0,5724	0,5690	0,6138
5,5	0,6195	0,6215	0,6183	0,6641
6,0	0,6650	0,6708	0,6680	0,7117
6,5	0,7099	0,7168	0,7168	0,7602
7,0	0,7552	0,7622	0,7644	0,8082
7,5	0,7984	0,8086	0,8132	0,8546
8,0	0,8421	0,8527	0,8587	0,9018
8,5	0,8842	0,8979	0,9058	0,9458
9,0	0,9277	0,9401	0,9501	0,9907
9,5	0,9701	0,9802	0,9931	1,0322
10,0	1,0107	1,0211	1,0361	1,0741
Atividade específica (UA/mg)	12,05	14,44	9,62	17,00

Tempo de reação (min)	Tempo de equilíbrio igual a 3 horas			
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0467	0,0738	0,0745	0,0116
0,5	0,0921	0,1239	0,1181	0,0652
1,0	0,1376	0,1737	0,1637	0,1188

1,5	0,1838	0,2255	0,2104	0,1718
2,0	0,2302	0,2761	0,2573	0,2253
2,5	0,2781	0,3278	0,3046	0,2791
3,0	0,3256	0,3791	0,3518	0,3336
3,5	0,3725	0,4299	0,3992	0,3870
4,0	0,4106	0,4803	0,4457	0,4403
4,5	0,4646	0,5305	0,4918	0,4928
5,0	0,5108	0,5798	0,5375	0,5440
5,5	0,5559	0,6282	0,5828	0,5949
6,0	0,6012	0,6766	0,6267	0,6446
6,5	0,6463	0,7248	0,6703	0,6941
7,0	0,6904	0,7722	0,7133	0,7423
7,5	0,7338	0,8178	0,7562	0,7909
8,0	0,7768	0,8626	0,7975	0,8385
8,5	0,8180	0,9069	0,8392	0,8856
9,0	0,8589	0,9500	0,8800	0,9321
9,5	0,8988	0,9919	0,9198	0,9773
10,0	0,9380	1,0349	0,9581	1,0202
Atividade específica (UA/mg)	12,01	14,05	10,26	16,34

Tempo de reação (min)	Tempo de equilíbrio igual a 5 horas			
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0601	0,0784	0,0639	0,0061

0,5	0,1082	0,1304	0,1133	0,0618
1,0	0,1566	0,1832	0,1640	0,1194
1,5	0,2041	0,2351	0,2141	0,1735
2,0	0,2518	0,2880	0,2637	0,2288
2,5	0,3010	0,3402	0,3133	0,2847
3,0	0,3502	0,3929	0,3628	0,3389
3,5	0,3988	0,4455	0,4116	0,3930
4,0	0,4465	0,4969	0,4605	0,4460
4,5	0,4940	0,5482	0,5090	0,4994
5,0	0,5391	0,5976	0,5562	0,5518
5,5	0,5842	0,6459	0,6036	0,6031
6,0	0,6292	0,6937	0,6497	0,6530
6,5	0,6732	0,7413	0,6959	0,7024
7,0	0,7166	0,7874	0,7401	0,7497
7,5	0,7604	0,8332	0,7842	0,7969
8,0	0,8034	0,8787	0,8263	0,8436
8,5	0,8465	0,9244	0,8692	0,8874
9,0	0,8873	0,9667	0,9108	0,9319
9,5	0,9275	1,0105	0,9522	0,9750
10,0	0,9674	1,0526	0,9934	1,0176
Atividade específica (UA/mg)	11,82	14,87	9,50	17,44

Tempo de reação (min)	Tempo de equilíbrio igual a 8 horas			
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,1073	0,0930	0,0635	0,0741
0,5	0,1586	0,1481	0,1137	0,1366
1,0	0,2097	0,2051	0,1682	0,1978
1,5	0,2605	0,2576	0,2218	0,2592
2,0	0,3103	0,3109	0,2747	0,3178
2,5	0,3587	0,3633	0,3270	0,3760
3,0	0,4070	0,4155	0,3782	0,4336
3,5	0,4558	0,4666	0,4283	0,4895
4,0	0,5039	0,5167	0,4780	0,5451
4,5	0,5510	0,5673	0,5270	0,5996
5,0	0,5974	0,6172	0,5753	0,6531
5,5	0,6428	0,6661	0,6227	0,7054
6,0	0,6883	0,7136	0,6692	0,7568
6,5	0,7324	0,7603	0,7148	0,8074
7,0	0,7762	0,8064	0,7603	0,8569
7,5	0,8175	0,8523	0,8046	0,9052
8,0	0,8592	0,8956	0,8486	0,9534
8,5	0,8996	0,9384	0,8924	1,0000
9,0	0,9376	0,9808	0,9336	1,0462
9,5	0,9754	1,0231	0,9763	1,0905

10,0	1,0119	1,0633	1,0170	1,1341
Atividade Específica (UA/mg)	12,38	14,89	11,34	16,97

Tabela A28: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 9,1 mol/kg em diferentes tempos de equilíbrio

Tempo de reação (min)	Tempo de equilíbrio igual a 1 hora			
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0209	0,0648	0,0365	0,0665
0,5	0,0585	0,1208	0,0692	0,1200
1,0	0,0962	0,1809	0,1018	0,1763
1,5	0,1326	0,2397	0,1343	0,2327
2,0	0,1683	0,2976	0,1663	0,2879
2,5	0,2044	0,3541	0,1985	0,3435
3,0	0,2410	0,4097	0,2307	0,3985
3,5	0,2756	0,4646	0,2634	0,4532
4,0	0,3103	0,5179	0,2962	0,5096
4,5	0,3447	0,5711	0,3277	0,5602
5,0	0,3789	0,6223	0,3595	0,6124
5,5	0,4125	0,6737	0,3906	0,6635
6,0	0,4460	0,7234	0,4220	0,7166
6,5	0,4786	0,7724	0,4525	0,7619
7,0	0,5113	0,8213	0,4834	0,8092
7,5	0,5434	0,8689	0,5131	0,8545

8,0	0,5752	0,9156	0,5431	0,8994
8,5	0,6061	0,9615	0,5730	0,9447
9,0	0,6373	1,0060	0,6023	0,9880
9,5	0,6676	1,0493	0,6315	1,0301
10,0	0,6977	1,0928	0,6602	1,0719
Atividade específica (UA/mg)	1,31	16,44	1,29	15,98

Tempo de reação (min)	Tempo de equilíbrio igual a 3 horas			
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	-0,0255	0,0584	0,0447	0,0244
0,5	0,0047	0,1162	0,0750	0,0832
1,0	0,0334	0,1717	0,1048	0,1416
1,5	0,0631	0,2267	0,1355	0,1982
2,0	0,0925	0,2814	0,1648	0,2551
2,5	0,1212	0,3360	0,1953	0,3119
3,0	0,1502	0,3883	0,2248	0,3686
3,5	0,1793	0,4401	0,2547	0,4241
4,0	0,2081	0,4918	0,2848	0,4793
4,5	0,2367	0,5436	0,3140	0,5342
5,0	0,2656	0,5953	0,3435	0,5876
5,5	0,2944	0,6458	0,3729	0,6409
6,0	0,3223	0,6954	0,4020	0,6927
6,5	0,3500	0,7445	0,4301	0,7439

7,0	0,3776	0,7930	0,4580	0,7938
7,5	0,4045	0,8400	0,4866	0,8438
8,0	0,4317	0,8863	0,5146	0,8921
8,5	0,4585	0,9312	0,5422	0,9401
9,0	0,4843	0,9758	0,5693	0,9862
9,5	0,5100	1,0190	0,5965	1,0328
10,0	0,5359	1,0629	0,6235	1,0791
Atividade específica (UA/mg)	1,33	15,96	1,14	16,89

Tempo de reação (min)	Tempo de equilíbrio igual a 5 horas			
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0365	0,0791	0,0671	0,0861
0,5	0,0691	0,1440	0,0963	0,1384
1,0	0,1015	0,2044	0,1237	0,1940
1,5	0,1333	0,2651	0,1518	0,2518
2,0	0,1647	0,3233	0,1801	0,3075
2,5	0,1960	0,3807	0,2069	0,3621
3,0	0,2274	0,4378	0,2348	0,4164
3,5	0,2585	0,4935	0,2626	0,4708
4,0	0,2891	0,5491	0,2902	0,5245
4,5	0,3190	0,6031	0,3172	0,5772
5,0	0,3489	0,6562	0,3447	0,6290
5,5	0,3787	0,7083	0,3715	0,6803

6,0	0,4082	0,7592	0,3985	0,7301
6,5	0,4375	0,8102	0,4247	0,7794
7,0	0,4662	0,8585	0,4511	0,8275
7,5	0,4947	0,9062	0,4769	0,8746
8,0	0,5235	0,9523	0,5021	0,9206
8,5	0,5515	0,9997	0,5271	0,9638
9,0	0,5795	1,0466	0,5522	1,0072
9,5	0,6071	1,0910	0,5771	1,0502
10,0	0,6344	1,1364	0,6026	1,0923
Atividade específica (UA/mg)	1,37	16,70	1,25	16,22

Tempo de reação (min)	Tempo de equilíbrio igual a 8 horas			
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0305	0,0387	0,0291	0,0601
0,5	0,0608	0,1031	0,0603	0,1207
1,0	0,0920	0,1664	0,0911	0,1803
1,5	0,1233	0,2284	0,1215	0,2394
2,0	0,1540	0,2890	0,1516	0,2974
2,5	0,1849	0,3477	0,1820	0,3549
3,0	0,2148	0,4055	0,2119	0,4115
3,5	0,2457	0,4616	0,2418	0,4675
4,0	0,2748	0,5187	0,2710	0,5225
4,5	0,3049	0,5730	0,3007	0,5766

5,0	0,3334	0,6277	0,3298	0,6309
5,5	0,3622	0,6797	0,3583	0,6841
6,0	0,3905	0,7322	0,3870	0,7352
6,5	0,4192	0,7839	0,4150	0,7862
7,0	0,4474	0,8347	0,4432	0,8364
7,5	0,4751	0,8837	0,4708	0,8841
8,0	0,5024	0,9310	0,4981	0,9320
8,5	0,5296	0,9784	0,5257	0,9777
9,0	0,5568	1,0251	0,5526	1,0208
9,5	0,5834	1,0706	0,5800	1,0643
10,0	0,6089	1,1156	0,6059	1,1066
Atividade específica (UA/mg)	1,36	16,69	1,22	16,61

Tabela A29: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com sulfato de amônio de concentração de 1,9 mol/kg

Tempo de reação (min)	Ensaio 1		Ensaio 2	
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0709	0,0643	0,0775	0,0539
0,5	0,1554	0,1208	0,1644	0,1223
1,0	0,2371	0,1780	0,2472	0,1886
1,5	0,3163	0,2294	0,3272	0,2528
2,0	0,3932	0,2821	0,4042	0,3173
2,5	0,4684	0,3337	0,4804	0,3803

3,0	0,5416	0,3855	0,5559	0,4410
3,5	0,6130	0,4340	0,6275	0,5002
4,0	0,6817	0,4827	0,6968	0,5578
4,5	0,7494	0,5295	0,7648	0,6146
5,0	0,8150	0,5753	0,8288	0,6705
5,5	0,8802	0,6214	0,8917	0,7253
6,0	0,9426	0,6657	0,9542	0,7787
6,5	1,0030	0,7100	1,0137	0,8327
7,0	1,0642	0,7531	1,0717	0,8886
7,5	1,1230	0,7953	1,1296	0,9304
8,0	1,1793	0,8370	1,1834	0,9853
8,5	1,2359	0,8779	1,2376	1,0341
9,0	1,2926	0,9192	1,2905	1,0808
9,5	1,3465	0,9579	1,3396	1,1285
10,0	1,3994	0,9967	1,3909	1,1763
Atividade Específica (UA/mg)	23,11	9,95	21,42	11,43

Tabela A30: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com sulfato de amônio de concentração de 2,7 mol/kg

Tempo de reação (min)	Ensaio 1		Ensaio 2	
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0495	0,0724	0,0727	0,0639
0,5	0,1011	0,1440	0,1282	0,1328

1,0	0,1516	0,2152	0,1827	0,2003
1,5	0,2010	0,2841	0,2359	0,2646
2,0	0,2488	0,3514	0,2876	0,3283
2,5	0,2965	0,4176	0,3374	0,3905
3,0	0,3428	0,4816	0,3872	0,4518
3,5	0,3885	0,5446	0,4374	0,5122
4,0	0,4325	0,6058	0,4963	0,5709
4,5	0,4754	0,6652	0,5343	0,6282
5,0	0,5180	0,7249	0,5819	0,6843
5,5	0,5598	0,7833	0,6277	0,7392
6,0	0,6016	0,8393	0,6729	0,7927
6,5	0,6424	0,8946	0,7165	0,8448
7,0	0,6827	0,9497	0,7601	0,8949
7,5	0,7226	1,0017	0,8025	0,9452
8,0	0,7617	1,0540	0,8444	0,9949
8,5	0,8001	1,1050	0,8850	1,0425
9,0	0,8382	1,1560	0,9255	1,0888
9,5	0,8754	1,2043	0,9647	1,1347
10,0	0,9127	1,2533	1,0027	1,1803
Atividade Específica (UA/mg)	1,32	30,51	1,81	28,63

Tabela A31: Determinação do balanço de atividade enzimática de tripsina precipitada com sulfato de amônio de concentração de 3,8 mol/kg

Tempo de reação (min)	Ensaio 1		Ensaio 2	
	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado	A280 nm Sobrenadante	A280 nm Precipitado
0,0	0,0482	0,0646	0,0370	0,0634
0,5	0,0812	0,1356	0,0642	0,1308
1,0	0,1116	0,2045	0,0851	0,1965
1,5	0,1403	0,2721	0,1080	0,2598
2,0	0,1684	0,3394	0,1339	0,3219
2,5	0,1957	0,4022	0,1565	0,3827
3,0	0,2231	0,4646	0,1796	0,4419
3,5	0,2500	0,5241	0,2009	0,4998
4,0	0,2764	0,5836	0,2243	0,5570
4,5	0,3019	0,6427	0,2443	0,6126
5,0	0,3279	0,6986	0,2666	0,6666
5,5	0,3534	0,7543	0,2878	0,7189
6,0	0,3785	0,8081	0,3090	0,7709
6,5	0,4034	0,8621	0,3298	0,8212
7,0	0,4281	0,9132	0,3512	0,8711
7,5	0,4522	0,9644	0,3716	0,9199
8,0	0,4760	1,0142	0,3923	0,9670
8,5	0,4998	1,0641	0,4110	1,0138
9,0	0,5232	1,1121	0,4300	1,0596
9,5	0,5465	1,1582	0,4499	1,1049

10,0	0,5697	1,2043	0,4688	1,1478
Atividade Específica (UA/mg)	0,45	29,76	0,37	29,45

Tabela A32: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg

Tempo de equilíbrio (h)	Massa Inicial (mg)	Absorbância a 280 nm		Massa de proteína (mg)	
		Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
1	30,0	0,3422	0,3939	14,94	17,18
1	30,0	0,2524	0,4545	11,04	19,81
3	30,0	0,3531	0,3804	15,41	16,59
3	29,9	0,3034	0,4252	13,26	18,54
5	30,3	0,3419	0,3969	14,92	17,31
5	29,9	0,2672	0,4485	11,69	19,55
8	30,3	0,3549	0,3976	15,49	17,34
8	30,0	0,3154	0,4255	13,78	18,55

Tabela A33: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 9,1 mol/kg

Tempo de equilíbrio (h)	Massa Inicial (mg)	Absorbância a 280 nm		Massa de proteína (mg)	
		Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
1	30,0	0,3422	0,3939	14,94	17,18
1	30,0	0,2524	0,4545	11,04	19,81
3	30,0	0,3531	0,3804	15,41	16,59
3	29,9	0,3034	0,4252	13,26	18,54

5	30,3	0,3419	0,3969	14,92	17,31
5	29,9	0,2672	0,4485	11,69	19,55
8	30,3	0,3549	0,3976	15,49	17,34
8	30,0	0,3154	0,4255	13,78	18,55

Tabela A34: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com sulfato de amônio

Ensaio	Concentração do sal (mol/kg)	Massa inicial (mg)	Absorbância a 280nm		Massa de proteína (mg)	
			Sobrenad.	Precipit.	Sobrenad.	Precipit.
Ensaio 1	1,9	30,0	0,4370	0,6874	19,05	11,96
Ensaio 2		30,3	0,4030	0,5224	17,57	11,38
Ensaio 1	2,7	30,3	0,2005	0,3296	1,76	28,78
Ensaio 2		30,0	0,2530	0,3258	2,21	28,45
Ensaio 1	3,8	30,0	0,0714	0,3286	0,64	28,70
Ensaio 2		30,1	0,0642	0,3456	0,58	30,17

Tabela A35: Determinação do balanço de atividade de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg a 4°C após a remoção do sal volátil.

Tempo (min)	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
0,0	0,0708	0,0365	0,0443	0,0629
0,5	0,1187	0,0873	0,0938	0,1122
1,0	0,1640	0,1379	0,1414	0,1615
1,5	0,2082	0,1880	0,1882	0,2100

2,0	0,2517	0,2379	0,2335	0,2579
2,5	0,2937	0,2879	0,2776	0,3052
3,0	0,3362	0,3372	0,3211	0,3517
3,5	0,3782	0,3862	0,3640	0,3976
4,0	0,4198	0,4345	0,4062	0,4434
4,5	0,4613	0,4822	0,4475	0,4887
5,0	0,5016	0,5299	0,4883	0,5329
5,5	0,5417	0,5766	0,5282	0,5764
6,0	0,5808	0,6229	0,5676	0,6191
6,5	0,6200	0,6681	0,6063	0,6605
7,0	0,6582	0,7128	0,6453	0,7016
7,5	0,6961	0,7570	0,6838	0,7415
8,0	0,7335	0,8001	0,7227	0,7815
8,5	0,7703	0,8432	0,7618	0,8206
9,0	0,8062	0,8849	0,7990	0,8602
9,5	0,8418	0,9258	0,8366	0,8981
10,0	0,8769	0,9658	0,8735	0,9372
Atividade específica (UA/mg)	12,09	11,29	11,58	12,09

Tabela A36: Determinação do balanço de atividade de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 9,1 mol/kg a 4°C após a remoção do sal volátil.

Tempo (min)	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	Sobrenad.	Precipit	Sobrenad	Precipit	Sobrenad	Precipit
0,0	0,0343	0,0286	0,0594	0,0297	0,0372	0,0450

0,5	0,0835	0,0637	0,1129	0,0703	0,0785	0,0876
1,0	0,1263	0,1013	0,1654	0,1105	0,1194	0,1305
1,5	0,1733	0,1346	0,2151	0,1508	0,1608	0,1734
2,0	0,2188	0,1698	0,2639	0,1916	0,2016	0,2171
2,5	0,2652	0,2058	0,3129	0,2312	0,2426	0,2595
3,0	0,3118	0,2440	0,3610	0,2716	0,2835	0,3030
3,5	0,3581	0,2774	0,4081	0,3115	0,3240	0,3469
4,0	0,4042	0,3131	0,4547	0,3514	0,3643	0,3890
4,5	0,4490	0,3479	0,5020	0,3910	0,4035	0,4311
5,0	0,4946	0,3822	0,5478	0,4299	0,4421	0,4716
5,5	0,5384	0,4173	0,5929	0,4686	0,4804	0,5113
6,0	0,5826	0,4517	0,6377	0,5069	0,5181	0,5513
6,5	0,6257	0,4862	0,6822	0,5449	0,5552	0,5904
7,0	0,6684	0,5205	0,7265	0,5823	0,5918	0,6310
7,5	0,7114	0,5535	0,7703	0,6192	0,6277	0,6705
8,0	0,7541	0,5868	0,8132	0,6556	0,6628	0,7097
8,5	0,7953	0,6190	0,8559	0,6924	0,6966	0,7475
9,0	0,8364	0,6510	0,8972	0,7286	0,7309	0,7850
9,5	0,8775	0,6828	0,9385	0,7641	0,7647	0,8200
10,0	0,9181	0,7145	0,9798	0,7998	0,7991	0,8552
Atividade específica (UA/mg)	2,59	10,34	2,34	11,85	1,75	12,94

Tabela A37: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 7,1 mol/kg a 4°C após a remoção do sal volátil.

Ensaio	Massa inicial (mg)	Absorbância a 280 nm		Massa de proteína (mg)	
		Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
Ensaio 1	30,1	0,3811	0,6196	16,62	13,48
Ensaio 2	30,3	0,3536	0,6971	15,43	15,16

Tabela A38: Determinação do balanço de massa de tripsina precipitada com carbamato de amônio de concentração de 9,1 mol/kg a 4°C após a remoção do sal volátil.

Ensaio	Massa inicial (mg)	Absorbância a 280 nm		Massa de proteína (mg)	
		Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado
Ensaio 1	20,1	0,3807	0,3941	3,32	17,19
Ensaio 2	20,6	0,3248	0,3998	2,84	17,44
Ensaio 3	20,2	0,2912	0,4080	2,55	17,79