



**GISELE ATSUKO MEDEIROS HIRATA**

Eng<sup>a</sup> Química

**DETERMINAÇÃO DE DIAGRAMAS DE FASES E  
DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL OSMÓTICO  $B_{22}$  NA CRISTALIZAÇÃO DE  
PROTEÍNAS COM SAL VOLÁTIL CARBAMATO DE AMÔNIO**

**CAMPINAS**

**2013**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

GISELE ATSUKO MEDEIROS HIRATA

Eng<sup>a</sup> Química

**DETERMINAÇÃO DE DIAGRAMAS DE FASES E  
DO SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL OSMÓTICO  $B_{22}$  NA CRISTALIZAÇÃO DE  
PROTEÍNAS COM SAL VOLÁTIL CARBAMATO DE AMÔNIO**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Everson Alves Miranda

**Coorientador:** Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessôa Filho

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA GISELE ATSUKO MEDEIROS HIRATA E ORIENTADA PELO PROFESSOR DR. EVERSON ALVES MIRANDA.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Everson", is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

CAMPINAS

2013

iii

---

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

H613d Hirata, Gisele Atsuko Medeiros, 1984-  
Determinação de diagramas de fases e do segundo coeficiente virial osmótico B22 na cristalização de proteínas com sal volátil carbamato de amônio / Gisele Atsuko Medeiros Hirata. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Everson Alves Miranda.  
Coorientador: Pedro de Alcântara Pessoa Filho.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cristalização. 2. Diagramas de fases. 3. Sal. 4. Proteína. 5. Interações proteína-proteína. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Pessoa Filho, Pedro de Alcântara. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Determination of phase diagrams and osmotic second virial coefficient B22 in protein crystallization with the volatile salt ammonium carbamate

**Palavras-chave em inglês:**

Crystallization

Phase diagram

Salt

Protein

Protein-protein interactions

**Área de concentração:** Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Titulação:** Doutora em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Everson Alves Miranda [Orientador]

Érika Ohta Watanabe

André Bernardo

Alexandre Keiji Tashima

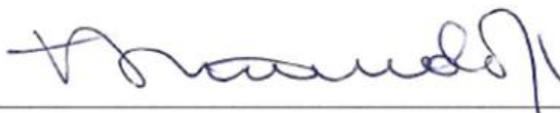
Antonio José de Almeida Meirelles

**Data de defesa:** 09-12-2013

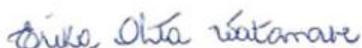
**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

---

Tese de Doutorado defendida por Gisele Atsuko Medeiros Hirata e aprovada em 09 de Dezembro de 2013  
pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Everson Alves Miranda (orientador)



Profª. Drª. Érika Ohta Watanabe - UFU



Prof. Dr. André Bernardo - UFSCar



Prof. Dr. Alexandre Keiji Tashima - UNIFESP



Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles – FEA/UNICAMP



---

## RESUMO

O segundo coeficiente virial osmótico,  $B_{22}$ , tem sido considerado um preditor para o processo de cristalização. Uma faixa relativamente estreita de valores negativos de  $B_{22}$ ,  $-1 \times 10^{-4}$  a  $-8 \times 10^{-4}$  mL.mol/g<sup>2</sup>, é ideal à formação de cristais de acordo com George e Wilson (1994). Essa faixa de valores de  $B_{22}$  é denominada de “janela de cristalização”, sendo utilizada para classificar condições adequadas de solvente à formação de cristais. Para valores maiores que  $-1 \times 10^{-4}$  mL.mol/g<sup>2</sup>, a interação proteína-proteína não é suficientemente forte para a cristalização e nenhuma fase sólida é formada, enquanto para valores menores que  $-8 \times 10^{-4}$  mL.mol/g<sup>2</sup>, as interações proteína-proteína são muito intensas e precipitados amorfos são formados. Dessa forma, os valores de  $B_{22}$  se tornaram um critério de seleção para a cristalização de proteínas, uma vez que esse coeficiente pode ser determinado por diversos métodos. Este trabalho teve como objetivo determinar experimentalmente diagramas de fases de proteínas (lisozima, insulina suína e bovina) e identificar nesses diagramas, através de análise dos valores do  $B_{22}$ , as condições nas quais ocorre a formação de precipitado amorfo, cristalino ou outras fases (por exemplo, fase líquida). O “salting-out” foi o método escolhido para precipitar as proteínas, pois é considerado um dos mais simples e importantes métodos para induzir a cristalização. O sal volátil carbamato de amônio foi o agente de “salting-out” escolhido. As técnicas de espalhamento de luz estático (SLS) e cromatografia de auto-interação (SIC) foram usadas para determinar os valores de  $B_{22}$  para as proteínas em diferentes soluções aquosas de sal a 15 e 25 °C. O fenômeno de “salting-out” foi observado nos diagramas para as três proteínas estudadas. Valores negativos de  $B_{22}$  e altos valores da constante de “salting-out” — entre 1,07 a 3,77 kg/mol — confirmaram que o sal volátil carbamato de amônio empregado neste estudo é um bom agente precipitante. Os valores do  $B_{22}$  para a insulina suína ( $-250 \times 10^{-4}$  a  $-18 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> a 25 °C e  $-187 \times 10^{-4}$  a  $-45,2 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> a 15 °C) e insulina bovina ( $-999 \times 10^{-4}$  a  $6,7 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> a 25 °C e  $-533 \times 10^{-4}$  a  $-16,7 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> a 15 °C) indicaram a precipitação, o que também foi confirmado pelos ensaios de cristalização. Já para a lisozima, obteve-se formação de cristais independente do valor de  $B_{22}$  encontrado ( $-20,4 \times 10^{-4}$  a  $-3,6 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> a 25 °C e  $-400 \times 10^{-4}$  a  $-14,4 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> a 15 °C). Além disso, os modelos teóricos disponíveis na literatura utilizados para a obtenção de uma estimativa do parâmetro  $B_{22}$  são adequados e válidos para as condições em que a medida experimental não é possível, podendo ser aplicados para o sistema proteína/sal volátil. Dessa forma, este trabalho mostrou que não existe uma “janela de cristalização universal” válida para todos os sistemas e o uso do sal volátil carbamato de amônio como agente de cristalização é uma alternativa ao uso de sais convencionais.



---

## ABSTRACT

The osmotic second virial coefficient,  $B_{22}$ , has been used as a predictor of crystallization. A relatively narrow range of negative  $B_{22}$  values,  $-1 \times 10^{-4}$  to  $-8 \times 10^{-4}$  mL.mol/g<sup>2</sup>, is the ideal range for crystal formation according to George and Wilson (1994). This range, referred to as the "crystallization slot", has been used to classify suitable conditions under which proteins will assemble into crystals. For  $B_{22}$  values greater than  $-1 \times 10^{-4}$  mL.mol/g<sup>2</sup>, the protein-protein interaction is very weak and no solid phase is formed, while for values less than  $-8 \times 10^{-4}$  mL.mol/g<sup>2</sup>, the protein-protein interactions are very intense and amorphous precipitates are formed. Thus, the  $B_{22}$  value has become a selection criterion for protein crystallization, since this coefficient can be determined by various methods. This study aimed to determine the experimental phase diagrams for proteins (lysozyme and bovine and porcine insulin) and to identify those diagram conditions under which amorphous precipitate, crystals or other phases (for example, liquid phase) are formed, based on the values of  $B_{22}$ . The salting-out method to precipitate proteins was chosen because it is considered one of the simplest and most important methods to induce crystallization. The volatile salt ammonium carbamate was chosen as the salting-out agent. Traditional static light scattering (SLS) and the novel self-interaction chromatography (SIC) technique were used to determine  $B_{22}$  values for the proteins in different aqueous salt solutions at 15 and 25 °C. The salting-out phenomenon was observed in the phase diagrams for the three proteins studied. Negative  $B_{22}$  values and high values of the salting-out constant – between 1.07 to 3.77 kg/mole (Cohn, 1925) – confirmed that ammonium carbamate was a good precipitant agent. The  $B_{22}$  values for porcine ( $-250 \times 10^{-4}$  to  $-18 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> at 25 °C and  $-187 \times 10^{-4}$  to  $-45.2 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> at 15 °C) and bovine ( $-999 \times 10^{-4}$  to  $6.7 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> at 25 °C and  $-533 \times 10^{-4}$  to  $-16.7 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> at 15 °C) insulin indicated precipitation that was confirmed experimentally. However, lysozyme was obtained as crystals, regardless of the  $B_{22}$  values found ( $-20.4 \times 10^{-4}$  to  $-3.6 \times 10^{-4}$  mol.ml/g<sup>2</sup> at 25 °C and  $-14.4 \times 10^{-4}$  to  $-400 \times 10^{-4}$  mol.ml/g at 15 °C). In addition, thermodynamic models available in the literature and suitable for the conditions under which experimental measurements were done provided a good fit to the data. Thus, this work showed that there is no universal "crystallization slot" applicable to all systems and that for crystallization agent, volatile salt ammonium carbamate can serve as an alternative to conventional salts.



---

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 Colocação do problema e objetivo</b> .....	2
<b>1.2 Plano de trabalho desenvolvido</b> .....	4
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<b>2.1 Cristalização em processos de recuperação e purificação de proteínas</b> .....	7
<b>2.2 Diagrama de fases para soluções aquosas de proteínas</b> .....	11
<b>2.3 Segundo coeficiente virial osmótico (<math>B_{22}</math>), a proposta de George e Wilson (1994) e métodos de medidas</b> .....	16
<b>2.3.1 Osmometria de membranas</b> .....	20
<b>2.3.2 Espalhamento de luz (static light scattering - SLS)</b> .....	22
<b>2.3.3 Cromatografia de auto-interação (self-interaction chromatography - SIC)</b> .....	23
<b>2.4 Modelagem termodinâmica para correlação do segundo coeficiente virial com a solubilidade de proteína</b> .....	27
<b>2.4.1 Relação teórica de Haas, Drenth e Wilson (1999)</b> .....	28
<b>2.4.2 Relação teórica de Ruppert, Sandler e Lenhoff (2001)</b> .....	29
<b>2.4.3 Relação teórica de Franco e Pessôa Filho (2013)</b> .....	31
<b>2.5 Sais voláteis</b> .....	32
<b>2.6 Proteínas estudadas</b> .....	33
<b>2.6.1 Insulina</b> .....	33
<b>2.6.2 Lisozima</b> .....	36

---

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
<b>3.1 Materiais</b> .....	39
<b>3.1.1 Reagentes</b> .....	39
<b>3.1.2 Equipamentos</b> .....	39
<b>3.2 Metodologia</b> .....	40
<b>3.2.1 Determinação de diagramas de fases das proteínas nas temperaturas de 15 e 25 °C</b> .....	40
3.2.1.1 <i>Determinação das curvas de solubilidade das proteínas de interesse em solução de sal volátil carbamato de amônio</i> .....	40
3.2.1.2 <i>Estimativa da zona de metaestabilidade no diagrama de fases</i> .....	41
<b>3.2.2 Determinações experimentais do segundo coeficiente virial osmótico (<math>B_{22}</math>)</b> .....	42
3.2.2.1 <i>Determinação do parâmetro <math>B_{22}</math> por osmometria de membranas</i> .....	42
3.2.2.2 <i>Determinação do parâmetro <math>B_{22}</math> por espalhamento de luz estático (SLS)</i> .....	43
3.2.2.3 <i>Determinação do parâmetro <math>B_{22}</math> por cromatografia de auto-interação (SIC)</i> .....	45
<b>3.2.3 Ensaios preliminares de cristalização/precipitação de insulina suína com sal volátil a 15 °C</b> .....	46
<b>3.2.4 Ensaios de cristalização/precipitação com sal volátil a 15 e 25 °C</b> .....	47
<b>3.2.5 Determinação da concentração das proteínas</b> .....	48
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	49
<b>4.1 Determinação de diagramas de fases das proteínas nas temperaturas de 15 e 25 °C</b> .....	49
<b>4.2 Determinações experimentais do parâmetro termodinâmico <math>B_{22}</math></b> .....	56
<b>4.2.1 Ensaios de SLS para as soluções aquosas de proteína em carbamato de amônio a 15 e 25 °C</b> .....	57
<b>4.2.2 Ensaios de SIC para as soluções aquosas de proteína em carbamato de amônio a 15 e 25 °C</b> .....	62

---

4.3 Ensaio preliminar para verificação da cristalização de insulina suína com sal volátil a 15 °C.....	65
4.3.1 Ensaio de cristalização/precipitação com sal volátil nas condições de medição do parâmetro $B_{22}$ .....	67
4.4 Determinação de valores de $B_{22}$ através do uso de modelos termodinâmicos .....	75
4.5 Relação entre o $B_{22}$ e as condições de cristalização .....	84
5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	87
5.1 Conclusões .....	87
5.2 Sugestões para trabalhos futuros .....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
APÊNDICE 1 .....	105
APÊNDICE 2 .....	109
A2.1 Índice de refração, densidade e viscosidade das soluções de carbamato de amônio nas temperaturas de 15 °C e 25 °C .....	109
A2.2 Determinação do incremento do índice de refração em função da concentração da proteína para a lisozima a 25 °C .....	111
A2.3 Curvas padrão para dosagem de proteína por absorvância a 280 nm .....	113
A2.4 Curvas padrão para dosagem de proteína por absorvância a 595 nm .....	116
A2.5 Solubilidade das proteínas lisozima, insulina suína e insulina bovina em carbamato de amônio a 15 e 25 °C .....	118

---

<b>A2.6 Dados de <math>B_{22}</math> para as proteínas de interesse em carbamato de amônio a 15 e 25 °C</b>	
<b>determinados por SLS .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE 3 .....</b>	<b>123</b>
<b>A.3.1 Correlação entre o segundo coeficiente virial osmótico e a solubilidade de proteínas.....</b>	<b>123</b>

---

## DEDICATÓRIA

*“Aos meus queridos pais Nelson e Sonia.”*



---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus.

Aos meus pais, Nelson e Sonia, e irmãs, Erin, Talita e Giovana, pela compreensão, incentivo, amor e apoio durante todos os momentos da minha vida.

Ao prof. Dr. Everson Alves Miranda, por ter aceitado a orientação deste trabalho, pela paciência e confiança depositada em mim. Agradeço pela dedicação, entusiasmo e críticas que contribuíram não só para o desenvolvimento do trabalho, mas também para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada pelas demonstrações de amizade e generosidade durante todos esses anos.

Ao prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho, por disponibilizar o seu laboratório e ter coorientado este trabalho com paciência e entusiasmo, sempre estando disponível quando necessário. Obrigada pela atenção e sugestões indispensáveis para a realização desta tese.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno e à prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Maria Moraes por disponibilizarem seus laboratórios.

Aos profs. Dr. Martín Aznar da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, Dr<sup>a</sup>. Liliane Maria Ferrareso Lona da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, Dr. Watson Loh do Instituto de Química da UNICAMP, Dr. Antonio José de Almeida Meirelles da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP por disponibilizarem seus equipamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos alunos Leonardo Hadlich de Oliveira, Rodrigo Côrrea Basso, Ana Percebom e José Costa de Macêdo Neto por disponibilizarem de tempo e terem me ensinado a operar os equipamentos, o que tornou possível a continuidade do trabalho.

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

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Alvina Krähenbühl e à prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Érika Ohta Watanabe, membros da banca de qualificação, que contribuíram com importantes sugestões para a finalização da tese.

Aos amigos do LEBp, LIMBio e LEBC pelo companheirismo, incentivo, convivência e pelos momentos de diversão.

---

Ao CNPq, à Capes e à Fapesp pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E finalmente, ao Rafael, por me compreender e motivar sempre a ir adiante, meu porto seguro.

Obrigada por cuidar de mim e tornar meus dias mais alegres e bonitos.

---

*“É preciso arriscar para fazer grandes descobertas.  
Correr riscos e aceitar a possibilidade de fracasso devem  
ser encarados como parte natural do processo científico.”*

*Marcia McNutt*

*“Lembre-se da sabedoria da água:  
ela nunca discute com um obstáculo, simplesmente o contorna.”*

*Augusto Cury*



---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – Fluxograma representativo do plano de trabalho (etapas numeradas na ordem de execução das atividades).....	5
<b>Figura 2.1</b> – Série de Hofmeister (Zhang e Cremer, 2006).....	10
<b>Figura 2.2</b> – Curva de resfriamento para o NaNO <sub>3</sub> e a formação de uma região metaestável obtida por Miers e Isaac (1907) (FEIGELSON, 1988).....	11
<b>Figura 2.3</b> – Diagrama de fases completo para a lisozima obtido por Cacioppo e Pusey (1991) (MCPHERSON, 1999). ....	12
<b>Figura 2.4</b> – Diagrama de fases esquemático para a cristalização de proteína e a representação das diferentes regiões e zonas do processo de separação. ....	14
<b>Figura 2.5</b> – Diagramas de fases bidimensionais (concentração da proteína em função da concentração do precipitante) para: lisozima (a) e catalase (b) em diferentes temperaturas. Curvas de: solubilidade (—), nucleação (—) e precipitação (—) (LIN <i>et al.</i> , 2008). ....	15
<b>Figura 2.6</b> – Condições de cristalização de literatura utilizadas por George e Wilson (1994) e os valores de $B_{22}$ determinados por eles através de SLS. ....	18
<b>Figura 2.7</b> – Exemplos de medidas do segundo coeficiente virial osmótico ( $B_{22}$ ) em função da força iônica (I) para diferentes proteínas na presença de diferentes eletrólitos em valores de pH distintos: <b>(a)</b> lisozima a pH 4,5 (□), pH 6,0 (△) e pH 9,0 (◇) em solução de cloreto de sódio; <b>(b)</b> ribonuclease A a pH 3,0 (▲), pH 6,5 (△) e α-quimotripsinogênio a pH 3,0 (■) e pH 6,8 (□) em solução de cloreto de sódio; <b>(c)</b> ferritina a pH 5,0 (□) em solução de acetato de sódio e lisozima a pH 7,8 (△) em solução de brometo de magnésio, <b>(d)</b> mioglobina a pH 6,0 (△), ovalbumina a pH 6,0 (◇), albumina de soro bovino a pH 6,2 (□) e malato desidrogenase a pH 8,0 (○) em solução de sulfato de amônio e mioglobina a pH 7,4 (▲) e albumina de soro bovino a pH 7,0 (■) em solução de cloreto de sódio. A região sombreada corresponde ao intervalo definido por George e Wilson (1994) como a “janela de cristalização” onde ocorre a cristalização. (Adaptado de Tessier e Lenhoff, 2003).....	19

---

<b>Figura 2.8</b> – Efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no segundo coeficiente virial osmótico ( $B_2$ ) para a BSA em diferentes valores de pH a 25°C: (■) pH 4,5; (●) pH 4,8; (▲) pH 5,4 e (▼) pH 7,4 (modificado de Lu <i>et al.</i> , 2009).....	21
<b>Figura 2.9</b> – Dependência do valor de $B_{22}$ em função do pH obtidos por SLS em quatro diferentes concentrações de eletrólitos para a lisozima da clara de ovo de galinha (a) e o quimotripsinogênio bovino (b) (VELEV <i>et al.</i> , 1998).....	24
<b>Figura 2.10</b> – Comparação entre os valores de coeficiente virial osmótico medidos por SIC e diferentes técnicas para a lisozima de clara de ovo de galinha (a) e quimotripsinogênio bovino (b) (TESSIER <i>et al.</i> , 2002a).....	26
<b>Figura 2.11</b> – Medidas de $B_{22}$ para a lisozima de clara de ovo de galinha em diferentes fases estacionárias para pH 4,5 a 23-25°C: agarose (—), Toyopearl® (○) e agarose reticulada (x) (AHAMED <i>et al.</i> , 2005)....	27
<b>Figura 2.12</b> – Solubilidade em função de valores de $B_{22}$ para a lisozima de clara de ovo de galinha dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L para pH 4,2 a 25°C em diferentes concentrações de NaCl (GUO <i>et al.</i> , 1999).....	28
<b>Figura 2.13</b> – Comparação entre o modelo teórico de Haas <i>et al.</i> (1999) e os valores experimentais de $B_{22}$ em função da solubilidade para diferentes sistemas de lisozima: tampão acetato de sódio 0,1 mol/L a pH 4,2 e 25 °C em várias concentrações de NaCl (○); tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, NaCl 2% (m/v) em vários valores de pH a 25°C (□); tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, NaCl 2% (m/v) a pH 4,2 em várias temperaturas (Δ); tampão acetato de sódio 0,05 mol/L a pH 4,5 e 18 °C em várias concentrações de sulfato de amônio (▽); HEPES 0,02 mol/L a pH 7,8 e 23 °C em várias concentrações de brometo de magnésio (◇) (HAAS <i>et al.</i> , 1999).....	30
<b>Figura 2.14</b> – Comparação entre o modelo teórico de Ruppert <i>et al.</i> (2001) e os valores experimentais de $B_{22}$ em função da solubilidade para diferentes sistemas de lisozima (adaptado de Ruppert <i>et al.</i> , 2001)....	31
<b>Figura 2.15</b> – Estruturas primárias das insulinas suína e bovina (The International Pharmacopoeia, 2013).....	35
<b>Figura 2.16</b> – Estrutura molecular da insulina incluindo o monômero, dímero e hexâmero. O complexo insulina-zinco é a unidade cristalina importante na formação do cristal romboédrico (Adaptado de Whittingham <i>et al.</i> , 2002).....	36

---

<b>Figura 2.17</b> – Estrutura tridimensional da lisozima de clara de ovo de galinha (PDB – 2LYZ).....	37
<b>Figura 3.1</b> – Ilustração da metodologia utilizada para determinação da solubilidade das proteínas por ensaios de dissolução.....	41
<b>Figura 3.2</b> – Esquema do procedimento experimental para determinação do limite de metaestabilidade através de ensaios de nucleação.....	42
<b>Figura 3.3</b> – Ilustração do interior do osmômetro de membrana (adaptado de Colloid Osmometer Model 4420 Operator & Service Manual, M2054-3 <sup>a</sup> , Wescor Inc. An Elitech Company). ....	43
<b>Figura 3.4</b> – Ilustração da metodologia experimental para determinação do parâmetro $B_{22}$ por espalhamento de luz, $M_p$ = massa molar da proteína (adaptado de Zetasizer Nano Series User Manual, Malvern Instruments). ....	44
<b>Figura 3.5</b> – Representação simplificada da cromatografia de auto-interação para determinação do parâmetro $B_{22}$ . ....	46
<b>Figura 3.6</b> – Ilustração da metodologia experimental utilizada nos ensaios preliminares de cristalização de insulina suína com sal volátil a 15 °C. ....	47
<b>Figura 3.7</b> – Ilustração da metodologia experimental utilizada nos ensaios de cristalização de proteína com sal volátil a 15 e 25 °C. Eletrodo de pH (1), sensor de turbidez acoplado ao agitador magnético suspenso (2), sensor de temperatura (3), placa de agitação magnética (4), computador para aquisição dos dados (5), circulador para controle da temperatura do reator (6).....	48
<b>Figura 4.1</b> – Diagrama de fases para a lisozima em carbamato de amônio a 25°C (a) e 15°C (b). (●) Limite de supersaturação e (○) solubilidade (linha como guia visual). ....	50
<b>Figura 4.2</b> – Diagrama de fases para as insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 25°C e 15°C. (●) Limite de supersaturação e (○) solubilidade (linha como guia visual). ....	51
<b>Figura 4.3</b> – Correlação da solubilidade das proteínas estudadas com a concentração de carbamato de amônio a 25 °C (●) e 15 °C (○) segundo a equação de Cohn (1925). ....	55
<b>Figura 4.4</b> – Efeito da concentração de sal volátil no valor de $B_{22}$ para o sistema lisozima/carbamato de amônio a 25 °C (●) e 15 °C (○).....	58
<b>Figura 4.5</b> – Efeito da concentração de sal volátil no valor de $B_{22}$ medido por SLS para o sistema insulina suína/carbamato de amônio a 25 °C (●) e 15 °C (○). ....	60

---

<b>Figura 4.6</b> – Efeito da concentração de sal volátil no valor de $B_{22}$ medido por SLS para o sistema insulina bovina/carbamato de amônio a 25 °C (●) e 15 °C (○).	60
<b>Figura 4.7</b> – Perfis de eluição obtidos por SIC a 25 °C para a lisozima em função da concentração de carbamato de amônio (em mol/kg): 0,06 (—), 0,025 (—·), 0,45 (—·—), 0,69 (—·—·), 0,90 (—·—·—), 1,09 (—·—·—·) e 1,29 (—·—·—·—).	62
<b>Figura 4.8</b> – Perfis de eluição obtidos por SIC a 25 °C para a insulina suína em função da concentração de carbamato de amônio (em mol/kg): 0,06 (—), 0,25 (—), 0,45 (—), 0,69 (—), 0,90 (—), 1,09 (—) e 1,29 (—).	63
<b>Figura 4.9</b> – Perfis de eluição obtidos por SIC a 25 °C para a insulina bovina em função da concentração de carbamato de amônio (em mol/kg): 0,06 (—), 0,25 (—), 0,45 (—), 0,69 (—), 0,90 (—) e 1,09 (—).	63
<b>Figura 4.10</b> – Fotomicrografias de precipitados de insulina suína em carbamato de amônio a 15°C (ampliação de 400x).	66
<b>Figura 4.11</b> – Fotomicrografias de cristais de insulina suína em carbamato de amônio a 15 °C (ampliação de 400x).	67
<b>Figura 4.12</b> – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos cristais de lisozima obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 25 °C: 1,29 (a), 1,09 (b), 0,90 (c), 0,69 (d), 0,45 (e) e 0,25 (f).	68
<b>Figura 4.13</b> – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos cristais de lisozima obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 15 °C em carbamato de amônio 1,29 (a), 1,09 (b), 0,90 (c), 0,69 (d), 0,45 (e), 0,25 (f) e 0,06 (g).	69
<b>Figura 4.14</b> – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos cristais de insulina suína obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 25 °C: 1,29 (a), 1,09 (b) e 0,90 (c).	71
<b>Figura 4.15</b> – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos cristais de insulina suína obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 15 °C: 1,29 (a), 1,09 (b), 0,90 (c) e 0,69 (d).	72

---

<b>Figura 4.16</b> – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos cristais de insulina bovina obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 25 °C: 1,29 <b>(a)</b> , 1,09 <b>(b)</b> , 0,90 <b>(c)</b> , 0,69 <b>(d)</b> e 0,45 <b>(e)</b> .....	73
<b>Figura 4.17</b> – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos cristais de insulina bovina obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 15 °C: 1,29 <b>(a)</b> , 1,09 <b>(b)</b> , 0,90 <b>(c)</b> , 0,69 <b>(d)</b> , 0,45 <b>(e)</b> .....	74
<b>Figura 4.18</b> – Esquema ilustrativo utilizado para a estimativa dos parâmetros ajustáveis dos modelos teóricos de Haas <i>et al.</i> (1999), Ruppert <i>et al.</i> (2001) e Franco e Pessôa Filho (2013). ....	76
<b>Figura 4.19</b> – Correlações entre o segundo coeficiente virial osmótico e a solubilidade das proteínas lisozima e insulinas suína e bovina obtidas pelo modelo termodinâmico Haas <i>et al.</i> (1999). (●, —) 15 °C e (○, - - - -) 25 °C. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas ao ajuste teórico. ....	80
<b>Figura 4.20</b> – Correlações entre o segundo coeficiente virial osmótico e a solubilidade das proteínas lisozima e insulinas suína e bovina obtidas pelo modelo termodinâmico Ruppert <i>et al.</i> (2001). (●, —) 15 °C e (○, - - - -) 25 °C. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas ao ajuste teórico. ....	81
<b>Figura 4.21</b> – Correlações entre o segundo coeficiente virial osmótico e a concentração de carbamato de amônio para as proteínas lisozima <b>(a)</b> e insulinas suína <b>(b)</b> e bovina <b>(c)</b> obtidas pelo modelo termodinâmico Franco e Pessôa Filho (2013). (●, —) 15 °C e (○, - - - -) 25 °C. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas ao ajuste teórico. ....	82
<b>Figura 4.22</b> – Esquema comparativo entre os coeficientes viriais medidos por SLS e SIC para as proteínas lisozima e insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 15 °C e 25°C (escala ilustrativa para os valores de $B_{22}$ ). ....	85
<b>Figura A1.1</b> – Diagrama esquemático de um equilíbrio osmótico. Membrana é permeável ao solvente (1), mas não ao soluto (2).. ....	106
<b>Figura A2.2</b> – Determinação do incremento do índice de refração em função da concentração da proteína para a insulina suína <b>(a)</b> , bovina <b>(b)</b> em carbamato de amônio 0,06 mol/kg e lisozima <b>(c)</b> em carbamato de amônio 1,29 mol/kg a 25 °C. ....	112
<b>Figura A2.3</b> – Curva padrão para a medida de absorvância a 280 nm da solução de lisozima em água, Concentração de lisozima = 0,4029 x Absorvância (280 nm), $R^2 = 0,999$ . ....	113

---

<b>Figura A2.4</b> – Curva padrão para a medida de absorvância a 280 nm da solução de insulina suína em carbamato de amônio 0,06 mol/kg, Concentração de insulina suína = 1,0273 x Absorvância (280 nm), R <sup>2</sup> = 0,998.....	114
<b>Figura A2.5</b> – Curva padrão para a medida de absorvância a 280 nm da solução de insulina bovina em carbamato de amônio 0,06 mol/kg, Concentração de insulina bovina = 1,1202 x Absorvância (280 nm), R <sup>2</sup> = 0,999.....	114
<b>Figura A2.6</b> – Curva padrão para a medida de absorvância a 280 nm da solução de lisozima em NaHCO <sub>3</sub> 0,1 mol/L e NaCl 0,5 mol/L, Concentração de lisozima = 0,385 x Absorvância (280 nm), R <sup>2</sup> = 0,999.....	115
<b>Figura A2.7</b> – Curva padrão para a medida de absorvância a 280 nm da solução de insulina suína em NaHCO <sub>3</sub> 0,1 mol/L e NaCl 0,5 mol/L, Concentração de insulina suína = 0,906 x Absorvância (280 nm), R <sup>2</sup> = 0,999.....	115
<b>Figura A2.8</b> – Curva padrão para a medida de absorvância a 280 nm da solução de insulina bovina em NaHCO <sub>3</sub> 0,1 mol/L e NaCl 0,5 mol/L, Concentração de insulina bovina = 0,928 x Absorvância (280 nm), R <sup>2</sup> = 0,999.....	116
<b>Figura A2.9</b> – Curva padrão para a medida de absorvância a 595 nm da solução de insulina suína em bicarbonato de amônio 10 mmol/L, Concentração de insulina suína = 50,93 x Absorvância (280 nm), R <sup>2</sup> = 0,989.....	117
<b>Figura A2.10</b> – Curva padrão para a medida de absorvância a 595 nm da solução de insulina bovina em bicarbonato de amônio 10 mmol/L, Concentração de insulina bovina = 58,68 x Absorvância (280 nm), R <sup>2</sup> = 0,993.....	117

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> – Comparação entre a cristalização e a precipitação (modificado de HARRISON <i>et al.</i> , 2003). ...2	2
<b>Tabela 2.1</b> – Desvios quadráticos médios relativos (DQMR) para diferentes modelos propostos na literatura para sistemas que contém lisozima (adaptado de Franco e Pessoa Filho, 2013). .....32	32
<b>Tabela 4.1</b> – Parâmetros da equação de Cohn (1925) para as proteínas em carbamato de amônio a diferentes temperaturas e para a lisozima a 25 °C em diferentes sais. ....56	56
<b>Tabela 4.2</b> – Pressão osmótica para lisozima em carbamato de amônio a 25 °C.....57	57
<b>Tabela 4.3</b> – Parâmetros utilizados no cálculo do valor de $B_{22}$ para as proteínas lisozima e insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 25 °C através da cromatografia de auto-interação. ....64	64
<b>Tabela 4.4</b> – Dados experimentais da SIC para a determinação e valores de $B_{22}$ correspondentes para a lisozima e para as insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 25 °C. ....64	64
<b>Tabela 4.5</b> – Valores dos parâmetros usados nos modelos termodinâmicos para estimativa do segundo coeficiente virial. ....75	75
<b>Tabela 4.6</b> – Condições utilizadas para as estimativas e ajustes dos parâmetros do modelo de Haas <i>et al.</i> (1999). Valores de solubilidade e $B_{22}$ calculados ( $S$ e $B_{22}$ ) a partir dos dados experimentais ( $S_{exp}$ e $B_{22exp}$ ). .....77	77
<b>Tabela 4.7</b> – Condições utilizadas para as estimativas e ajustes dos parâmetros do modelo de Ruppert <i>et al.</i> (2001). Valores de solubilidade e $B_{22}$ calculados ( $S$ e $B_{22}$ ) a partir dos dados experimentais ( $S_{exp}$ e $B_{22exp}$ ). .....78	78
<b>Tabela 4.8</b> – Condições utilizadas para as estimativas e ajustes dos parâmetros do modelo de Franco e Pessoa Filho (2013). Valores de concentração de sal e $B_{22}$ calculados ( $m$ e $B_{22}$ ) a partir dos dados experimentais ( $m_{exp}$ e $B_{22exp}$ ).....79	79
<b>Tabela A2.1</b> – Índice de refração ( $n_0$ ) para a água e para as soluções de carbamato de amônio. ....109	109
<b>Tabela A2.2</b> – Densidade das soluções do sal volátil carbamato de amônio em diferentes temperaturas.....110	110

---

<b>Tabela A2.3</b> – Viscosidade das soluções sal volátil de carbamato de amônio em diferentes temperaturas.....	110
<b>Tabela A2.4</b> – Incremento do índice de refração em função da concentração da lisozima a 25°C.....	111
<b>Tabela A2.5</b> – Dados de solubilidade para a insulina bovina em diferentes concentrações de carbamato de amônio a 15 e 25°C.....	118
<b>Tabela A2.6</b> – Dados de solubilidade para a insulina suína em diferentes concentrações de carbamato de amônio a 15 e 25°C.....	119
<b>Tabela A2.7</b> – Dados de solubilidade para a lisozima em diferentes concentrações de carbamato de amônio a 15 e 25°C.....	120
<b>Tabela A2.8</b> – Valores de $B_{22}$ para a lisozima em carbamato de amônio a 25°C e 15°C obtidos por espalhamento de luz.....	121
<b>Tabela A2.9</b> – Valores de $B_{22}$ para a insulina suína em carbamato de amônio a 25°C e 15°C obtidos por espalhamento de luz.....	121
<b>Tabela A2.10</b> – Valores de $B_{22}$ para a insulina bovina em carbamato de amônio a 25°C e 15°C obtidos por espalhamento de luz.....	122
<b>Tabela A.3.1</b> – Dados de solubilidade e $B_{22}$ teóricos utilizados para a estimativa do parâmetro ajustável (A) do modelo teórico de Haas <i>et al.</i> (1999).....	123
<b>Tabela A.3.2</b> – Dados de solubilidade e $B_{22}$ teóricos utilizados para a estimativa dos parâmetros ajustáveis (Ac e K) do modelo teórico de Ruppert <i>et al.</i> (2001).....	124
<b>Tabela A.3.3</b> – Dados de concentração de sal ( $m_{sal}$ ) e $B_{22}$ teóricos utilizados para a estimativa dos parâmetros ajustáveis ( $B^*$ e $m^*$ ) do modelo teórico de Franco e Pessôa (2013).....	126

---

## NOMENCLATURAS

a – atividade

A – parâmetro de interação

Ac – parâmetro adimensional

B\* - segundo coeficiente virial osmótico para o estado de referência

B<sub>22</sub> – segundo coeficiente virial osmótico

B<sub>22</sub><sup>exp</sup> – segundo coeficiente virial osmótico experimental

B<sub>22</sub><sup>calculado</sup> – segundo coeficiente virial osmótico calculado

B<sub>HS</sub> – volume excluído ou contribuição da esfera rígida

c – concentração de soluto

c<sub>P</sub> – concentração de proteína

c<sub>s</sub> – concentração no equilíbrio ou solubilidade

c/c<sub>s</sub> – supersaturação

C<sub>222</sub> – terceiro coeficiente virial osmótico

d – diâmetro da proteína

dn/dc<sub>P</sub> – incremento do índice de refração

DQMR – desvio quadrático médio relativo

IgG1 – imunoglobulina

k – constante de Boltzmann

K – constante ótica ou instrumental

k' – fator de retenção

K<sub>s</sub> – constante de “salting-out”

L<sub>r</sub> – raio da partícula

---

mAbs – anticorpos monoclonais

$m_{\text{exp}}$  - molalidade do sal experimental

$m_{\text{sal}}$  – molalidade do sal

$m_{\text{sal}}^*$  – molalidade do sal para o estado de referência

$m_{\text{sal}}^{\text{calc}}$  – molalidade do sal calculada

$M_P$  – massa molar da proteína

$n$  – número de mols

$N_A$  – número de Avogadro

$n_0$  – índice de refração do solvente

$P$  – pressão

$pI$  – ponto isoelétrico

RPB – recuperação e purificação de bioprodutos

$r$  – raio da proteína

$R$  – constante universal dos gases

$r_b$  – diâmetro da molécula

$R_\theta$  - limite de Rayleigh

$S$  – solubilidade

$S_{\text{exp}}$  – solubilidade experimental

$S_{\text{calculado}}$  – solubilidade calculada

SLS – espalhamento de luz estático

SIC – cromatografia de auto-interação

$T$  – temperatura

$V$  – volume

$V_0$  – volume de retenção da amostra em que não há interação com o suporte cromatográfico

---

$V_r$  – volume de retenção da amostra em que há interação com a proteína imobilizada no suporte cromatográfico

$V_w$  – volume molecular da água

$\overline{V_p^\infty}$  - volume parcial molar da proteína

$x$  – fração molar

$\omega$  – potencial de força média

$z$  – número de coordenadas das moléculas no cristal

$\beta$  – parâmetro da equação de Cohn

$\Phi$  – razão entre a área superficial total e o volume de retenção  $V_0$

$\gamma$  - coeficiente de atividade

$\lambda$  - comprimento de onda

$\mu$  – potencial químico

$\Pi$  – pressão osmótica

$\rho$  – densidade da proteína

$\rho_s$  – número de moléculas de proteínas imobilizadas por unidade de área

$\nu$  – volume molar



---

## 1. INTRODUÇÃO

Proteínas são importantes em terapias, diagnósticos e aplicações industriais, como por exemplo, a aplicação médica da insulina humana obtida através da tecnologia de DNA recombinante, a qual abriu novas perspectivas para a produção em larga escala de proteínas (RUDOLPH *et al.*, 1999). A produção de proteínas e, especialmente, as de uso farmacêutico é uma das atividades que mais cresce no ramo da biotecnologia. Todo o desenvolvimento do processo e a produção são tarefas complexas, principalmente devido à demanda por um produto que apresente elevada pureza. Assim, muitas etapas de recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) são necessárias para que a molécula desejada seja obtida com a pureza requerida. Dessa forma, a RPB frequentemente é referida como a etapa mais cara do processo de produção de uma proteína, podendo atingir até 80% do custo de produção (CLONIS, 2006; HUBBUCH E KULA, 2007).

A cristalização e a precipitação são importantes métodos de separação de moléculas em geral, com destaque para biomoléculas, tanto no laboratório quanto em indústrias, sendo assim, muito empregadas na RPB. A precipitação é bastante utilizada na separação de proteínas comerciais, com o principal objetivo de concentrar a molécula alvo além de apresentar vantagens como baixos custos de capital e operação. Já a cristalização, que apresenta essa mesma vantagem da precipitação, é capaz de produzir produtos com elevada pureza e pode ser considerada tanto como uma etapa de polimento quanto uma etapa de purificação (HARRISON *et al.*, 2003). Apesar de serem processos similares em que sólidos são obtidos a partir de uma solução, a cristalização e a precipitação são diferentes em alguns aspectos (Tabela 1.1). A precipitação, em geral, é um processo relativamente rápido de formação de fase sólida a partir de uma solução aquosa em que a nucleação (nascimento do cristal), o crescimento e outros processos como agregação ocorrem simultaneamente. Já a cristalização ocorre em duas etapas distintas: a primeira etapa é a nucleação ou o início da separação de fases, e a segunda etapa é o crescimento do cristal através da adição de moléculas de soluto na sua superfície. O produto obtido por um processo de precipitação é uma fase sólida amorfa, enquanto para a cristalização o sólido cristalino apresenta um arranjo tridimensional bem definido. Neste trabalho, os termos cristalização e precipitação serão usados

indistintamente para definir a formação de uma fase sólida a partir de uma solução, pois diferentes condições de processo (assim como uma mesma condição, dependendo de como ela é atingida) podem levar tanto à formação de cristais como a de precipitados. Normalmente, a formação de uma nova fase é conduzida pela adição de um agente de precipitação (por exemplo, sulfato de amônio) que seletivamente precipita algumas das proteínas da solução aquosa (PRAUSNITZ, 2003).

**Tabela 1.1** - Comparação entre a cristalização e a precipitação (modificado de HARRISON *et al.*, 2003).

<b>Descrição</b>	<b>Cristalização</b>	<b>Precipitação</b>
Solubilidade do produto	média a alta	média
Supersaturação relativa	baixa	alta
Morfologia do produto	definida	não definida
Tamanho do produto	grande	pequeno
Mecanismo de nucleação	secundário	primário
Taxa de nucleação	baixa	alta
Taxa de crescimento	ampla faixa	baixa
Controlabilidade	controlável	difícil

### 1.1 Colocação do problema e objetivo

O comportamento de fases de soluções é de especial importância em processos de separação em geral e não deixa de ser em bioprocessos. No entanto, o equilíbrio de fases de sistemas que contêm proteínas ainda não é bem compreendido devido ao processo de cristalização ser fortemente influenciado por inúmeros fatores, como barreiras cinéticas para atingir o “verdadeiro” equilíbrio, características multicomponentes das soluções, pH e força iônica, entre outros, e da falta de metodologias sistemáticas de seleção destes para a cristalização de macromoléculas, as condições ótimas são quase sempre determinadas por tentativa e erro (CURTIS *et al.*, 2001). Desse modo, entender o equilíbrio de fases e os fatores que o influenciam é essencial para o projeto e aperfeiçoamento de processos de separação de produtos bioquímicos.

A relação entre o parâmetro termodinâmico  $B_{22}$  (segundo coeficiente virial osmótico) e a cristalização de proteínas foi proposta por George e Wilson (1994) como uma ferramenta para a predição de condições em que ocorre formação de precipitados ou cristais, sendo esta correlação confirmada por alguns autores (BERGER *et al.*, 2005; TESSIER *et al.*, 2003; VELEV *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2010a). Assim, a determinação do valor de  $B_{22}$  e também do diagrama de fases podem reduzir o número de condições inicialmente testadas para cristalizar uma proteína.

Estão disponíveis na literatura dados de  $B_{22}$  apenas para pouquíssimos sistemas proteicos e, conseqüentemente, também há poucas informações sobre condições controladas específicas que permitam a montagem de diagramas de equilíbrio de fases de diferentes proteínas (ASHERIE, 2004). A análise conjunta dos diagramas de fase e dos valores de  $B_{22}$  pode tornar a seleção de condições ótimas uma tarefa mais simples e racional e, desta forma, aperfeiçoar os processos de separação com menor número de etapas de purificação, aumento da pureza do produto desejado e redução de custo do processo.

Este trabalho teve como objetivo a determinação experimental de diagramas de fases de proteínas que relacionam a concentração da biomolécula e a concentração do agente precipitante, de modo a se identificar nesses diagramas, através da análise dos valores do  $B_{22}$ , as condições nas quais ocorre a formação de precipitado amorfo, cristalino ou outras fases (por exemplo, fase líquida). Os diagramas de fases para as proteínas selecionadas para este estudo (insulina suína, insulina bovina e lisozima de clara de ovo de galinha) foram determinados para duas temperaturas (15 e 25 °C). O uso do sal volátil carbamato de amônio como agente de “salting-out” se apresenta como uma alternativa ao uso de sais convencionais. Como ainda não há relatos na literatura sobre a cristalização de proteínas com carbamato de amônio, sobre a determinação de  $B_{22}$  para proteínas em sistemas contendo este sal volátil e sobre a determinação de  $B_{22}$  para as insulinas suína e bovina, este trabalho tem ineditismo em todos estes três pontos. Variações de pH com o sal carbamato, importante parâmetro na cristalização, não foram investigadas por se tratar de um sal volátil em cujas soluções a adição de ácidos ou bases para a mudança de pH altera as reações de equilíbrio envolvidas na formação do sal volátil e, conseqüentemente, a sua concentração.

As três proteínas escolhidas são largamente utilizadas como proteínas modelo em estudos de cristalização por métodos convencionais, além de serem bem caracterizadas em termos bioquímicos (massa molecular, estrutura tridimensional, ponto isoelétrico, atividade biológica, etc.).

## 1.2 Plano de trabalho desenvolvido

O plano de trabalho teve (Figura 1.1) as seguintes etapas programadas e realizadas:

### 1) Determinação de diagramas de fases das proteínas

Neste trabalho, a solubilidade e o limite de supersaturação foram determinados para três proteínas (lisozima, insulina suína e bovina) a 15 e 25°C para a construção do diagrama de fases. Este resultado é uma importante contribuição na área de cristalização, pois diagramas de fases completos não são comuns na literatura, além de não se encontrar dados sobre o uso de carbamato de amônio como agente de cristalização de proteínas.

### 2) Determinação experimental do $B_{22}$

Existem diferentes métodos para medição do  $B_{22}$  e, assim, foi preciso analisar e selecionar o melhor método para os sistemas estudados. As técnicas de osmometria de membrana, espalhamento de luz e cromatografia de auto-interação foram empregadas para medir o valor de  $B_{22}$ . Não foram encontrados na literatura dados de  $B_{22}$  para as proteínas lisozima, insulinas suína e bovina em soluções aquosas de carbamato de amônio.

### 3) Determinação teórica (termodinâmica) do $B_{22}$

Para algumas condições não é possível medir o  $B_{22}$ . Desse modo, foram utilizados modelos termodinâmicos disponíveis na literatura para predição dos valores do segundo coeficiente virial osmótico.

### 4) Cristalização/precipitação com o sal volátil

A precipitação de proteínas com carbamato de amônio já foi estudada neste Laboratório de pesquisa (LIMA, 2006; WATANABE *et al.*, 2006; WATANABE *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010). No entanto, a cristalização de proteínas com esse sal ainda não foi relatada na literatura. Os experimentos aqui relatados mostraram que foi possível a obtenção de cristais com carbamato de amônio. Os ensaios foram realizados em duas temperaturas (15 e 25°C) para as proteínas estudadas e utilizados para verificar a “janela de cristalização” estabelecida por George e Wilson (1994).

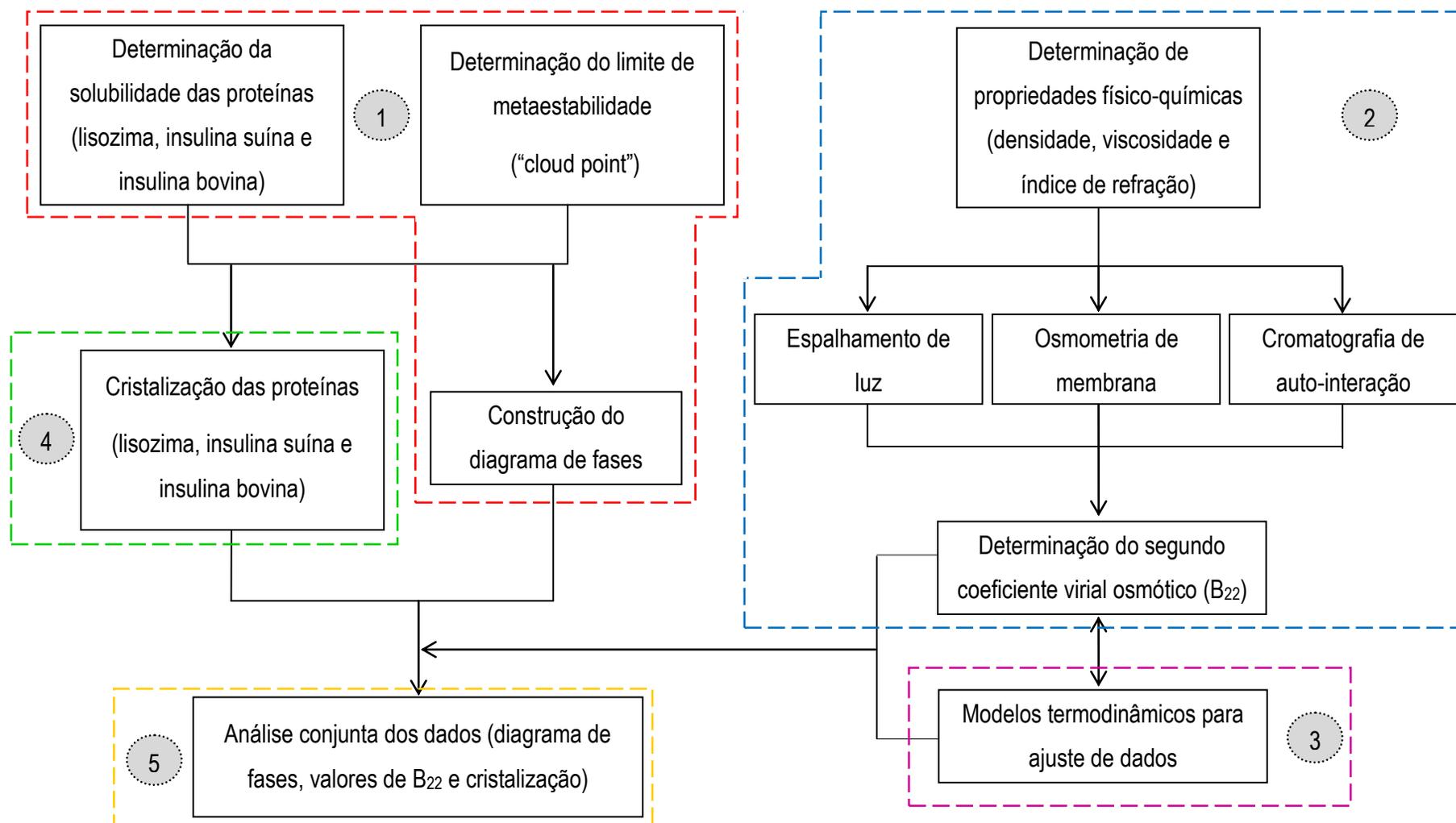


Figura 1.1 – Fluxograma representativo do plano de trabalho (etapas numeradas na ordem de execução das atividades).

**5) Relação entre o  $B_{22}$  e as condições de cristalização**

Fez-se uma análise conjunta dos dados obtidos nas etapas anteriores para revisar as condições estabelecidas por George e Wilson (1994) para a ocorrência de cristalização no sal volátil carbamato de amônio. Embora haja um arcabouço teórico relacionando as medidas de  $B_{22}$  com as condições de cristalização, cumpre observar que essa relação foi muito pouco investigada experimentalmente.

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cristalização em processos de recuperação e purificação de proteínas

Atualmente, a tecnologia de RPB depende muito ainda de métodos cromatográficos, devido ao seu alto poder de resolução, mas que, apesar de bastante eficientes, possuem a desvantagem do alto custo dos meios de adsorção que podem chegar a até dez mil dólares por litro de resina. A cristalização de macromoléculas biológicas utilizada já há décadas para obter cristais de alta qualidade, na maioria das vezes para determinação da estrutura tridimensional da proteína, vem sendo reconhecida também como um método de purificação de proteína (ZANG *et al.*, 2011). Proteínas na forma cristalina apresentam vantagens em relação à estabilidade do produto, pureza, reprodutibilidade em termos de propriedades terapêuticas e físico-químicas, além de ser a cristalização uma operação unitária de custo menor quando comparada a técnicas cromatográficas convencionais (HEBEL *et al.*, 2013; SMEJKAL *et al.*, 2013a). O cristal é a proteína na sua forma mais concentrada (SHENOY *et al.*, 2001).

A cristalização é uma técnica de separação e purificação largamente utilizada na produção de produtos químicos, farmacêuticos e alimentícios. A maioria dos produtos sólidos é obtida por processos de cristalização/precipitação, sendo a segunda mais importante tecnologia de separação em termos de capacidade, perdendo apenas para processos de destilação (VAN ROSMALEN *et al.*, 2004). O uso da cristalização como um processo de purificação de proteínas tem sido estudado, pois para alguns bioprodutos, como os antibióticos que requerem altas dosagens, a sua forma final deve ser cristalina e, para o caso de polimorfos, uma forma cristalina específica deve ser obtida dependendo da sua aplicação. Um importante exemplo é a produção de insulina, para a qual a cristalização é a principal operação unitária envolvida no final do seu processo de RPB (HARRISON *et al.*, 2003). Judge *et al.* (1995) relataram a cristalização de ovalbumina para verificar a viabilidade da cristalização como processo de recuperação e purificação de proteínas e demonstraram que essa macromolécula pode ser obtida com um grau de pureza maior que 99% a partir de uma solução contendo contaminantes (lisozima e conalbumina). Outro exemplo de aplicação da cristalização, ainda em desenvolvimento, são os anticorpos monoclonais (mAbs) que são amplamente utilizados em aplicações clínicas, sistemas de diagnósticos e diferentes campos de pesquisa.

A cristalização do anticorpo monoclonal terapêutico IgG1 foi estudada por Smejkal *et al.* (2013b) e uma pureza de 98,5% foi atingida após um único passo de recristalização. A atividade biológica desse anticorpo foi mantida e, assim, mostrou-se novamente que o processo de cristalização tem um forte potencial em substituição à cromatografia para purificação de mAbs, apesar da cristalização desses anticorpos ser mais complexas devido à heterogeneidade, flexibilidade conformacional e outros fatores (LIU *et al.*, 2010b; CAPITO *et al.*, 2013).

A cristalização e a precipitação geralmente são usadas em etapas distintas na recuperação e purificação de proteínas, podendo ser manipuladas pela mudança das propriedades da solução (tais como pH, temperatura e concentrações de proteínas e agentes precipitantes) para induzir a separação de fases. A formação da fase sólida ocorre quando a concentração da proteína excede seu limite de solubilidade, podendo a fase sólida ser cristalina ou um precipitado amorfo (SCHWARTZ e MYERSON, 2002). Essas operações são altamente interessantes para proteínas que geralmente são produzidas ou extraídas com baixas concentrações, pois promovem a concentração do produto, além de propiciarem um aumento de pureza.

Dentre os métodos de separação de proteínas por precipitação ou cristalização destacam-se o uso de solventes orgânicos, a precipitação isoeletrica e o “salting-out”. Dentre os solventes orgânicos, etanol, éter e acetona, o mais utilizado na indústria é o etanol. Os solventes orgânicos reduzem a atividade da água e o seu poder de solvatação por uma molécula de proteína hidrofílica e carregada. Como consequência, ocorre a diminuição da solubilidade e precipitação da biomolécula (SCOPES, 1988).

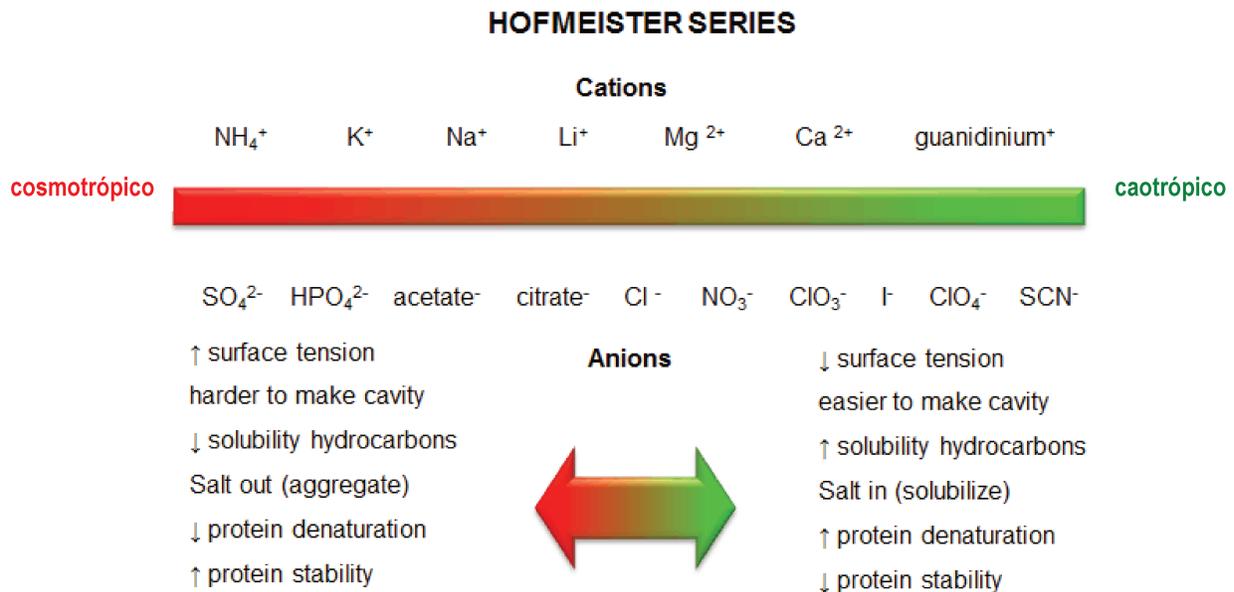
A precipitação isoeletrica é uma técnica de precipitação bastante empregada na indústria, principalmente nas etapas iniciais de RPB para isolar e concentrar a proteína. Ela se baseia no ajuste do pH da solução ao ponto isoeletrico (pI) da proteína. Uma vez que, as proteínas são constituídas de aminoácidos que possuem cadeias laterais de caráter ácido ou básico, dependendo do pH do meio, elas podem apresentar carga líquida negativa ou positiva. No pI, a carga global média da molécula é nula e a repulsão eletrostática é minimizada, resultando na precipitação. Na indústria alimentícia, caseína e proteína de soja são isoladas em grandes quantidades por precipitação isoeletrica a valores de pH de 4,5 - 4,8 utilizando-se ácidos minerais tais como ácido clorídrico ou sulfúrico. Algumas desvantagens desse método são os volumes de resíduos gerados que precisam ser neutralizados antes do seu descarte e a formação de extremos locais de pH que podem causar a desnaturação da proteína (SALT *et al.*, 1982; HOFLAND *et al.*, 1999; KORSHID *et al.*, 2007). Algumas alternativas para solucionar esse problema vêm sendo

exploradas, como por exemplo, o uso de eletrólitos voláteis, sendo estes facilmente removidos da solução através da manipulação da pressão ou temperatura. Jordan *et al.* (1987) e Hofland *et al.* (1999) relataram a precipitação de caseína pela dissolução de CO<sub>2</sub> sob pressão no leite. Thiering *et al.* (2001) também utilizaram o dióxido de carbono para precipitar proteínas da soja (glicina e  $\beta$ -conglucina). Tashima *et al.* (2009) estudaram a precipitação de insulina suína utilizando CO<sub>2</sub> e concluíram que essa proteína pode ser precipitada sem perda de sua atividade biológica. Hirata *et al.* (2010) cristalizaram a insulina suína na presença de zinco com CO<sub>2</sub> e obtiveram cristais romboédricos, forma comum para a insulina suína-zíncica em valores de pH em torno de 6,0.

O “salting-out” é considerado um dos mais simples e importantes métodos de precipitação de proteínas. Nesse método, a diminuição da solubilidade causada pela adição do sal provoca a formação de uma fase sólida. O mecanismo comumente considerado envolve a competição entre os íons salinos e os grupos polares da proteína pelas moléculas de água que leva a uma maior interação proteína-proteína por interações hidrofóbicas que se tornam mais relevantes e provocam a formação de precipitados (SCOPES, 1988). Uma consideração importante no processo de “salting-out” é o tipo de sal utilizado. Sua capacidade em precipitar proteína é proporcional ao quadrado da valência das espécies iônicas que compõem o sal, logo, íons divalentes são mais eficientes (MCPHERSON, 1999). Em 1880, Hofmeister foi o primeiro a demonstrar que sais com diferentes ânions e o mesmo cátion têm capacidades diferenciadas em estabilizar uma solução de proteína. Dependendo do tipo de sal, diferentes concentrações são necessárias para precipitar uma determinada concentração de proteína. Os sais foram então ordenados de acordo com sua efetividade em precipitar proteínas, sendo esta série conhecida como série liotrópica ou série de Hofmeister (Figura 2.1). A partir do trabalho de Hofmeister, diferentes estudos foram realizados para investigar uma explicação para a teoria que ainda permanece pouco compreendida (BOSTRÖM *et al.*, 2005).

As espécies na Figura 2.1 à esquerda do ânion Cl<sup>-</sup> são conhecidas como cosmotrópicos, enquanto à direita os íons são chamados de caotrópicos. Os cosmotrópicos são altamente hidratados interagindo fortemente com as moléculas de água, têm elevada densidade de carga, as moléculas de água ao redor dos íons salinos são mais estruturadas, aumentam a tensão superficial a nível macroscópico, estabilizam e precipitam a macromolécula. Já os caotrópicos têm uma fraca interação com a água, menor densidade de carga, aumentam a mobilidade das moléculas de água, adsorvem preferencialmente em superfícies não

polares, desestabilizam a proteína e favorecem o aumento da sua solubilidade (CURTIS *et al.*, 2002; RETAILLEAU *et al.*, 2002; ZHANG e CREMER, 2006).

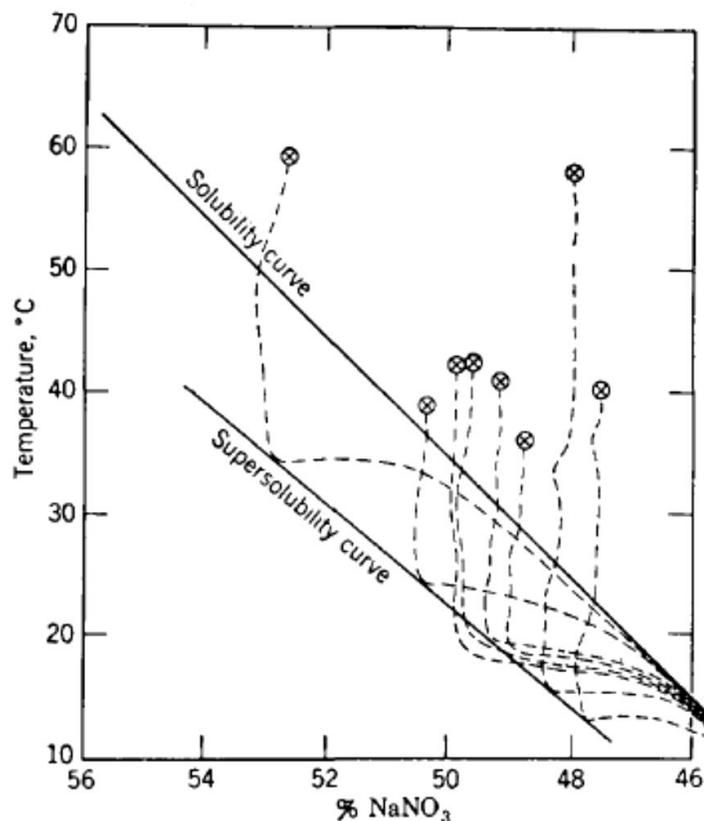


**Figura 2.1** – Série de Hofmeister (Zhang e Cremer, 2006).

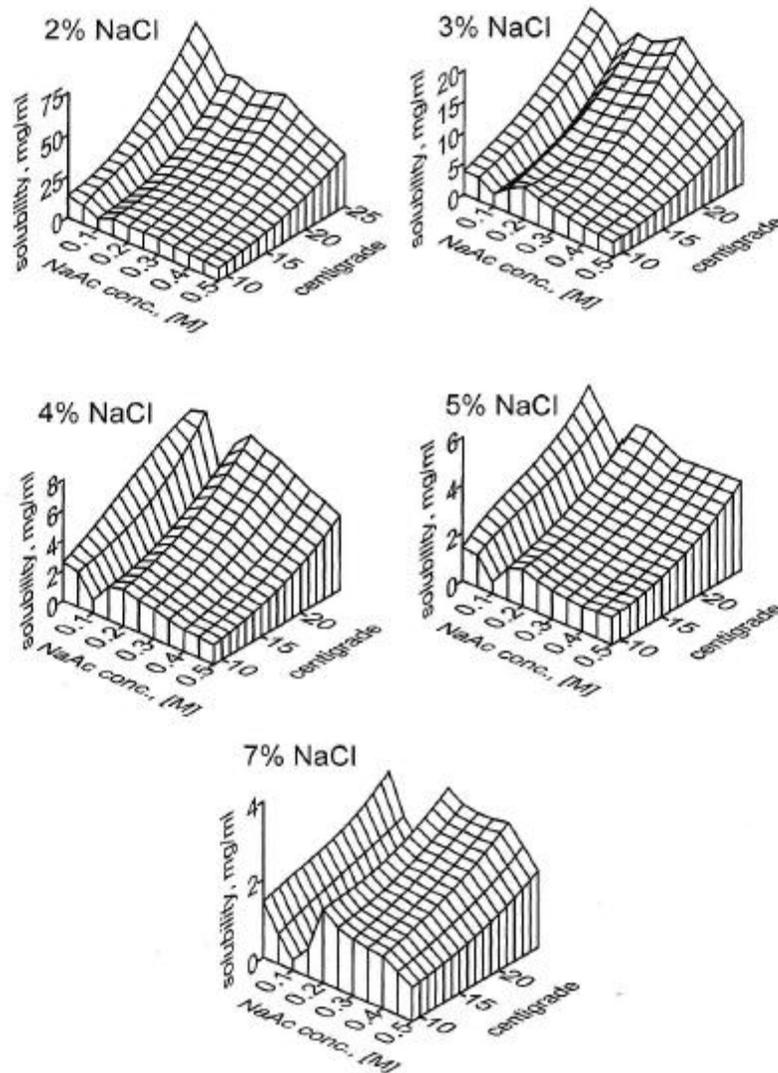
O sal geralmente utilizado na precipitação por “salting-out” é o sulfato de amônio, pois possui alta solubilidade em água, o que torna possível o seu uso em uma ampla faixa de concentração. Outras vantagens na sua aplicação são o baixo custo e a possibilidade de prevenir ou limitar o crescimento bacteriano na solução (MORETTI *et al.*, 2000; ESPITALIER *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2009; CHENG *et al.*, 2006). O cloreto de sódio também é um sal frequentemente utilizado, principalmente no caso de proteínas de uso farmacêutico. No entanto, o descarte dos efluentes salinos gerados é um inconveniente ambiental. No caso do sulfato de amônio, a concentração limitrofe permitida de descarte é de 200 mg/L de amônio. Maiores concentrações numa corrente de águas residuais devem ser reduzidas antes do tratamento, mas esta operação resultaria num custo de € 6/kg de nitrogênio removido (BONTURI *et al.*, 2013). Uma alternativa aos sais tradicionais é o sal volátil carbamato de amônio, que será descrito em detalhes mais à frente.

## 2.2 Diagrama de fases para soluções aquosas de proteínas

Uma das mais importantes informações para se determinar condições apropriadas ao crescimento de cristais são os dados de solubilidade. Com o estudo de Miers e Isaac (1907) foi introduzida a relação entre solubilidade e supersaturação (Figura 2.2) para a cristalização de um sistema químico simples. Por causa de vários parâmetros físicos e químicos influenciarem a solubilidade, o diagrama de fases para uma proteína ou ácido nucleico pode ser multidimensional e bastante complexo. Esses dados para proteínas eram pouco comuns e tornaram-se disponíveis a partir de trabalhos como o de Howard *et al.* (1988), que determinaram a solubilidade e a relação de fases para a lisozima, e de Cacioppo e Pusey (1991), que obtiveram um diagrama de fases completo para uma única proteína a lisozima de clara de ovo de galinha (Figura 2.3).



**Figura 2.2** – Curva de resfriamento para o NaNO<sub>3</sub> e a formação de uma região metaestável obtida por Miers e Isaac (1907) (FEIGELSON, 1988).



**Figura 2.3** – Diagrama de fases completo para a lisozima obtido por Cacioppo e Pusey (1991) (MCPHERSON, 1999).

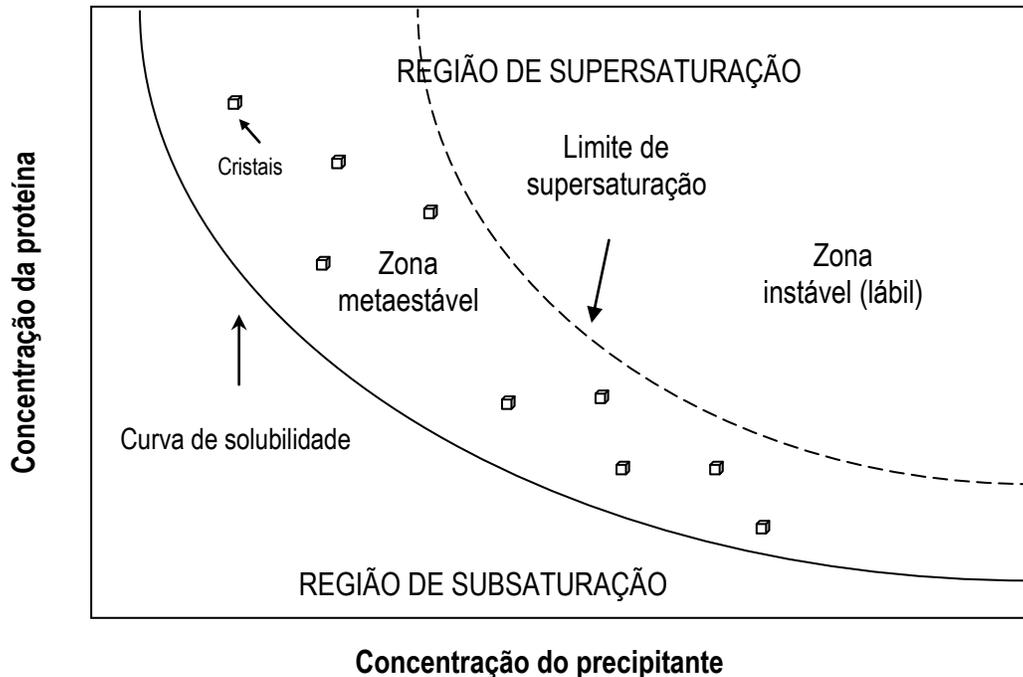
Compreender o comportamento da solubilidade da proteína não é apenas importante para definir a região do diagrama de fases em que a cristalização pode ocorrer, mas também o parâmetro crucial para caracterizar as condições de supersaturação (ANNUNZIATA *et al.*, 2008). A cristalização é um processo de mudança de estado que ocorre em duas etapas sequenciais: nucleação e crescimento. Um cristal de proteína quando colocado em uma solução livre de proteína irá se dissolver até a concentração do soluto na fase líquida atingir um valor específico. Nessa condição, diz-se que o sistema está em equilíbrio e a concentração é representada pela solubilidade. Os cristais se formam a partir de uma solução quando o

limite de solubilidade é excedido, ou seja, através de uma solução supersaturada. A supersaturação é normalmente expressa como razão e pode ser definida como  $c/c_s$  ou  $(c-c_s)/c_s$ , sendo  $c$  a concentração do soluto e  $c_s$  a concentração no equilíbrio ou solubilidade. Soluções supersaturadas são termodinamicamente metaestáveis. O equilíbrio desse sistema é reestabelecido através da precipitação e, conseqüentemente, do crescimento do cristal, mas o grau de supersaturação de uma solução para a formação de núcleos e para o crescimento de cristais é diferente. A nucleação é a primeira etapa para o crescimento de cristais, logo a supersaturação requerida para que a nucleação ocorra é maior que a supersaturação necessária para o crescimento de cristais. Porém, uma nucleação excessiva leva à formação de pequenas partículas e em grandes quantidades, o que torna o processo de separação mais difícil. Assim, controlar as etapas do processo de cristalização tem estimulado pesquisas, e uma importante ferramenta para contornar problemas associados à produção de cristais de proteínas é o diagrama de fases (WEBER, 1991; SARIDAKIS e CHAYEN, 2003; ASHERIE, 2004).

O diagrama de fases normalmente é referido como um mapa que de maneira resumida representa o estado do material (sólido cristalino ou amorfo e líquido ou gel, por exemplo) como função das condições ambientes (por exemplo, temperatura e concentração). O diagrama é referido como uma ferramenta indispensável no estudo do equilíbrio e da transformação de fases, entre outros fenômenos, para melhorar a qualidade e o desenvolvimento de novos produtos e processos (ULRICH E BÜLAU, 2002; ASHERIE, 2004). As principais variáveis utilizadas em diagramas de fases para a cristalização de proteínas são a concentração da proteína, temperatura, pH e força iônica do solvente.

O diagrama de fases relacionado às condições de cristalização tem como principal característica a curva de solubilidade, que define o limite entre duas regiões fundamentais: subsaturada e supersaturada. A região supersaturada é subdividida nas zonas metaestável e instável ou lábil (Figura 2.4). Na região subsaturada não há formação de cristal e a molécula permanece dissolvida na solução. Na zona metaestável a solução se encontra supersaturada, porém, apenas o crescimento de partículas é favorecido e nenhum núcleo é gerado. Acima do limite de supersaturação, a solução é dita ser instável e a separação de fase pode ocorrer, pois o grau de supersaturação é alto suficiente para induzir a nucleação e, conseqüentemente, o crescimento de cristais (MYERSON, 2002; TALREJA *et al.*, 2010). No entanto, a nucleação é um processo que precisa ultrapassar a barreira energética necessária para a formação de uma nova fase e, às vezes, a supersaturação pode não ser suficiente para que essa barreira seja superada (SARIDAKIS *et al.*, 1994; MIKOL e GIEGÉ, 1992). Assim, algumas técnicas podem ser utilizadas para que

essa barreira energética seja rompida, como por exemplo, uso de “sementes” de cristais e ação mecânica (agitação, ultrassom, etc.).

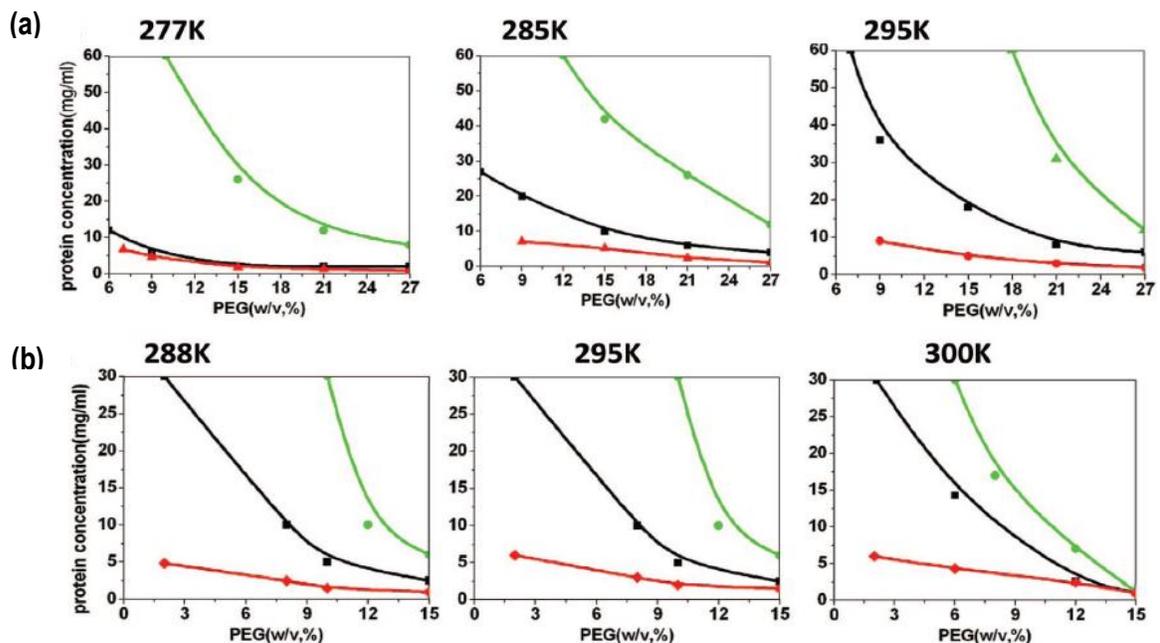


**Figura 2.4** - Diagrama de fases esquemático para a cristalização de proteína e a representação das diferentes regiões e zonas do processo de separação.

Os diagramas de fases de diferentes proteínas em diferentes condições são, em geral, quantitativamente muito distintos (CURTIS e LUE, 2006). Exemplos de vários desses diagramas para proteínas podem ser vistos no trabalho de Lin *et al.* (2008), que realizaram um estudo mostrando a modificação dos diagramas para dez diferentes proteínas em função da temperatura (Figura 2.5). A mudança da temperatura (até mesmo para uma pequena variação de 5°C) influencia o comportamento de precipitação da proteína variando as larguras das zonas metaestável da curva de solubilidade. Esses autores verificaram que a mobilidade das zonas é diferente para cada proteína.

Como o diagrama de fases é a relação básica entre as fases sólida e líquida em solução ele é visto como a base para otimizar processos de separação, fornecendo informações importantes sobre quais métodos são mais adequados para se levar uma solução ao estado supersaturado. Assim, estudar a cristalização e determinar o diagrama de fases correspondente são essenciais para controlar a nucleação,

o crescimento, a fase, a qualidade e o tamanho dos cristais. Por causa do envolvimento de muitas variáveis (por exemplo, pH, força iônica e temperatura) e pela falta de métodos sistemáticos para a determinação de condições ótimas para a cristalização de proteínas em diferentes sistemas, surge a necessidade de se desenvolverem métodos que permitam encontrar condições para cristalizar a proteína de maneira racional, rápida e, conseqüentemente, reduzir o custo e a quantidade de experimentos a serem realizados (ATAKA, 1993; AHAMED *et al.*, 2005; ASHERIE, 2008).



**Figura 2.5** – Diagramas de fases bidimensionais (concentração da proteína em função da concentração do precipitante) para: lisozima (a) e catalase (b) em diferentes temperaturas. Curvas de: solubilidade (—), nucleação (—) e precipitação (—) (LIN *et al.*, 2008).

De acordo com George e Wilson (1994), o parâmetro termodinâmico segundo coeficiente virial osmótico  $B_{22}$  pode ser relacionado à cristalização de proteínas na predição de condições em que ocorre a formação de precipitados ou cristais e o acoplamento desse parâmetro ao conjunto de informações utilizadas no desenvolvimento do processo de cristalização pode reduzir o número de condições inicialmente testadas para cristalizar uma proteína.

### 2.3 Segundo coeficiente virial osmótico ( $B_{22}$ ), a proposta de George e Wilson (1994) e métodos de medidas

McMillan e Mayer (1945) formalizaram a analogia entre o comportamento de um soluto interagindo em um solvente e moléculas em fase gasosa que interagem no vácuo. Assim, os mesmos conceitos empregados no estudo de gases não ideais puderam ser aplicados para sólidos em líquidos. Consequentemente, o comportamento de fluidos reais pode ser utilizado para descrever o comportamento de proteínas em solução e, similarmente, as propriedades termodinâmicas de fluidos podem ser relacionadas às propriedades da solução (CURTIS e LUE, 2006). Como resultado, McMillan e Mayer (1945) derivaram a expansão em série que expressa a pressão osmótica ( $\Pi$ ) em termos de concentração ( $c_p$ ):

$$\frac{\Pi}{c_p RT} = \frac{1}{M_p} + B_{22} c_p + C_{222} c_p^2 + \dots \quad (2.1)$$

em que  $M_p$  é a massa molar da proteína,  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura e  $B_{22}$  é o segundo coeficiente virial. Termos de ordem superior são desprezíveis, e mesmo o terceiro coeficiente ( $C_{222}$ ) é difícil de ser determinado com suficiente precisão, sendo pouco importante no contexto deste trabalho. O parâmetro  $B_{22}$  é um parâmetro termodinâmico que reflete o desvio da idealidade de soluções, resultado da interação entre dois ou mais corpos (maiores detalhes no APÊNDICE 1).

Zimm (1946) estendeu as equações de potencial termodinâmico dos solventes em soluções de moléculas orgânicas a soluções de grandes moléculas. O segundo termo ( $B_{22}$ ) na expansão da pressão osmótica em termos de concentração foi analisado, pois esse coeficiente tem um significado molecular simples e é suficiente para descrever os desvios da idealidade de sistemas em concentrações diluídas. Esse estudo foi utilizado para melhor compreender os dados termodinâmicos obtidos a partir de soluções de proteínas. A propriedade termodinâmica analisada por Zimm (1946) foi o parâmetro  $B_{22}$  a partir da relação entre a concentração da proteína e a pressão osmótica (NEAL *et al.*, 1998; LE BRUN *et al.*, 2009). Analisando a expansão em série para pressão osmótica, generalizada por McMillan e Mayer (1945), ele observou a correspondência formal entre a Equação 2.1 e a equação de estado de um gás imperfeito. O primeiro termo da série descreve a situação em que as moléculas não interagem umas com as outras (resultando na equação de van't Hoff para pressão osmótica, análoga à lei dos gases ideais) enquanto os termos de ordem maior retificam as interações entre duas ou mais moléculas.

O segundo coeficiente virial osmótico  $B_{22}$  é uma medida direta do potencial de força média (medida da interação intermolecular de moléculas de soluto em uma solução líquida) e um grande valor negativo indica uma forte interação proteína-proteína. A relação do potencial molecular entre as moléculas de proteína e suas propriedades termodinâmicas é complexa devido à ocorrência de uma variedade de interações. Assim, de forma simplificada, o parâmetro  $B_{22}$  é normalmente usado para caracterizar o potencial intermolecular (MOLLERUP e BREIL, 2009) relacionado por meio da equação:

$$B_{22} = \frac{2\pi N_A}{M_p^2} \int_{r_b}^{\infty} (e^{-\omega(r)/kT} - 1) r^2 dr \quad (2.2)$$

em que  $\omega(r)$  é o potencial de interação entre moléculas proteicas no meio em questão, função da distância centro-a-centro  $r$  (e  $r_b$  é o diâmetro da molécula),  $N_A$  é o número de Avogadro e  $k$ , a constante de Boltzmann.

George e Wilson (1994) foram os primeiros a observar que o segundo coeficiente virial osmótico está relacionado à cristalização de proteínas a partir de soluções aquosas. Esses autores determinaram valores de  $B_{22}$  a partir de espalhamento de luz (SLS) para diferentes sistemas proteína/solvente em condições que favorecem a cristalização dessas macromoléculas. A Figura 2.6 apresenta as condições de cristalização e os valores de  $B_{22}$  obtidos para cada sistema. A partir desse estudo, eles determinaram a correlação entre o parâmetro  $B_{22}$  e a cristalização de proteína, pois os valores de  $B_{22}$  para todas as condições testadas ficaram em uma estreita faixa,  $-1 \times 10^{-4}$  a  $-8 \times 10^{-4}$  mol. mL/g<sup>2</sup>, faixa esta denominada de “janela de cristalização”. Do ponto de vista termodinâmico, valores positivos de  $B_{22}$  geralmente indicam forças repulsivas entre moléculas de proteína, sendo a interação solvente-proteína dominante sobre a interação proteína-proteína. Neste caso, o solvente é conhecido como “bom solvente”. Já para valores negativos, as interações atrativas entre as moléculas de proteínas são mais fortes e o solvente é dito ser um “mau solvente”. Para o valor de  $B_{22}$  igual a zero tem-se o comportamento ideal (solvente teta).

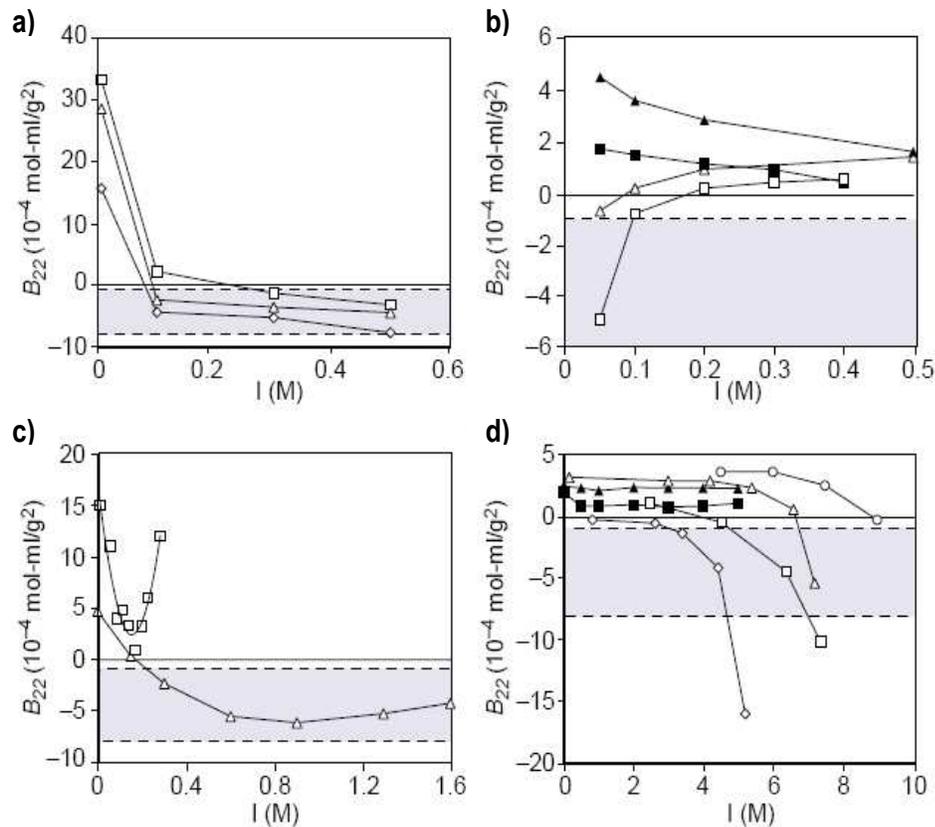
Assim, além da solubilidade, o  $B_{22}$  também é um parâmetro importante para o crescimento de cristais (HAAS *et al.*, 1999; BAJAJ *et al.*, 2004). Tessier e Lenhoff (2003) discutem a relação entre os valores de  $B_{22}$  e as condições da solução (pH e força iônica) que podem levar à cristalização de algumas moléculas, como por exemplo, lisozima, ribonuclease A, albumina, etc. De acordo com esses autores, existem quatro diferentes padrões de interação proteína-proteína em função da força iônica e do tipo de sal. O primeiro padrão mostra que as interações são repulsivas em baixa força iônica e atrativas em alta

Protein	$E_{280}^{1\%}$	Crystallization conditions	$B_{22} \times 10^4$ (mol ml g <sup>-2</sup> )	References
Lysozyme	26.3	40 mM NaAc, pH = 4.6, 2% NaCl, 298 K	-3.0	Mikol <i>et al.</i> (1990)
Canavalin	6.8	50 mM Phosphate, pH = 7.0, 0.7% NaCl, 298 K	-0.8	McPherson (1982)
Concanavalin A	13.0	50 mM Tris-Ac, pH = 7.0, 1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 298 K	-2.5	Mikol <i>et al.</i> (1990)
Concanavalin A	13.0	10 mM Sodium cacodylate, pH = 6.0, 0.1 M NaCl, 298 K	-1.9	Mikol <i>et al.</i> (1990)
BSA	6.6	50 mM Potassium phosphate, pH = 6.2, 52% saturated (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 298 K	-2.0	Carter (1992)
Ovostatin	7.98	0.1 M Imidazole, pH = 7.5, 7.5% PEG 8000, 293 K	-7.1	Pusey (1992)
Ribonuclease A	22.0	50% <i>n</i> -Propanol, pH = 5.0, 297 K	-4.1	King <i>et al.</i> (1956)
$\alpha$ -Chymotrypsin	20.0	0.1 M NaAc, pH = 4.6, 10% PEG 3350, 298 K	-8.4	Gaier <i>et al.</i> (1981)
STMV		12.5% SAS, pH = 6.5, 298 K	-1.8	Malkin & McPherson (1993a)
Ovalbumin	26.9	50 mM Sodium cacodylate, pH = 5.4, 43% SAS, 2% methanol	-6.1	Miller <i>et al.</i> (1983)

**Figura 2.6** – Condições de cristalização de literatura utilizadas por George e Wilson (1994) e os valores de  $B_{22}$  determinados por eles através de SLS.

força iônica para uma ampla faixa de pH (Figura 2.7a). O segundo padrão de comportamento é observado para algumas proteínas básicas em cloreto de sódio em que para baixa força iônica as interações proteína-proteína são repulsivas em baixo pH e longe do pI e atrativas para valores de pH maiores (Figura 2.7b). Outro comportamento é caracterizado por um mínimo no valor de  $B_{22}$  para força iônica moderada a alta sendo este tipo de comportamento de interação entre proteínas atribuído a presença de cátions divalentes (Figura 2.7c). O último tipo de interação proteína-proteína foi verificado para proteínas ácidas em cloreto de sódio em que não há mudança no valor de  $B_{22}$  mesmo próximo ao limite de solubilidade do eletrólito (Figura 2.7d). Um número significativo de resíduos ácidos hidratados pode explicar parcialmente baixa afinidade de auto-associação dessas proteínas.

Os coeficientes viriais são determinados a partir do potencial químico (como coeficientes de uma série de potências positivas da concentração de proteínas), e este potencial químico de moléculas de proteínas em um dado solvente é usualmente medido por pressão osmótica, espalhamento de luz ou, mais recentemente, por tempos de retenção obtidos por métodos cromatográficos (BAJAJ *et al.*, 2004; AHAMED *et al.*, 2005; RUCKENSTEIN e SHULGIN, 2006). A seguir, os métodos de determinação do parâmetro  $B_{22}$  são descritos.



**Figura 2.7** – Exemplos de medidas do segundo coeficiente virial osmótico ( $B_{22}$ ) em função da força iônica ( $I$ ) para diferentes proteínas na presença de diferentes eletrólitos em valores de pH distintos: **(a)** lisozima a pH 4,5 ( $\square$ ), pH 6,0 ( $\triangle$ ) e pH 9,0 ( $\diamond$ ) em solução de cloreto de sódio; **(b)** ribonuclease A a pH 3,0 ( $\blacktriangle$ ), pH 6,5 ( $\triangle$ ) e  $\alpha$ -quimotripsinogênio a pH 3,0 ( $\blacksquare$ ) e pH 6,8 ( $\square$ ) em solução de cloreto de sódio; **(c)** ferritina a pH 5,0 ( $\square$ ) em solução de acetato de sódio e lisozima a pH 7,8 ( $\triangle$ ) em solução de brometo de magnésio, **(d)** mioglobina a pH 6,0 ( $\triangle$ ), ovalbumina a pH 6,0 ( $\diamond$ ), albumina de soro bovino a pH 6,2 ( $\square$ ) e malato desidrogenase a pH 8,0 ( $\circ$ ) em solução de sulfato de amônio e mioglobina a pH 7,4 ( $\blacktriangle$ ) e albumina de soro bovino a pH 7,0 ( $\blacksquare$ ) em solução de cloreto de sódio. A região sombreada corresponde ao intervalo definido por George e Wilson (1994) como a “janela de cristalização” onde ocorre a cristalização. (Adaptado de Tessier e Lenhoff, 2003).

### 2.3.1 Osmometria de membranas

Na osmometria, o  $B_{22}$  pode ser obtido a partir de medidas de pressão osmótica  $\Pi$  de soluções. A pressão osmótica é definida como a pressão que deve ser aplicada a uma solução para que o potencial químico do solvente na solução se iguale ao potencial químico do solvente puro. A Equação 2.3 é conhecida como equação de van't Hoff para a pressão osmótica, semelhante à equação de estado para gás ideal, válida para soluções infinitamente diluídas e incompressíveis:

$$\Pi = RTc_p \quad (2.3)$$

onde  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura e  $c_p$  é a concentração da proteína em massa por volume.

No entanto, uma expressão frequentemente utilizada para soluções não ideais, com concentrações finitas de soluto (e que corresponde à situação encontrada em processos de *downstream*, para as quais a Equação 2.3 não é válida), é a Equação 2.1 desenvolvida por McMillan-Mayer (1945):

$$\frac{\Pi}{c_p} = RT \left( \frac{1}{M_p} + B_{22}c_p + C_{222}c_p^2 + \dots \right) \quad (2.1)$$

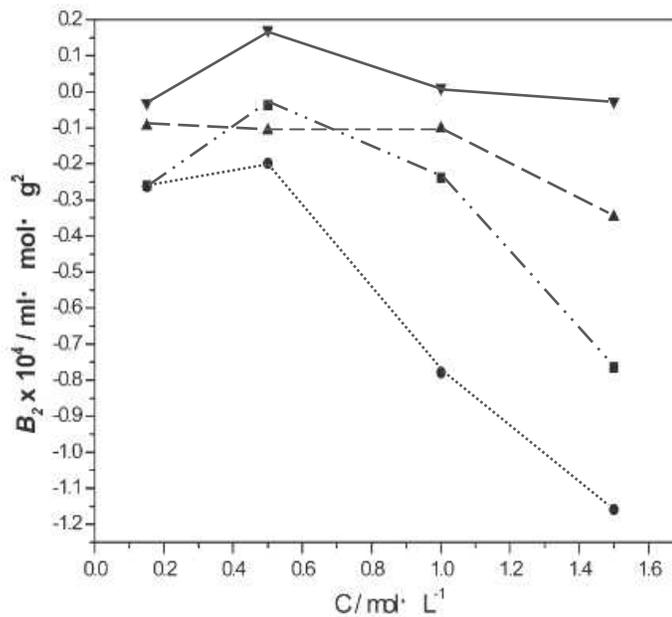
Uma relação linear de  $\Pi/(RTc_p)$  versus  $c_p$  (para baixos valores de  $c_p$ ) fornece como coeficiente linear o termo  $1/M_p$  e como coeficiente angular o valor de  $B_{22}$  (LEVINE, 2009; AHAMED *et al.*, 2005). A Equação (2.1) pode ser reescrita de modo a fornecer a maneira como o  $B_{22}$  é obtido e calculado a partir de dados experimentais de pressão osmótica:

$$B_{22} = \lim_{\rho \rightarrow 0} \rho^{-1} \left( \frac{\Pi}{\rho RT} - 1 \right) \quad (2.4)$$

em que  $\rho$  é a concentração em mol por volume.

As interações entre proteínas em soluções aquosas foram medidas por vários autores através da osmometria de membrana. Lu *et al.* (2009) mediram a pressão osmótica de albumina de soro bovino (BSA)

em soluções aquosas de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em diferentes concentrações e valores de pH. A Figura 2.8 mostra o efeito da concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no segundo coeficiente virial osmótico a  $25^\circ\text{C}$  obtido nos estudos destes autores. Para valores de pH próximo ao ponto isoelétrico da BSA (pI 4,8) e aumentando-se a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , observou-se condições adequadas à cristalização dessa proteína em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



**Figura 2.8** – Efeito da concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no segundo coeficiente virial osmótico ( $B_2$ ) para a BSA em diferentes valores de pH a  $25^\circ\text{C}$ : (■) pH 4,5; (●) pH 4,8; (▲) pH 5,4 e (▼) pH 7,4 (modificado de Lu *et al.*, 2009).

Wu e Prausnitz (1999) mediram a pressão osmótica de BSA em NaCl a diferentes concentrações e valores de pH. Em pH 4,5 e 5,4 as forças foram atrativas para concentrações de sal elevadas levando a um valor de  $B_{22}$  negativo e em menores concentrações de sal as interações foram mais repulsivas. Os autores observaram que, em geral, a pressão osmótica é reduzida quando a carga da proteína diminui ou quando a concentração de sal aumenta. Haynes *et al.* (1992) estudaram o parâmetro  $B_{22}$  através de medidas de pressão osmótica para soluções aquosas de  $\alpha$ -quimotripsina em tampão  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a  $25^\circ\text{C}$  para uma ampla faixa de pH e força iônica. Seus dados mostraram que a pH 8,3 ocorre a agregação da  $\alpha$ -quimotripsina (pI 8,3), e que o segundo coeficiente depende fortemente do pH e força iônica. Uma

dependência parabólica do  $B_{22}$  com o pH das soluções de  $K_2SO_4$  ou  $NaH_2PO_4$  foi observada, sendo o valor máximo de  $B_{22}$  encontrado para pH 8,0, próximo ao pl da  $\alpha$ -quimotripsina, indicando quase nenhuma atração ou repulsão entre as moléculas nestas condições. Schaink e Smit (2000) determinaram o valor de  $B_{22}$  para soluções aquosas de  $\beta$ -lactoglobulina em NaCl no seu ponto isoelétrico (pl 5,18) e concluíram que esse parâmetro termodinâmico depende significativamente da concentração de sal, sendo negativo e mais atrativas no pl em concentrações mais baixas de sal. Em soluções aquosas diluídas de  $\beta$ -lactoglobulina as interações foram atrativas no pl para concentrações mais baixas de sal e através da análise de diferentes contribuições de forças eletrostáticas, verificaram que o fenômeno observado é causado principalmente por interações dipolo-dipolo.

### 2.3.2 Espalhamento de luz (static light scattering - SLS)

A técnica de espalhamento de luz para medir o  $B_{22}$  baseia-se na medida da intensidade de luz espalhada como função da concentração de proteína. A intensidade da luz espalhada depende do ângulo de medida. Contudo, no limite de Rayleigh  $R_\theta$  (espalhamento de pequenas partículas) a intensidade torna-se independente do ângulo (o limite de Rayleigh é definido como  $L_r < \lambda/20$ , onde  $L_r$  é o raio da partícula e  $\lambda$  é o comprimento da luz incidente). Moléculas de proteína geralmente são menores do que o comprimento de onda da luz incidente, o que significa estar dentro do limite de Rayleigh. Nesse caso, o limite de Rayleigh,  $R_\theta$ , por definição é proporcional à intensidade de luz difratada e está relacionado à  $M_P$  e ao  $B_{22}$  pela equação clássica:

$$\frac{Kc_P}{R_\theta} = \frac{1}{M_P} + 2B_{22}c_P \quad (2.5)$$

sendo  $K$  uma constante ótica ou instrumental calculada a partir das propriedades do sistema:

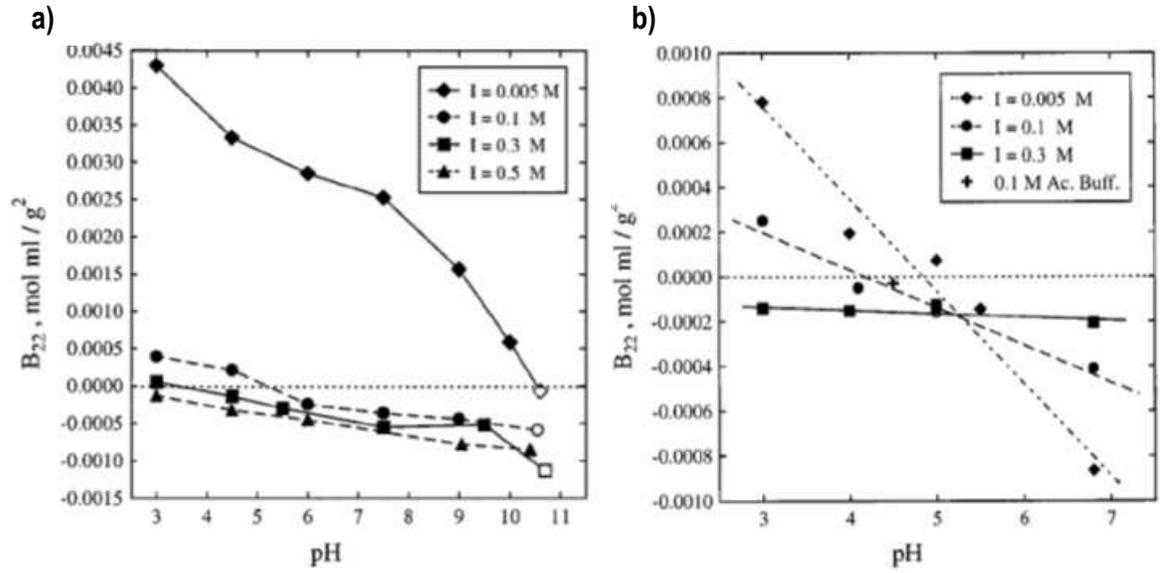
$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda^4} \left( \frac{dn}{dc_P} \right)^2 \quad (2.6)$$

com  $n_0$  sendo o índice de refração do solvente,  $(dn/dc_P)$  o incremento do índice de refração em função da concentração de proteína e  $\lambda$  o comprimento do laser no vácuo. A Equação 2.5 indica que um gráfico de  $K_{CP}/R_\theta$  versus  $c_P$  permite a determinação de  $M_p$  e  $B_{22}$  para uma relação linear (AHAMED *et al.*, 2005).

Medidas de SLS foram usadas por alguns autores para calcular o segundo coeficiente virial osmótico de diferentes proteínas para predição do seu comportamento de fases. Velev *et al.* (1998) utilizaram o SLS para investigar os efeitos de pH e da concentração de eletrólitos nas interações proteína-proteína em soluções de lisozima da clara de ovo de galinha e quimotripsinogênio de pâncreas bovino. Na Figura 2.9 observa-se que, para a lisozima em baixas concentrações de eletrólitos, o segundo coeficiente virial osmótico mostrou uma forte dependência do valor de pH, tornando-se negativo com o aumento desse parâmetro. Já para as concentrações mais altas de sal, os valores de  $B_{22}$  foram ligeiramente negativos e houve pouca dependência em função dos valores de pH. Como a proteína é carregada positivamente em baixos valores de pH, a repulsão intermolecular define o valor positivo de  $B_{22}$ . Com o aumento do pH a carga líquida da lisozima é reduzida e, conseqüentemente, a força da repulsão é minimizada. Para o quimotripsinogênio, o aumento do pH em baixa força iônica leva a uma drástica redução do coeficiente virial e o cruzamento das linhas próximo ao valor de pH 5,2 sugere que o parâmetro  $B_{22}$  não sofre influência da força iônica nesse pH. Uma diminuição do valor de  $B_{22}$  ocorre entre pH 3 e 7, de acordo com a diminuição da carga líquida, até pH 5. A partir desse pH até a região próxima do  $pI \approx 9,5$ , o valor de  $B_{22}$  aumenta com o aumento da força iônica, o que indica que as interações eletrostáticas atrativas são dominantes, apesar da carga positiva da proteína. As diferenças de comportamento do  $B_{22}$  observadas para essas duas proteínas indicam a complexidade das interações proteína-proteína e como elas podem ser distintas para diferentes condições (NEAL *et al.*, 1998).

### 2.3.3 Cromatografia de auto-interação (self-interaction chromatography - SIC)

A precipitação ou cristalização induzida por sais, solventes, polímeros e por temperatura são métodos de purificação de proteína baseados em processos de auto-associação. Interações similares podem ser exploradas por um método cromatográfico denominado de cromatografia de auto-interação (PATRO E PRZYBYCIEN, 1996; PRZYBYCIEN 1998). A SIC envolve a imobilização covalente das proteínas em partículas cromatográficas que são empacotadas em uma coluna. O tempo ou volume de retenção de uma amostra de proteína injetada nessa coluna, em condições isocráticas, reflete a média das interações entre as proteínas.



**Figura 2.9** – Dependência do valor de  $B_{22}$  em função do pH obtidos por SLS em quatro diferentes concentrações de eletrólitos para a lisozima da clara de ovo de galinha (a) e o quimotripsinogênio bovino (b) (VELEV *et al.*, 1998).

Tessier *et al.* (2002a) demonstraram que a SIC pode ser usada para determinar as interações proteína-proteína quantitativamente em termos do segundo coeficiente virial osmótico. A SIC é um método alternativo à osmometria de membranas e ao espalhamento de luz para caracterizar estas interações, além de apresentar vantagens como redução de proteína e tempo utilizados em relação a outras técnicas.

Pelo método cromatográfico de auto-interação, o  $B_{22}$  pode ser obtido através da Equação 2.7:

$$B_{22} = B_{HS} - \frac{k'}{\rho_s \phi} \quad (2.7)$$

na qual a relação da fase,  $\phi$ , é definida pela razão entre a área superficial total do suporte cromatográfico da coluna e o volume de retenção em que as moléculas de proteína na fase móvel não interagem com a superfície do suporte cromatográfico  $V_0$ ;  $\rho_s$  é o número de moléculas de proteínas imobilizadas por unidade de área, o  $B_{HS}$  é o volume excluído ou a contribuição da esfera rígida para  $r$  igual ao raio da proteína:

$$B_{HS} = \frac{16}{3} \pi \cdot r^3 \quad (2.8)$$

A retenção cromatográfica é caracterizada experimentalmente em termos de fator de retenção,  $k'$ :

$$k' = \frac{V_r - V_0}{V_0} \quad (2.9)$$

sendo  $V_r$  o volume de retenção da amostra em que as moléculas livres interagem com a proteína imobilizada.

Assim, a Equação 2.7 fornece uma relação entre o  $B_{22}$  e o  $k'$  baseado apenas no tamanho da molécula da proteína, na quantidade de proteína imobilizada em suportes cromatográficos por unidade de área e na relação da fase (TESSIER *et al.*, 2002a).

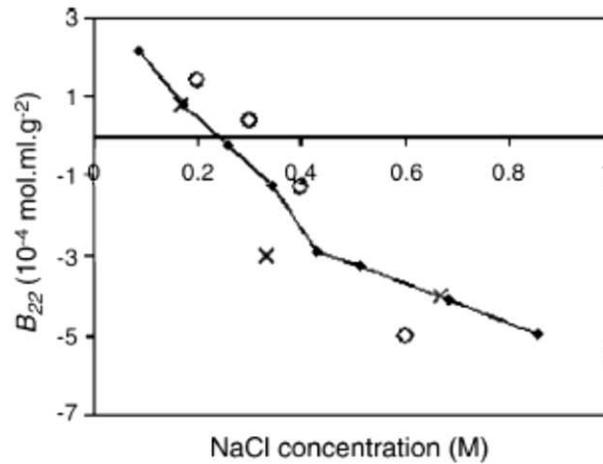
Diferentes grupos de pesquisa têm usado a SIC como uma ferramenta para compreender o comportamento de fases da proteína através de medidas do parâmetro  $B_{22}$ , não só para determinar melhores condições para a cristalização, mas também para obter formulações estáveis em indústrias biofarmacêuticas (JOHNSON *et al.*, 2009; AHAMED *et al.*, 2005; AHAMED *et al.*, 2006; PAYNE *et al.*, 2006; TESSIER *et al.*, 2002a; TESSIER *et al.*, 2002b). No seu trabalho pioneiro, Tessier *et al.* (2002a) realizaram medidas de  $B_{22}$  por SIC e apresentaram esses valores em forma de tabela ao lado de valores obtidos em condições similares (Figura 2.10). Para 21 medidas, a diferença média entre os resultados obtidos por SIC e por SLS foi de  $1,7 \times 10^{-4}$  mol mL  $g^{-2}$  (Figura 2.10a) comparado a uma diferença média entre cinco conjuntos de dados de SLS de  $0,9 \times 10^{-4}$  mol mL  $g^{-2}$  para as mesmas condições de pH e concentração de NaCl. Na Figura 2.10b, a diferença média entre os valores de  $B_{22}$  obtidos por SIC e os dados disponíveis na literatura foi de  $1,2 \times 10^{-4}$  mol mL  $g^{-2}$  enquanto a diferença entre as técnicas de SLS e osmometria foi de  $2,5 \times 10^{-4}$  mol mL  $g^{-2}$ . Embora as técnicas de SLS e SIC tenham variáveis termodinâmicas distintas, essas diferenças devem ter pouco efeito no valor de  $B_{22}$ . Os valores de  $B_{22}$  para o valor de pH 7, medidos após três meses na mesma coluna indicaram que as partículas permanecem estáveis e produzem resultados reprodutíveis, sendo o valor alterado em apenas  $0,3 \times 10^{-4}$  mol mL  $g^{-2}$ . Ahamed *et al.* (2005) investigaram a reprodutibilidade da técnica em diferentes géis, métodos de imobilização da proteína e condições de solução. Eles concluíram que a SIC é capaz de reproduzir os dados de  $B_{22}$  independentemente do tipo de fase estacionária utilizada e estratégia de imobilização (Figura 2.11). Contudo, os autores verificaram que o tempo útil dessas colunas pode ser diferente dependendo da proteína imobilizada. Esses estudos comprovaram que a SIC pode ser utilizada como uma técnica alternativa para medidas de  $B_{22}$ .

(a)					(b)				
pH	Electrolyte concentration (M)	$B_{22}$ ( $10^{-4}$ mol ml/g <sup>2</sup> )		Reference	pH	Electrolyte concentration (M NaCl)	$B_{22}$ ( $10^{-4}$ mol ml/g <sup>2</sup> )		Reference
		SIC	SLS				SIC	Literature values	
3	0.1	4.40	3.95	Velev et al., 1998	3	0.1	1.59	2.80	Velev et al., 1998*
	0.3	2.49	0.55	Velev et al., 1998				1.10	Pjura et al., 2000 <sup>†</sup>
	0.5	-0.36*	-1.26	Velev et al., 1998				-1.50	Velev et al., 1998
4.5	0.1 M NaCl	3.31	3.23 <sup>†</sup>	Rosenbaum et al., 1996	4	0.3	1.00	1.30	Pjura et al., 2000
		1.44	0.15 <sup>†</sup>	Rosenbaum et al., 1996				-0.04	Velev et al., 1998
		0.40	-1.29 <sup>†</sup>	Rosenbaum et al., 1996				-1.50	Velev et al., 1998
		-1.25	-2.04 <sup>†</sup>	Rosenbaum et al., 1996				-1.40	Velev et al., 1998
		-5.02	-3.95 <sup>†</sup>	Rosenbaum et al., 1996				-2.00	Pjura et al., 2000
6	0.1 M NaCl	2.12	-2.46	Velev et al., 1998	5	0.1	0.12	-1.20	Velev et al., 1998
		-2.67	-3.60*	Velev et al., 1998				-0.10	Pjura et al., 2000
		-6.48*	-4.54	Velev et al., 1998				-4.10	Velev et al., 1998
7	0.1 M NaCl	-0.41	-3.18*	Velev et al., 1998	6.8	0.1	-0.73	-1.00	Pjura et al., 2000
		-6.44	-4.51*	Velev et al., 1998				-2.05	Velev et al., 1998
		-9.39*	-5.61*	Velev et al., 1998				3.80	Pjura et al., 2000
7.8	0.1 M MgBr <sub>2</sub>	-2.30	-2.40	Guo et al., 1998	6.8	0.3	0.49		
		-6.14	-4.50	Guo et al., 1998					
		-5.24	-4.40	Guo et al., 1998					
		-4.25	-3.70	Guo et al., 1998					
		-2.70	-3.20	Guo et al., 1998					
9	0.1 M NaCl	-3.21	-4.41	Velev et al., 1998					
		-8.78	-5.28*	Velev et al., 1998					
		-13.7*	-7.80	Velev et al., 1998					

\*Interpolated.  
<sup>†</sup>pH 4.6.

\*SLS.  
<sup>†</sup>Osmometry.

**Figura 2.10** – Comparação entre os valores de coeficiente virial osmótico medidos por SIC e diferentes técnicas para a lisozima de clara de ovo de galinha (a) e quimotripsinogênio bovino (b) (TESSIER *et al.*, 2002a).



**Figura 2.11** – Medidas de  $B_{22}$  para a lisozima de clara de ovo de galinha em diferentes fases estacionárias para pH 4,5 a 23-25°C: agarose (—), Toyopearl® (○) e agarose reticulada (x) (AHAMED *et al.*, 2005).

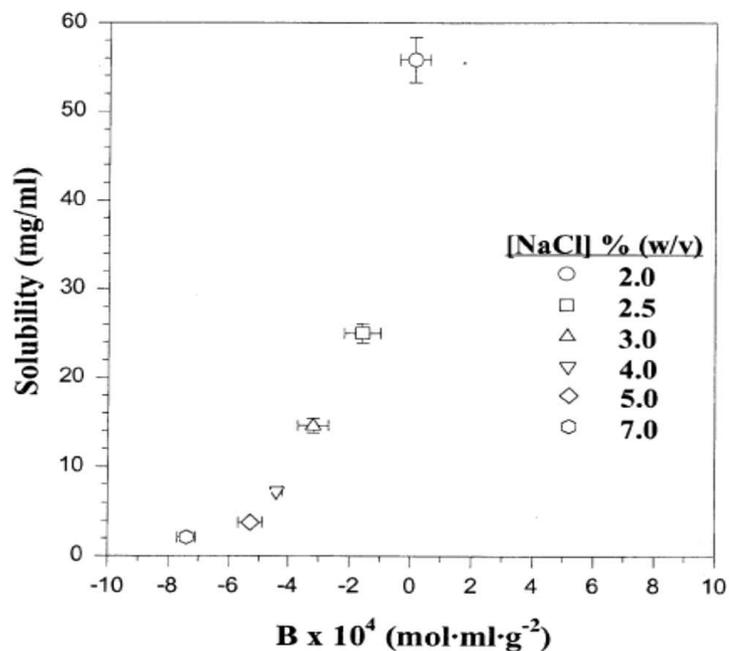
#### 2.4 Modelagem termodinâmica para correlação do segundo coeficiente virial com a solubilidade de proteína

O fenômeno associado aos processos de precipitação e cristalização de proteínas a partir de uma solução aquosa é o equilíbrio sólido-líquido. Diferentes proteínas apresentam limites de solubilidade diferentes para as mesmas soluções salinas. A quantidade de soluto dissolvido em solução depende das interações polares com o solvente aquoso, interações iônicas com o sal presente e interações eletrostáticas repulsivas entre as moléculas carregadas (FRANCO e PESSÔA FILHO, 2013; MEHTA *et al.*, 2012). Embora a “janela de cristalização” permita uma seleção de melhores condições para cristalizar uma determinada proteína através de medidas do parâmetro  $B_{22}$ , a nucleação e o crescimento de cristais ainda são processos dependentes da concentração inicial da proteína. Conhecer a solubilidade da biomolécula em condições de solventes favoráveis é essencial para se projetar e aperfeiçoar processos de separação de proteínas, o que demonstra a utilidade de correlacionar coeficientes viriais à solubilidade dessas moléculas (RUPPERT *et al.*, 2001; ROSENBAUM e ZUKOSKI, 1996).

Guo *et al.* (1999) mostraram experimentalmente que existe uma correlação entre valores de solubilidade e  $B_{22}$  para soluções protéicas e que, a partir de considerações teóricas termodinâmicas, essa relação poderia ser estabelecida entre os dois parâmetros através do potencial químico da proteína no cristal. Os dados da Figura 2.12 permitem perceber uma variação sistemática entre a solubilidade e o  $B_{22}$ ,

na qual os valores do segundo coeficiente virial tornam-se negativos para baixas solubilidades. De acordo com Mehta *et al.* (2012), a correlação empírica de Guo *et al.* (1999) apresenta uma limitação: esses autores consideram que a diferença entre o potencial químico não varia para diferentes temperaturas.

Modelos teóricos que apresentaram um ajuste razoável aos dados experimentais de  $B_{22}$  e solubilidade disponíveis na literatura serão utilizados neste trabalho, a saber: modelos teóricos desenvolvidos por Haas *et al.* (1999), Ruppert *et al.* (2001) e Franco e Pessôa Filho (2013).



**Figura 2.12** – Solubilidade em função de valores de  $B_{22}$  para a lisozima de clara de ovo de galinha dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L para pH 4,2 a 25°C em diferentes concentrações de NaCl (GUO *et al.*, 1999).

#### 2.4.1 Relação teórica de Haas, Drenth e Wilson (1999)

O modelo proposto por Haas *et al.* (1999) depende do parâmetro ( $A$ ) que envolve a anisotropia e a faixa de interação entre moléculas de proteínas sendo independente da temperatura e pH, do número de coordenadas ( $z$ ) das moléculas no cristal e foi desenvolvido a partir de relações termodinâmicas padrões, demonstrando uma relação entre o segundo coeficiente virial e a solubilidade dada por:

$$B_{22} = \left( \frac{4}{M_p \rho} \right) \left\{ 1 - A \left[ \left( \frac{18S}{M_p \times 10^3} \right)^{-\left(\frac{2}{z}\right)} - 1 \right] \right\} \quad (2.10)$$

sendo  $\rho$  a densidade da proteína,  $S$  a solubilidade e  $M_p$  a massa molecular da proteína.

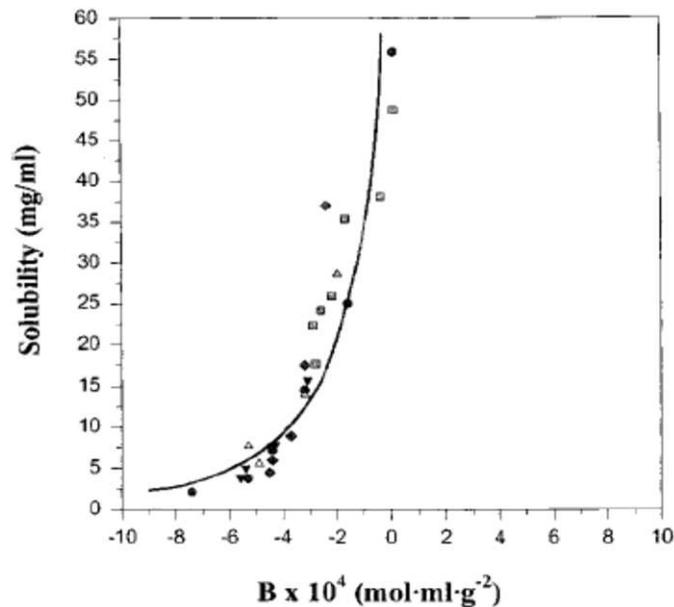
Para obter a Equação 2.10, os autores relacionaram a solubilidade e o  $B_{22}$  com um potencial de interação entre as moléculas de proteína. Como proteínas globulares não são esferas perfeitas, devido à distribuição de grupos hidrofóbicos e polares em sua superfície, eles utilizaram um potencial de interação para interações anisotrópicas entre moléculas não esféricas. A análise de dados experimentais presentes na literatura mostrou uma excelente concordância (Figura 2.13) com a relação teórica obtida por Haas *et al.* (1999).

#### 2.4.2 Relação teórica de Ruppert, Sandler e Lenhoff (2001)

Esse modelo tem como base a igualdade das fugacidades da proteína no equilíbrio de fases, sendo a condição de equilíbrio termodinâmico o ponto inicial para derivar a correlação entre a solubilidade e o segundo coeficiente virial. A fugacidade do estado sólido é considerada independente das condições da solução e a fugacidade da proteína na fase líquida é obtida a partir da relação de diluição infinita no estado padrão (Lei de Henry). Segundo essa relação teórica, o valor do  $B_{22}$  é calculado pela Equação 2.11 que relaciona a solubilidade da proteína diretamente ao  $B_{22}$ .

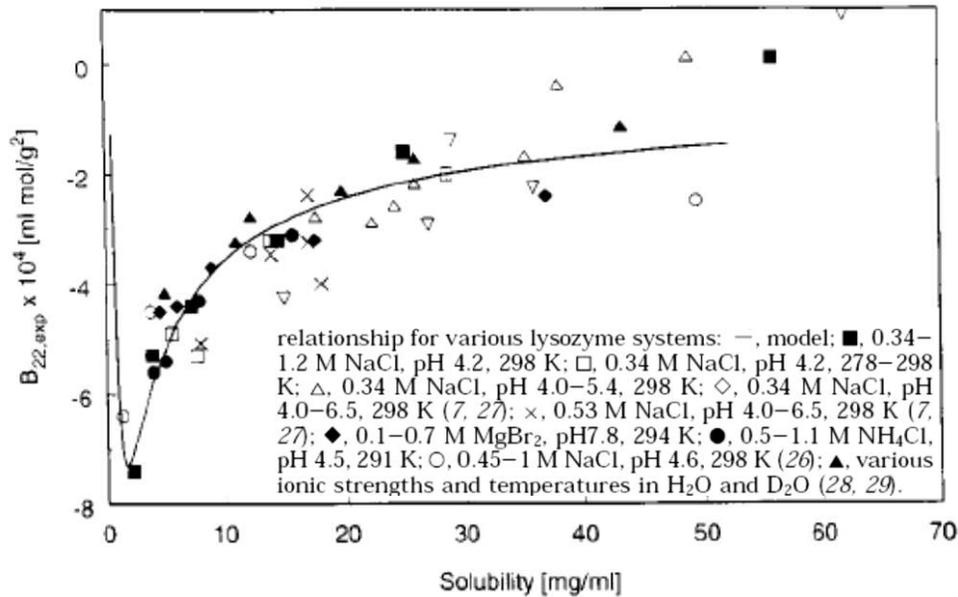
$$B_{22} = \frac{1}{2 \cdot M_p \cdot S} \cdot \left[ A_c - (1-K) \cdot \ln \left( \frac{V_w}{M_p} \cdot S \right) \right] - \frac{\bar{V}_p^\infty}{M_p^2} - \frac{dn/dc_p}{n_0 \cdot M_p} \quad (2.11)$$

onde  $M_p$  é a massa molecular da proteína;  $S$  é a solubilidade da proteína;  $A_c$  e  $K$  são parâmetros adimensionais ajustáveis;  $V_w$  é o volume molar da água;  $\bar{V}_p^\infty$  é o volume parcial molar da proteína;  $dn/dc_p$  é o incremento do índice de refração e  $n_0$  é o índice de refração do solvente.



**Figura 2.13** – Comparação entre o modelo teórico de Haas *et al.* (1999) e os valores experimentais de  $B_{22}$  em função da solubilidade para diferentes sistemas de lisozima: tampão acetato de sódio 0,1 mol/L a pH 4,2 e 25 °C em várias concentrações de NaCl (○); tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, NaCl 2% (m/v) em vários valores de pH a 25°C (□); tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, NaCl 2% (m/v) a pH 4,2 em várias temperaturas (△); tampão acetato de sódio 0,05 mol/L a pH 4,5 e 18 °C em várias concentrações de sulfato de amônio (▽); HEPES 0,02 mol/L a pH 7,8 e 23 °C em várias concentrações de brometo de magnésio (◇) (HAAS *et al.*, 1999).

Ruppert *et al.* (2001) utilizaram dados experimentais retirados da literatura para avaliar a Equação 2.11. A comparação com resultados experimentais foi feita para diferentes condições, permitindo analisar a influência de diferentes parâmetros (temperatura, concentração de sal e pH). A predição do modelo se mostrou adequada para solubilidades de lisozima de até 30 mg/mL. Para concentrações acima de 30 mg/mL a dependência da concentração leva a variações muito pequenas de  $B_{22}$  (Figura 2.14) demonstrando uma discrepância com os dados experimentais, sendo provavelmente, resultado de interações entre mais de dois corpos que não são representadas por esse modelo.



**Figura 2.14** – Comparação entre o modelo teórico de Ruppert *et al.* (2001) e os valores experimentais de  $B_{22}$  em função da solubilidade para diferentes sistemas de lisozima (adaptado de Ruppert *et al.*, 2001).

### 2.4.3 Relação teórica de Franco e Pessôa Filho (2013)

A relação proposta por Franco e Pessôa Filho (2013) baseia-se na termodinâmica clássica e na equação empírica de Cohn (Cohn, 1925) que relaciona a solubilidade da proteína e a força iônica da solução na região de “salting-out” do diagrama de fases. Considerando que o equilíbrio sólido-líquido é estabelecido a partir de moléculas de proteína eletricamente neutras em solução (moléculas que não possuem carga líquida) a equação resultante (Equação 2.12) demonstra a relação entre o  $B_{22}$  e a constante de “salting-out”:

$$\ln\left(\frac{B_{22}}{B^*}\right) = K_s (m_{sal} - m_{sal}^*) \quad (2.12)$$

sendo  $B^*$  o segundo coeficiente virial osmótico para o estado de referência,  $m_{sal}$  a molalidade do sal,  $K_s$  a constante de “salting-out” definida pela equação de Cohn e  $m_{sal}^*$  a molalidade do sal para o estado de referência. Nota-se que devido à forma da Equação 2.12, mudar o valor de referência  $B^*$  irá alterar o valor de  $m_{sal}^*$ , mas sem afetar a desempenho do modelo.

Os autores também compararam o modelo desenvolvido a dados experimentais de lisozima de clara de ovo de galinha e ovalbumina de diferentes relatos na literatura e obtiveram boa concordância. Através do desvio quadrático médio relativo (DQMR) demonstraram que o modelo pode descrever os dados experimentais na região de “salting-out” do diagrama de fases quando comparados a outros modelos teóricos (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1** – Desvios quadráticos médios relativos (DQMR) para diferentes modelos propostos na literatura para sistemas que contém lisozima (adaptado de Franco e Pessôa Filho, 2013).

Modelo teórico	DQMR
Franco e Pessôa Filho (2013)	39,0%
Haas <i>et al.</i> (1999)	41,2%
Ruppert <i>et al.</i> (2001)	28,2%
Mehta <i>et al.</i> (2012) – equação empírica	59,2%

## 2.5 Sais voláteis

Eletrólito volátil é todo composto molecular volátil que em solução aquosa sofre reação de ionização. Como exemplos de sais voláteis têm-se o bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) e o carbamato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NH}_2\text{COO}$ ), em cujas soluções coexistem em equilíbrio espécies iônicas (como o íon amônio) e moleculares (como a amônia). Em uma solução de sais voláteis de amônia e dióxido de carbono ocorrem as seguintes reações químicas:



além do equilíbrio de auto-ionização da água. A proporção das diversas espécies depende da temperatura e da pressão do sistema, bem como da proporção total entre nitrogênio e carbono, conhecida como  $R_{N/C}$  (VAN BERLO *et al.*, 2000). Esse conjunto de reações é mais complexo do que aquele encontrado na dissolução de sais oriundos de bases e ácidos fracos, por exemplo, justamente por incluir o equilíbrio com espécies moleculares voláteis.

No entanto, devido à preocupação em processos industriais de um tratamento posterior à precipitação/cristalização para remoção do sal e sequência de purificação da proteína, além de tratamento dos efluentes gerados antes do seu descarte ao meio ambiente, a utilização de eletrólitos voláteis (dióxido de carbono, soluções aquosas de amônia, carbamato de amônio, entre outros) torna-se uma alternativa atrativa ao uso de sais, ácidos e bases convencionais. Os eletrólitos voláteis se dissociam em solução aquosa com concentrações dependentes da temperatura e pressão do sistema (KHORSHID *et al.*, 2007). Na remoção do eletrólito pela diminuição da pressão ou aumento da temperatura do sistema, o eletrólito passa da fase líquida para a fase vapor contribuindo com a diminuição do custo de operação e purificação do produto.

A utilização de sal volátil em técnicas de recuperação e purificação de proteínas foi feita pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa através da precipitação de tripsina suína com carbamato de amônio (WATANABE *et al.*, 2006). Outros trabalhos também foram realizados por esse mesmo grupo. Lima (2006) precipitou lisozima, insulinas suína e bovina e determinou a cinética de precipitação dessas proteínas analisando o efeito da temperatura e a proporção de amônia ( $R_{N/C}$ ) no sistema. O efeito do carbamato de amônio na atividade catalítica de diferentes enzimas (SILVA *et al.*, 2010) e o equilíbrio de fases para a precipitação de lisozima com o sal volátil (WATANABE *et al.*, 2010) também foram estudados. A precipitação isoelétrica (TASHIMA *et al.*, 2009) e a cristalização de insulina suína (HIRATA *et al.*, 2010) utilizando  $CO_2$  também se mostraram técnicas promissoras na substituição de agentes precipitantes convencionais.

## 2.6 Proteínas estudadas

### 2.6.1 Insulina

A diabetes mellitus é uma doença que afeta milhares de pessoas sendo causada pela falta ou falha na produção de insulina pelo organismo humano. Desde a descoberta da sua função biológica em 1920,

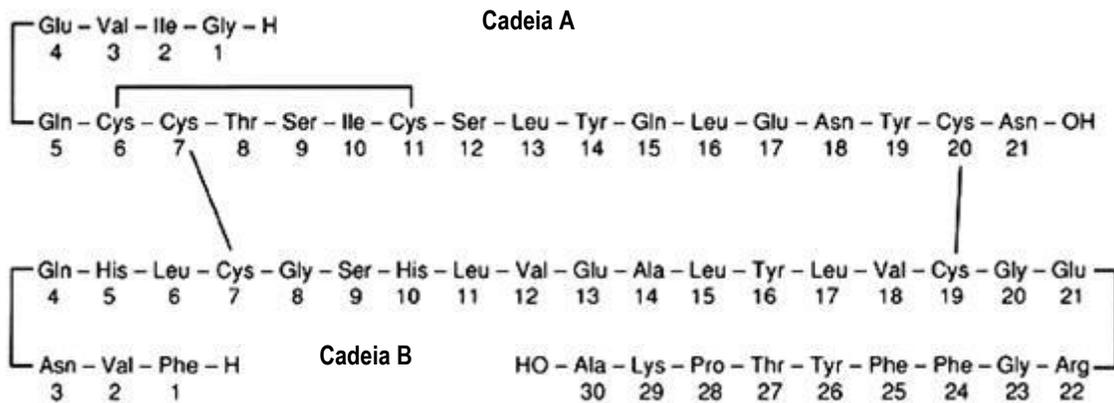
esta molécula tem sido amplamente caracterizada, produzida industrialmente e utilizada diariamente no tratamento médico de diabetes (NORRMAN E SCHLUCKEBIER, 2007).

A insulina é um hormônio composto por 51 aminoácidos com massa molecular de aproximadamente 5800 Da e ponto isoelétrico 5,3 (BROWN, 2002). A molécula é produzida no pâncreas pelas ilhotas de Langerhans, sendo constituída por duas cadeias: cadeia A (21 resíduos) e cadeia B (30 resíduos) que são ligadas por duas pontes dissulfeto (PYO, 2009; WHITTINGHAM *et al.*, 2002; HARRISON *et al.*, 2003; BROMBERG *et al.*, 2005).

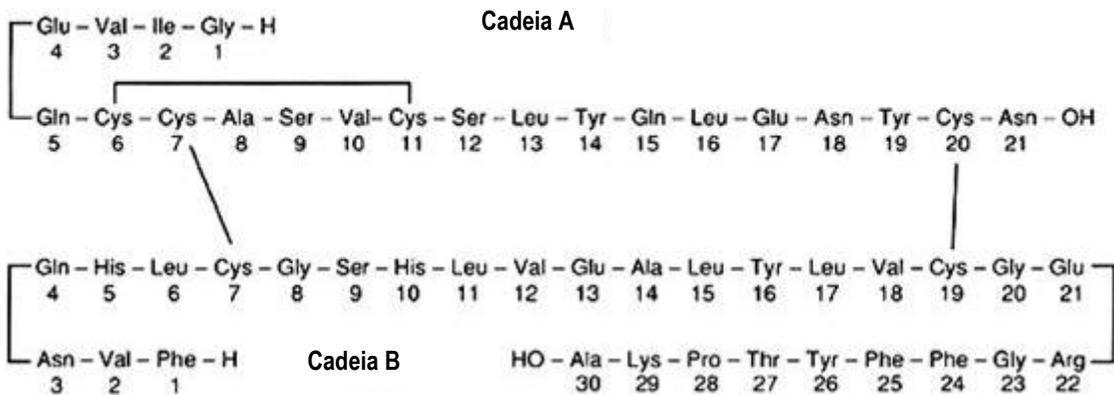
Diferentes espécies apresentam moléculas de insulina com sequências de aminoácidos semelhantes (Figura 2.15). A insulina suína ( $C_{256}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$ ) difere da insulina humana ( $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ ) apenas por um aminoácido na cadeia B – a insulina humana possui uma treonina na posição B30, enquanto a suína tem uma alanina. Já a insulina bovina difere do hormônio humano por três aminoácidos, dois aminoácidos na cadeia A, posição A8 e A10 e um na cadeia B, posição B30: a insulina humana possui treonina, isoleucina e treonina, respectivamente, enquanto a bovina possui alanina, valina e alanina (LADISCH, 2001).

A primeira cristalização de insulina, conhecida há muitos anos e usada em sua purificação, citada por Schlichtkrull (1956), foi feita por Abel em 1926, e a cristalização de insulina com zinco (2 átomos de zinco para cada seis moléculas de insulina – um hexâmero, Figura 2.16), em 1929 por Hartig. Schlichtkrull (1956) descreveu as cristalizações de insulinas suína e bovina em tampão citrato pH 6,0 na presença de acetona. De acordo com esse autor, os cristais de insulina suína possuem forma romboédrica, enquanto os tipos de cristal de insulina bovina mostram uma aparência “twinned” (tipo estrela). No trabalho de Hirata (2009) foi determinada a solubilidade da insulina suína em atmosfera de  $CO_2$ , que se mostrou muito baixa para valores de pH entre 6,30 a 7,34 (10,8 a 608,6  $\mu g/mL$ ). A formação de cristais romboédricos foi obtida apenas para os valores de pH 6,30 e 6,45 a 15°C.

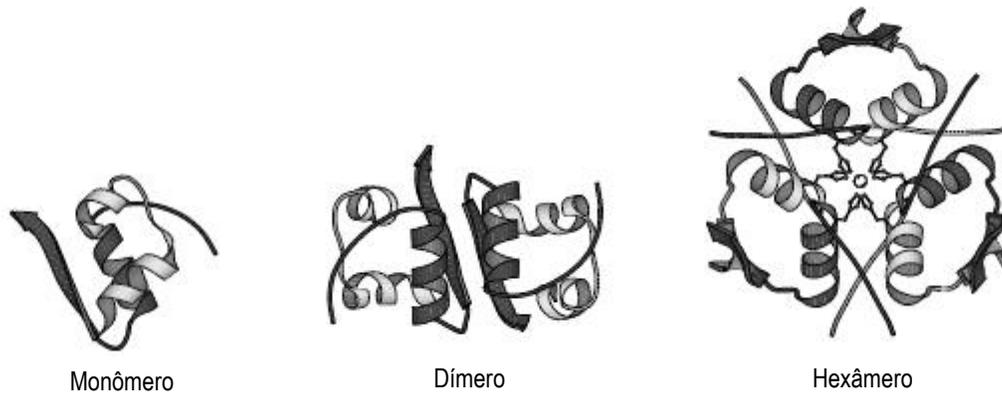
## INSULINA SUÍNA



## INSULINA BOVINA



**Figura 2.15** – Estruturas primárias das insulinas suína e bovina (The International Pharmacopoeia, 2013).



**Figura 2.16** – Estrutura molecular da insulina incluindo o monômero, dímero e hexâmero. O complexo insulina-zinco é a unidade cristalina importante na formação do cristal romboédrico (Adaptado de Whittingham *et al.*, 2002).

### 2.6.2 Lisozima

A lisozima (E.C.3.2.17, N-acetilmuramidase, Figura 2.17) é uma enzima globular básica que apresenta uma massa molecular de aproximadamente 14,4 kDa e degrada os polissacarídeos encontrados na parede celular de bactérias. Consiste em uma cadeia de polipeptídeo com 129 aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. Essa enzima é um dos poucos agentes naturais com propriedade antimicrobiana utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica. A lisozima pode ser adicionada diretamente aos alimentos para evitar o crescimento de bactérias indesejadas (CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA *et al.*, 2008; FUGLSANG *et al.*, 1995).

A lisozima está presente em quase todas as secreções do corpo (lágrima, secreção nasal, saliva, etc.) e tecidos de organismos humanos e animais, podendo também ser extraída de plantas e bactérias. A enzima utilizada neste trabalho é proveniente da clara de ovo de galinha, com maior atividade entre os valores de pH 6,0 e 9,0, apresentando pH ótimo de 6,2 e ponto isoelétrico igual a 11,35 de acordo com o fornecedor (Sigma, EUA).

Retailleau *et al.* (1997) estudaram a solubilidade da lisozima em cloreto de sódio e observaram a ausência da região de “salting-in” para a faixa de pH 3,0 a 9,0. A solubilidade da lisozima aumentou com a carga líquida da proteína para baixa força iônica, mas o oposto foi observado em força iônica elevada. Shih *et al.* (1992) também estudaram a solubilidade da lisozima em soluções aquosas de eletrólitos (cloreto de

sódio, sulfato de sódio e fosfato de sódio). Esse estudo parcialmente corroborou os resultados de estudos anteriores: a solubilidade depende do pH e o seu mínimo é observado ao redor do ponto isoelétrico da proteína (para a lisozima próximo de 10,0). Dados de solubilidade de proteínas são relatados na literatura desde o século passado. Na década de 1930, Green estudou extensamente a solubilidade da hemoglobina em função da natureza do sal para altas concentrações. Seu trabalho deu a base teórica para a regra de que as proteínas têm solubilidade mínima no ponto isoelétrico e que aumenta (“salting-in”) e diminui (“salting-out”) com a força iônica, como observado nos trabalhos de Shih *et al.* (1992) e Retailleau *et al.* (1997) para a lisozima. Essa molécula foi primeiramente cristalizada em condições ácidas em cloreto de sódio com tampão acetato por Alderton e Fevold (1946) em uma ampla faixa de pH (pH 3,0 a 11,0). O crescimento de cristais de lisozima a partir de sulfato de amônio foi relatado por diferentes autores (BROIDE *et al.*, 1996; FORSYTHE *et al.*, 1997 e 1999) e o estudo de Moretti *et al.* (2000) mostrou que para pH 8,0 a cristalização dessa proteína pode ser realizada mesmo a temperatura ambiente. Em pH 4,0 a semeadura ou o resfriamento foi necessário e o crescimento foi mais lento. Forsythe *et al.* (1997) cristalizaram lisozima a partir de sulfato de amônio para valores de pH 4,0 a 7,8 com concentrações de proteína de 100 a 150 mg/mL. Duas formas cristalinas foram obtidas e mostraram ser dependentes das variáveis concentração da proteína e temperatura. Com a diminuição da temperatura ou da concentração da proteína, os cristais apresentaram morfologia tetraédrica e cristais ortorrômbicos foram obtidos com o aumento dessas variáveis. Devido à sua facilidade de precipitar e cristalizar em diferentes formas cristalinas, a lisozima é amplamente estudada e utilizada em processos de precipitação e cristalização, sendo largamente empregada como proteína modelo (MORETTI *et al.*, 2000).



**Figura 2.17** – Estrutura tridimensional da lisozima de clara de ovo de galinha (PDB – 2LYZ).



---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Reagentes

As insulinas suína (96,6% de pureza) e bovina (pureza maior que 95%) foram doadas pela Biobrás (Brasil). A lisozima de clara de ovo de galinha, três vezes cristalizada, dialisada e liofilizada foi obtida da Sigma (produto L6876, EUA) com pureza maior ou igual a 90%. As três proteínas citadas foram utilizadas sem purificação adicional. O sal volátil carbamato de amônio com 99% de pureza foi obtido da Sigma-Aldrich (produto 292834, EUA).

O tolueno P.A. 100% utilizado nas análises de espalhamento de luz estático e o cloreto de potássio P.A. usado para a calibração do refratômetro diferencial foram obtidos da Synth (Brasil). A água ultra pura foi obtida com o equipamento Milli-Q System da Millipore (EUA).

Para a cromatografia de auto-interação foram utilizados a matriz agarose ativada com CNBr 4 Fast Flow da GE Healthcare Life Sciences (Suécia), ácido clorídrico P.A. 36,5-38,0% e ácido acético glacial P.A. 99,7% da Êxodo Científica (Brasil), bicarbonato de sódio da J.T. Baker (México), cloreto de sódio e tris(hidroximetil)aminometano (Tris) da Merck (Alemanha), acetato de sódio anidro P.A. 99% foi obtido da Vetec (Brasil) e etanol P.A. 99,5% da Synth (Brasil).

##### 3.1.2 Equipamentos

Para a determinação das propriedades físico-químicas das soluções de carbamato de amônio os seguintes equipamentos foram utilizados: refratômetro modelo RE40D (acurácia  $\pm 0,0001$  nD, Metler Toledo, EUA), densímetro modelo Density meter DMA 4500 (acurácia  $\pm 0,00005$  g/cm<sup>3</sup>, Anton Paar, Áustria), viscosímetro modelo AMVn Automated Micro Viscometer (acurácia  $< 0,002$  s, Anton Paar, Áustria) e um refratômetro diferencial modelo BI-DNDCW (Brookhaven Instruments, EUA).

Os equipamentos empregados na determinação do parâmetro  $B_{22}$  foram o Zetasizer modelo Nano ZS (Malvern, Reino Unido), o osmômetro de membrana modelo 4420 Colloid Osmometer (Wescor, EUA) e

o sistema FPLC Äkta Purifier com detector de UV 280 nm (GE Healthcare Life Sciences, Suécia). A agarose foi empacotada em coluna Tricorn 5/50 (GE Healthcare Life Sciences, Suécia).

Os ensaios para a obtenção dos diagramas de fases foram feitos em banho termostaticado Tecnal TE-2000 (Brasil), com precisão de  $\pm 0,2$  °C. Para a separação das fases líquida e sólida foram utilizadas a centrífuga 5804 R Eppendorf (Alemanha) e filtros de seringa Millex 0,45  $\mu\text{m}$  da Millipore (EUA). Para determinação da concentração das proteínas foi utilizado o espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Instruments, EUA). O pH das soluções foi medido através do pHmetro digital microprocessado, marca Micronal, modelo AJX-511 (Brasil).

Os ensaios de cristalização foram feitos no equipamento CrystalEYES composto por um reator de vidro com volume de 75 mL, sensores de turbidez, temperatura e pH (HEL GROUP, Reino Unido) acoplado ao circulador Julabo modelo F25-HE (Alemanha) para controle de temperatura. A aquisição de dados deste equipamento é feita através do software WinISO E985s-CrystalEyes.

## 3.2 Metodologia

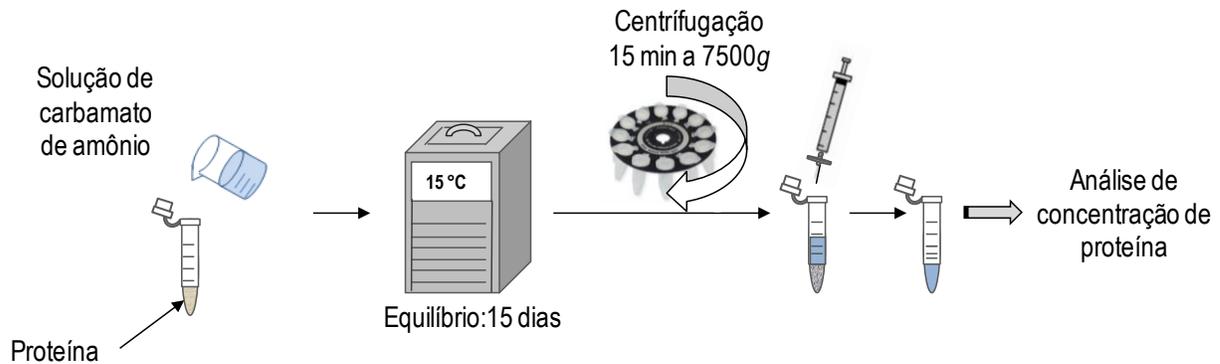
### 3.2.1 Determinação de diagramas de fases das proteínas nas temperaturas de 15 e 25 °C

Para a construção dos diagramas de fases das proteínas lisozima, insulinas suína e bovina determinaram-se as curvas de solubilidade e os limites de supersaturação nas temperaturas de 15 e 25 °C.

#### 3.2.1.1 *Determinação das curvas de solubilidade das proteínas de interesse em solução de sal volátil carbamato de amônio*

A determinação da solubilidade foi realizada através de ensaios de dissolução (Figura 3.1), conduzidos em tubos tipo Eppendorf de capacidade de 2,0 mL, adicionando-se a proteína e a solução de carbamato de amônio de modo a produzir um volume final de 1,0 mL para cada concentração de sal desejada. Em seguida, os tubos foram vedados com parafilm®, agitados e colocados em banho termostaticado às temperaturas de 15 ou 25 °C durante 15 dias para atingir o equilíbrio (tempo determinado por ensaios preliminares). Os tubos foram rapidamente agitados em vortex, duas vezes ao dia, durante o tempo de equilíbrio. Após este período, as fases líquida e sólida foram separadas por centrifugação durante 15 minutos a 7500 g. Com o auxílio de uma seringa, a fase sobrenadante foi retirada e em seguida, filtrada (tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) para determinação da concentração da proteína por

medidas de absorvância a 280 nm ou pelo método de Bradford (1976) modificado (reagente Coomassie Plus) para as maiores concentrações de sal. Os ensaios foram realizados em triplicata e a média das concentrações de proteína foi considerada como sendo a solubilidade nas condições de temperatura e concentração de sal estudadas. A curva de solubilidade foi constituída de um gráfico de concentração de proteína na fase sobrenadante (mg/mL) em função da concentração de sal (mol/kg).

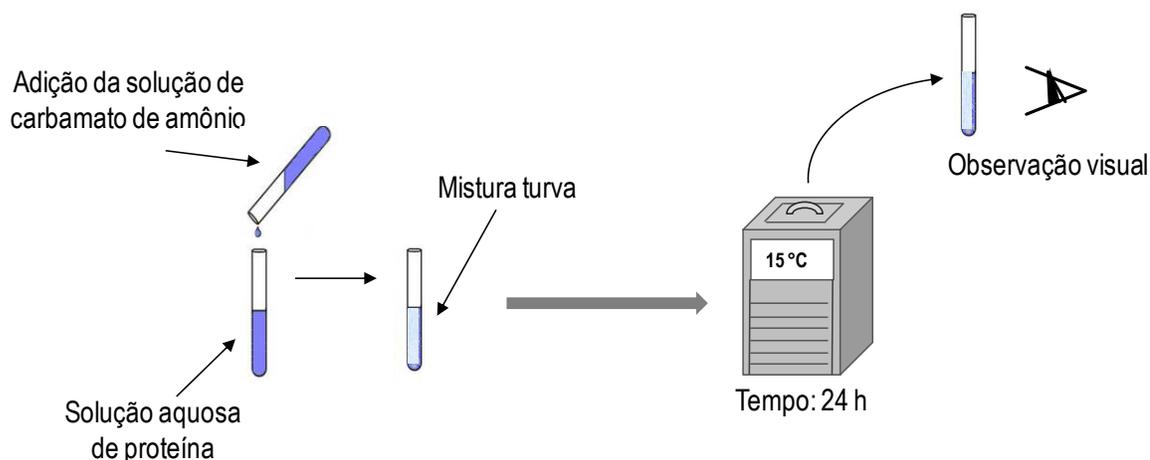


**Figura 3.1** – Ilustração da metodologia utilizada para determinação da solubilidade das proteínas por ensaios de dissolução.

### 3.2.1.2 Estimativa da zona de metaestabilidade no diagrama de fases

O limite de metaestabilidade no diagrama de fases foi estimado através de ensaios de nucleação. A metodologia aplicada a este estudo foi a mesma utilizada por Watanabe *et al.* (2010). Assim, uma solução aquosa de sal foi lentamente adicionada gota a gota à uma solução aquosa de proteína até o momento em que a mistura tornou-se turva. A mistura foi agitada e mantida a 25 °C ou 15 °C em banho termostático e observada visualmente. Nas condições em que a solução tornou-se límpida, adicionou-se novamente, gota a gota, a solução proteica. Esse procedimento foi realizado até a mistura permanecer turva durante um período de 24h (Figura 3.2). Para a obtenção do limite de metaestabilidade, o procedimento foi realizado com diferentes concentrações de sal e proteína e todos os ensaios foram realizados em triplicata. A composição da mistura foi calculada como a média aritmética das composições antes e depois da adição das soluções. As soluções salinas e proteicas foram preparadas gravimetricamente por dissolução, tanto da proteína quanto do sal, sem ajuste de pH. Para a lisozima, uma quantidade de proteína foi pesada e dissolvida em água deionizada. Para as insulinas suína e bovina, as proteínas foram pesadas e dissolvidas em solução aquosa de carbamato de amônio 0,06 mol/kg devido à

sua baixa solubilidade em água. As frações mássicas da proteína e do carbamato de amônio variaram entre 0,02 e 0,20, e entre 0,10 e 0,30, respectivamente. Como já dito, o uso de carbamato de amônio não permite o estudo com ajuste de pH.



**Figura 3.2** – Esquema do procedimento experimental para determinação do limite de metaestabilidade através de ensaios de nucleação.

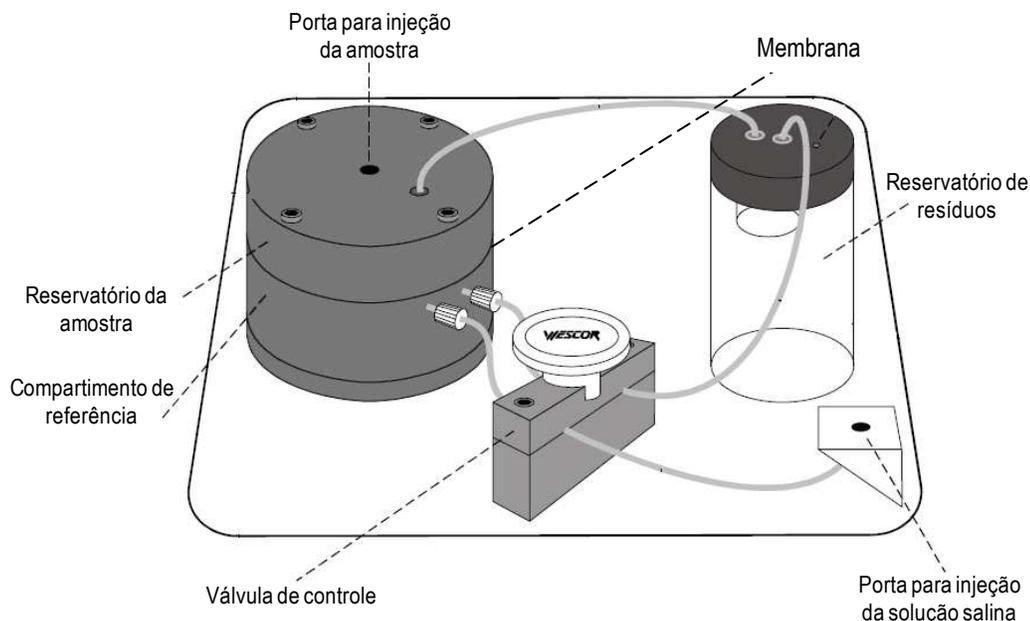
### 3.2.2 Determinações experimentais do segundo coeficiente virial osmótico ( $B_{22}$ )

A seguir são apresentados os três métodos utilizados para a determinação do parâmetro  $B_{22}$ : osmometria de membranas, espalhamento de luz e cromatografia de auto-interação.

#### 3.2.2.1 Determinação do parâmetro $B_{22}$ por osmometria de membranas

Os ensaios de osmometria foram realizados no osmômetro de membrana modelo 4420 Colloid Osmometer (Wescor, EUA) no laboratório do Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho do Departamento de Engenharia Química da USP. Uma solução padrão (Osmocoll ® N) foi utilizada para a calibração do equipamento (Figura 3.3). A membrana utilizada no interior do osmômetro foi a membrana de ultrafiltração ultracel 3 kDa NMWL (Millipore, EUA). Para a determinação da pressão osmótica, uma solução estoque de cada proteína foi preparada na sua concentração de saturação, pela dissolução da molécula na solução aquosa de carbamato de amônio na concentração desejada deste sal (0,06; 0,25; 0,45; 0,69; 0,90; 1,09 e 1,29 mol/kg). Para cada conjunto de dados, o compartimento de referência foi preenchido com cerca de 10 mL de solução de sal volátil na concentração desejada. A seguir, foram injetadas na porta de injeção da amostra as soluções de proteína em ordem crescente de concentração (cerca de 350  $\mu$ L ou mais,

dependendo da resposta do equipamento) para as medidas da pressão osmótica para cada uma dessas concentrações (precisão de  $\pm 0,3$  mmHg).



**Figura 3.3** – Ilustração do interior do osmômetro de membrana (adaptado de Colloid Osmometer Model 4420 Operator & Service Manual, M2054-3A, Wescor Inc. An Elitech Company).

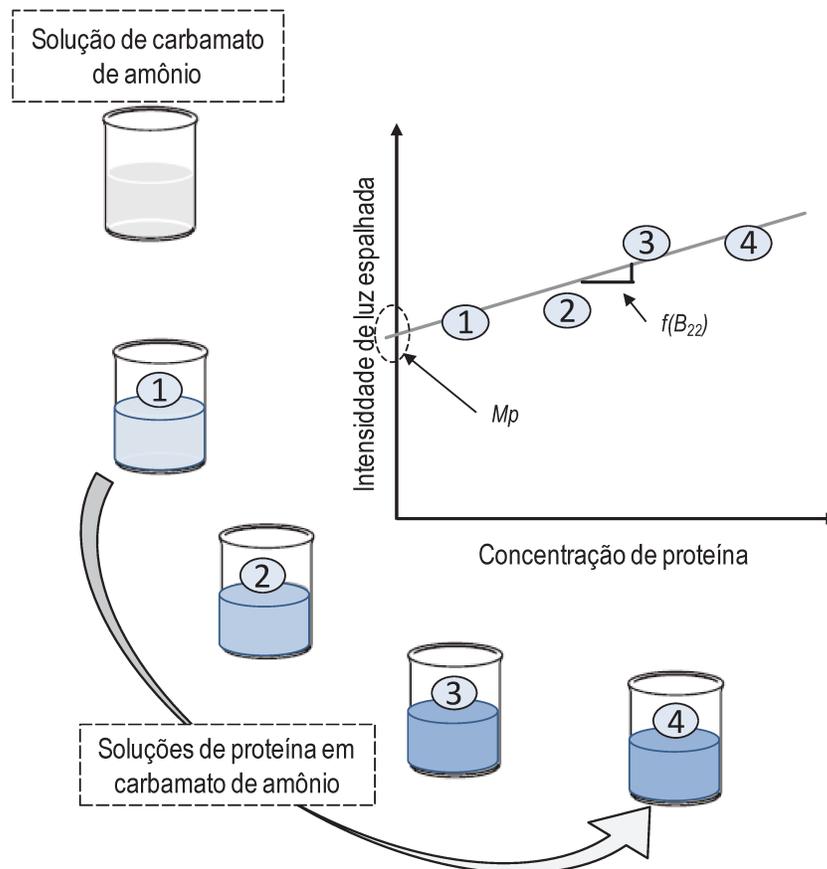
### 3.2.2.2 Determinação do parâmetro $B_{22}$ por espalhamento de luz estático (SLS)

Para a realização dos ensaios de espalhamento de luz foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS (comprimento de onda de 633 nm e ângulo de medida 173°; Malvern Instruments, Reino Unido) do Laboratório da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Liliane Maria Ferrareso Lona da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. As propriedades necessárias usadas como dados de entrada também foram determinadas: índice de refração (Laboratório do Prof. Dr. Martín Aznar da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP), incremento do índice de refração (Laboratório do Prof. Watson Loh do Instituto de Química da UNICAMP), densidade e viscosidade (Laboratório de Extração e Termodinâmica aplicada ao Equilíbrio – ExTrAE dos Profs. Dr. Antonio José Meirelles e Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP).

Para determinação do índice de refração, densidade e viscosidade foram preparadas soluções aquosas de carbamato de amônio nas concentrações de sal estudadas. Cerca de 100  $\mu\text{L}$  de cada solução salina foram utilizadas no refratômetro. Já para a determinação da densidade e viscosidade, cerca de 1,0

mL de solução para cada concentração de sal desejada foi utilizada para a medida de cada parâmetro. A determinação do incremento do índice de refração em função da concentração da proteína ( $dn/dC$ ) foi realizada em um refratômetro diferencial. Para essa medida, foram utilizadas quatro diferentes concentrações de proteína para cada concentração de sal analisada. Em posse desses parâmetros, a medida do valor de  $B_{22}$  através do espalhamento de luz foi realizada.

Para as medidas do  $B_{22}$  foram preparadas cinco amostras para cada concentração de sal utilizada. A variação da concentração de proteína dependeu da sua solubilidade em carbamato de amônio. Tolueno P.A. 100% (Synth, Brasil) foi o padrão empregado para calibrar a intensidade de espalhamento de luz e, em seguida, foram analisadas a solução salina sem a presença da proteína e todas as outras soluções (em ordem crescente de concentração de proteína). Cerca de 1,0 mL de amostra foi utilizado em cada medida (Figura 3.4).

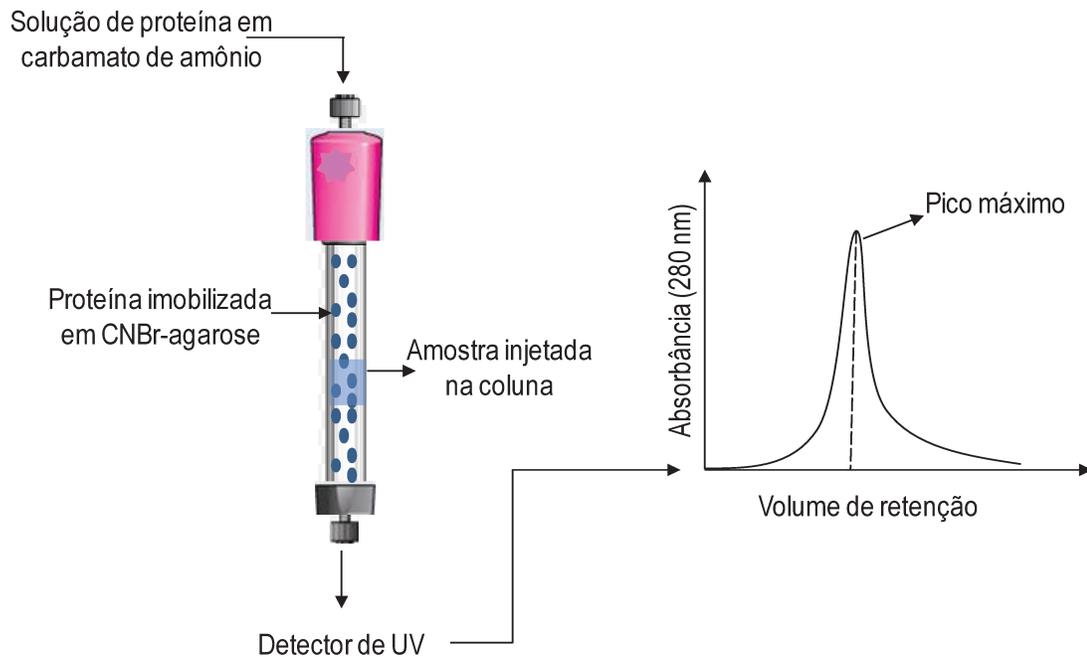


**Figura 3.4** – Ilustração da metodologia experimental para determinação do parâmetro  $B_{22}$  por espalhamento de luz,  $M_p$  = massa molar da proteína (adaptado de Zetasizer Nano Series User Manual, Malvern Instruments).

### 3.2.2.3 Determinação do parâmetro $B_{22}$ por cromatografia de auto-interação (SIC)

Imobilização da proteína: A agarose ativada com CNBr (0,5 g) foi inicialmente lavada com uma solução de HCl 1 mmol/L a 4 °C. Após a lavagem, um volume de 10,0 mL da solução da proteína de interesse (6,5 mg/mL) em  $\text{NaHCO}_3$  0,1 mol/L a pH 8,3 foi adicionada ao gel. A mistura foi deixada sob agitação branda durante 24 h a 4 °C para que a proteína fosse acoplada à matriz através de grupos amino primários. Após esse período, o gel foi lavado com  $\text{NaHCO}_3$  0,1 mol/L a pH 8,3 para retirar o excesso de proteína. Os grupos não reagentes do gel foram bloqueados com Tris-HCl 0,1 mol/L a pH 8,0. A mistura permaneceu em repouso por duas horas. Em seguida, o gel foi lavado com os tampões acetato de sódio 0,1 mol/L contendo NaCl 0,5 mol/L a pH 3,5 e Tris-HCl contendo NaCl a pH 8,5. A lavagem com os tampões foi feita de maneira cíclica, alternando-se os valores de pH. Este ciclo foi repetido por cinco vezes (Instructions-GE Healthcare, EUA). Esse mesmo procedimento foi realizado com outra massa de agarose ativada com CNBr (0,5 g), porém sem a adição da proteína ao gel, para se preparar uma matriz para a determinação do volume de retenção da coluna sem a interação da proteína da fase móvel com a proteína imobilizada (coluna controle). A agarose com e sem (controle) a proteína imobilizada foram empacotadas em colunas Tricorn 5/50 (GE Healthcare, EUA). A integridade das colunas foi confirmada injetando-se 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de acetona 1%, quando se obteve um pico Gaussiano.

Cromatografia de auto-interação: Soluções aquosas de carbamato de amônio (0,06; 0,25; 0,45; 0,69; 0,90; 1,09 e 1,29 mol/kg) foram utilizadas como fase móvel para a determinação do parâmetro  $B_{22}$  para cada concentração de sal. A proteína foi dissolvida, em concentração abaixo da saturação, nas soluções de sal volátil citadas acima para o preparo das amostras. As medidas de volume de retenção necessárias para o cálculo do  $B_{22}$  foram realizadas no sistema FPLC Äkta Purifier com detector de UV 280 nm. A coluna foi equilibrada com 10 mL de fase móvel na concentração de sal desejada. Todas as análises foram feitas com uma vazão de 0,75 mL/min e 50  $\mu\text{L}$  de amostra. Os cromatogramas de cada corrida foram analisados com o software UNICORN 5.11 (GE Healthcare, EUA) e o pico máximo obtido em cada cromatograma foi considerado o volume de retenção  $V_r$ . O mesmo procedimento foi realizado com a coluna controle para o qual também se determinou o volume de retenção  $V_0$  (Figura 3.5).

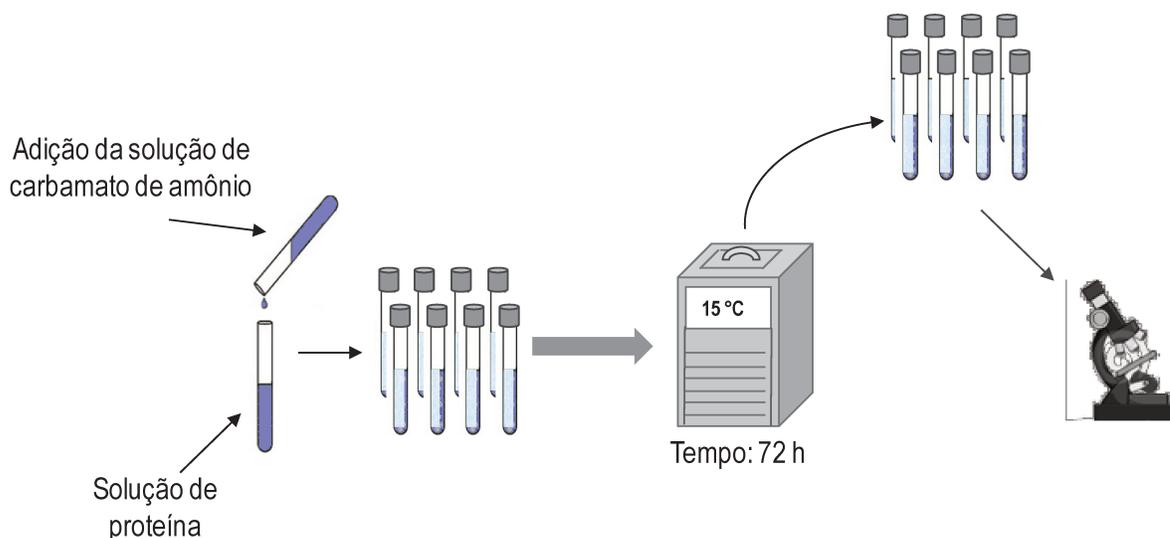


**Figura 3.5** – Representação simplificada da cromatografia de auto-interação para determinação do parâmetro  $B_{22}$ .

### 3.2.3 Ensaios de cristalização/precipitação com sal volátil

#### 3.2.3.1 Ensaios preliminares de cristalização/precipitação de insulina suína com sal volátil a 15 °C

Os ensaios preliminares de cristalização com a insulina suína em carbamato de amônio foram realizados para analisar a possibilidade de cristalização de insulina suína em sal volátil, uma vez que não foram encontradas na literatura consultada informações sobre este processo. Diferentes concentrações de carbamato de amônio e proteína foram testadas à temperatura de 15 °C. Uma solução estoque de insulina suína foi preparada em carbamato de amônio 0,06 mol/kg e um volume determinado dessa solução foi colocado em tubos de ensaios de 10 mL. Os tubos foram deixados em banho termostatizado, junto com as soluções de carbamato de amônio para que a temperatura desejada fosse atingida. Em seguida, determinados volumes da solução de sal foram adicionados aos tubos com solução protéica de modo a se obter a concentração final de sal desejada. Os tubos foram fechados e mantidos em banho termostatizado a 15 °C durante 72 h. Ao final desse período, as partículas obtidas para cada concentração de sal volátil e proteína foram analisadas por microscopia ótica (Figura 3.6).

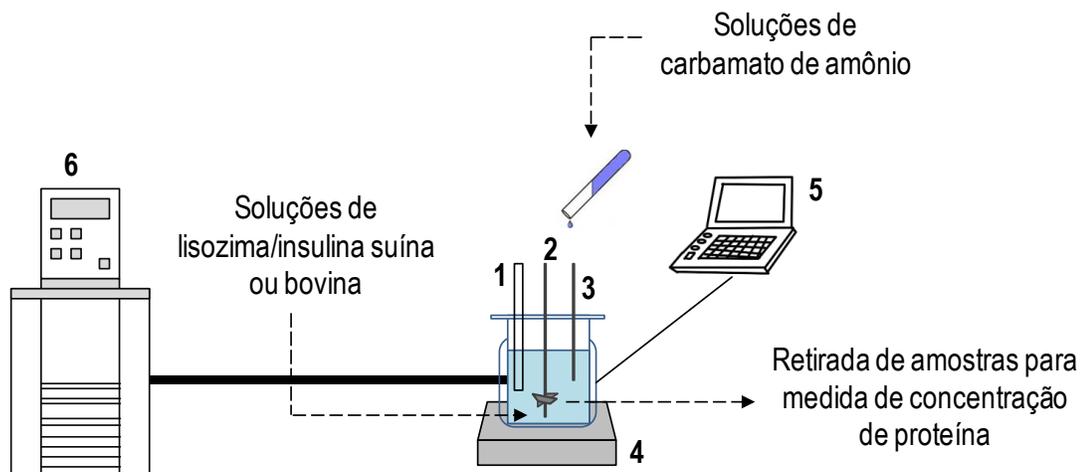


**Figura 3.6** – Ilustração da metodologia experimental utilizada nos ensaios preliminares de cristalização de insulina suína com sal volátil a 15 °C.

### 3.2.3.2 Ensaios de cristalização/precipitação das proteínas com sal volátil a 15 e 25 °C

Os ensaios de cristalização foram todos realizados em um reator de vidro com volume de 75 mL do equipamento CrystalEYES. A turbidez, temperatura e pH foram monitorados pelo software WinISO E985s-CrystalEyes.

Para a lisozima, uma quantidade de proteína foi pesada e dissolvida em água deionizada. Para as insulinas suína e bovina, uma quantidade destas proteínas foi pesada e dissolvida em solução aquosa de carbamato de amônio 0,06 mol/kg devido à baixa solubilidade em água. A solução proteica na concentração desejada foi filtrada em filtros de seringa Minisart 16534 com tamanho de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Alemanha), adicionada ao reator e mantida a 15 ou 25 °C com agitação por barra magnética suspensa a 120 rpm. Em seguida, acrescentou-se ao reator a solução de carbamato de amônio para que cada ensaio fosse realizado na concentração de sal desejada. Os dados de pH e temperatura se mantiveram constantes durante o ensaio. Amostras foram retiradas em intervalos de 24 h e filtradas, sendo o sobrenadante utilizado para determinação da concentração da proteína (Figura 3.7). O equilíbrio do sistema foi considerado atingido quando a concentração da proteína no sobrenadante das amostras retiradas em intervalos de 24 h permaneceu constante. A fase sólida foi utilizada para caracterização das partículas através de microscopia eletrônica de varredura.



**Figura 3.7** – Ilustração da metodologia experimental utilizada nos ensaios de cristalização de proteína com sal volátil a 15 e 25 °C. Eletrodo de pH (1), sensor de turbidez acoplado ao agitador magnético suspenso (2), sensor de temperatura (3), placa de agitação magnética (4), computador para aquisição dos dados (5), circulator para controle da temperatura do reator (6).

### 3.2.4 Determinação da concentração das proteínas

As concentrações das proteínas de interesse foram determinadas pelos métodos de Bradford (1976) modificado (reagente Coomassie Plus, Pierce, EUA), de maior sensibilidade que o método convencional, e por medidas de absorvância a 280 nm. Antes da medida de concentração de proteína, para as maiores concentrações de sal, a concentração de carbamato de amônio foi reduzida utilizando-se dispositivos de filtração centrífuga Amicon® Ultra-4 (limite de massa molecular nominal 3000 kDa) para a diluição do sal. A curva padrão para cada proteína foi previamente determinada.

### 3.2.5 Análise dos cristais por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos cristais foi obtida por análise de imagem utilizando-se um microscópio biológico trinocular modelo Tim-108 Opton (Brasil) com aumento de 40 a 1600X e por microscopia eletrônica de varredura, análise realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

---

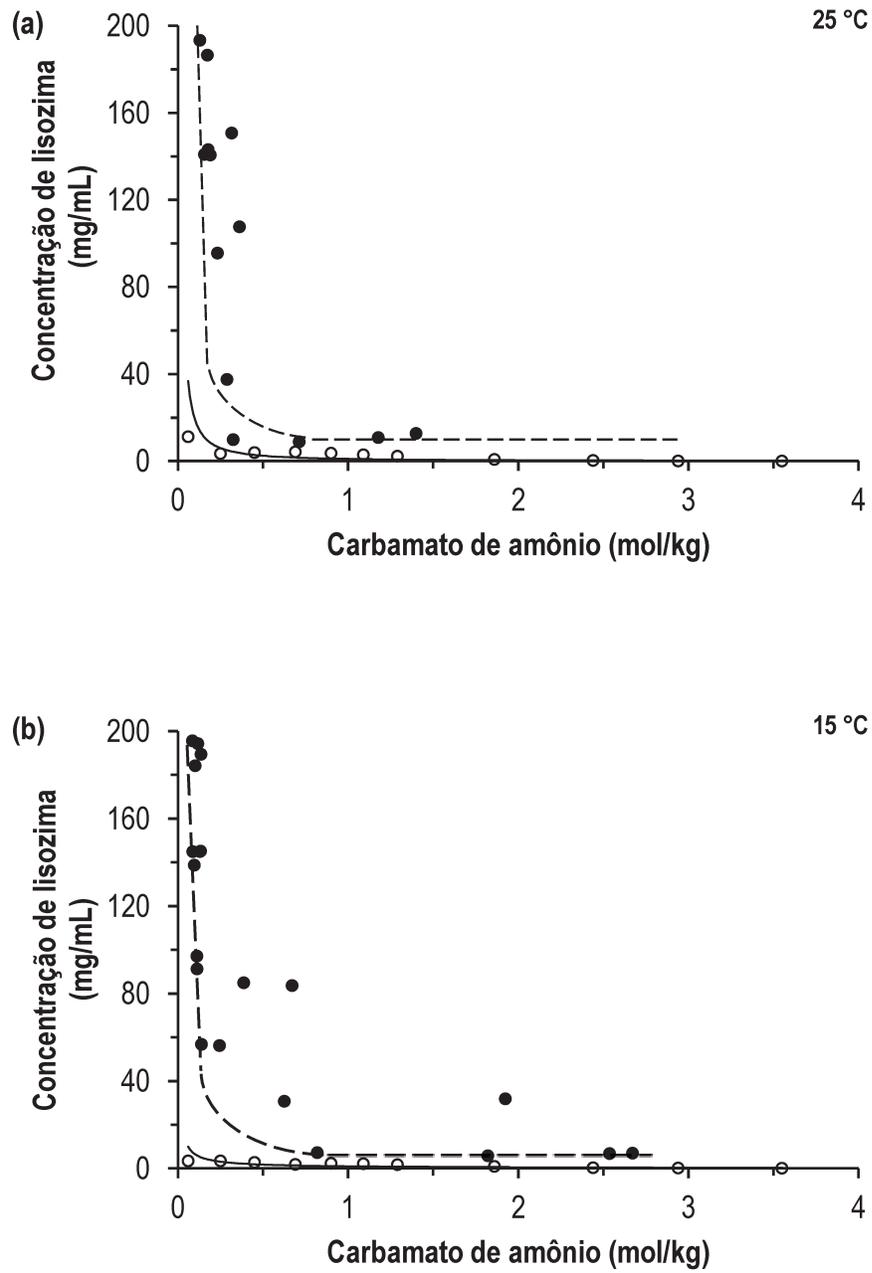
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Apresentam-se nesta seção os resultados necessários para a construção do diagrama de fases para as proteínas lisozima, insulinas suína e bovina. Para a obtenção do valor de  $B_{22}$ , os valores de algumas propriedades das soluções, como índice de refração, densidade, viscosidade e incremento do índice de refração para diferentes temperaturas, foram determinados e são apresentados no APÊNDICE 2. A partir desses dados, os três diferentes métodos para obtenção do parâmetro  $B_{22}$  (osmometria, espalhamento de luz e cromatografia de auto-interação) foram empregados. Em seguida, também são apresentados os ensaios de cristalização para verificar a “janela de cristalização” para os sistemas de proteína/sal volátil. E, por fim, os valores de  $B_{22}$  obtidos experimentalmente foram relacionados à solubilidade das proteínas através de modelos termodinâmicos disponíveis na literatura.

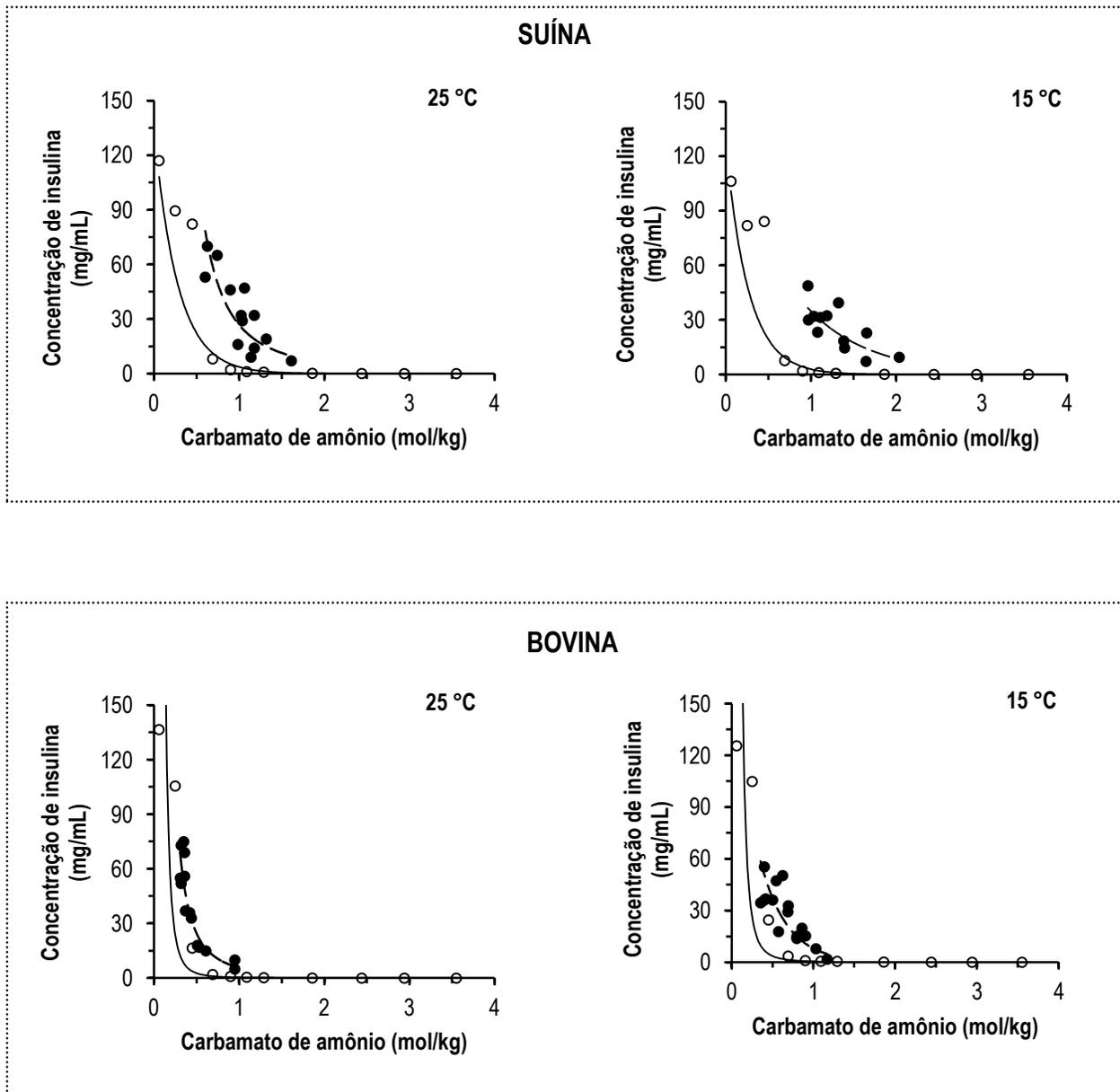
### 4.1 Determinação de diagramas de fases das proteínas nas temperaturas de 15 e 25 °C

Para a construção dos diagramas de fases das proteínas lisozima, insulinas suína e bovina determinaram-se as curvas de solubilidade e os limites de metaestabilidade nas temperaturas propostas. A zona metaestável não é bem definida (diferente da solubilidade que é uma propriedade termodinâmica bem estabelecida), mas sim uma faixa mais ou menos ampla dependendo da velocidade com a qual a metaestabilidade é atingida, especificando assim, a região de concentração em que a taxa de nucleação varia de imperceptível a muito rápida (CARPINETI e PIAZZA, 2004). Neste estudo, não se estudaram diferentes velocidades de adição de sal ou agitação. O carbamato de amônio foi adicionado manualmente gota a gota e, por se tratar de um sal volátil todos os tubos foram imediatamente vedados após a adição do agente precipitante, agitados em vortex e deixados em repouso por 24 h. Como discutido anteriormente, variações nos valores de pH também não foram realizadas devido a concentração do sal carbamato de amônio ser afetada pela adição de ácidos ou bases para alteração do valor de pH. O pH final das soluções das proteínas em carbamato de amônio foi de  $10,0 \pm 0,5$  independente da concentração de sal.

Os limites de metaestabilidade foram determinados por ensaios de “cloud-point” em função de diferentes concentrações de sal e proteína. Observa-se na Figura 4.1, pouca variação na zona metaestável para a lisozima em função da temperatura. Já para as insulinas suína e bovina, um leve deslocamento para a direita influenciado pelo aumento da temperatura pôde ser notado (Figura 4.2).



**Figura 4.1** – Diagrama de fases para a lisozima em carbamato de amônio a 25°C (a) e 15°C (b). (●) Limite de supersaturação e (○) solubilidade (linha como guia visual).



**Figura 4.2** – Diagrama de fases para as insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 25°C e 15°C. (●) Limite de supersaturação e (○) solubilidade (linha como guia visual).

O limite entre as zonas metaestável e instável tem uma definição termodinâmica e chama-se curva espinodal. Na prática, os limites de zonas metaestáveis são muito pequenos e variam em função das condições da substância (por exemplo, presença de impurezas) (SCHWARTZ E MYERSON, 2002). A zona

de metaestabilidade não é fixa e depende da taxa em que a supersaturação é criada, uso de agitação, sendo explicado pelo fenômeno de nucleação de natureza estocástica (GARCÍA-RUIZ, 2003). A dependência da localização do limite de metaestabilidade como função da taxa de resfriamento já havia sido observada por Nývlt (1983) para compostos inorgânicos. Yu *et al.* (2013) estudaram o efeito da temperatura e da velocidade de agitação na determinação do comprimento da zona metaestável para um ribonucleotídeo (5'-CMPNa<sub>2</sub>). Eles verificaram que a largura da região metaestável diminuiu com o aumento da velocidade de agitação e que a temperatura pouco afetou o limite de metaestabilidade. Lin *et al.* (2008) estudaram o efeito da temperatura no sucesso da cristalização de várias proteínas em função da mobilidade da curva de nucleação para diferentes temperaturas. Eles concluíram que a temperatura exerce diferentes efeitos para diferentes proteínas, sendo algumas delas facilmente cristalizadas a baixas temperaturas e outras em temperaturas maiores. Desse modo, a largura do limite de metaestabilidade é uma particularidade de cada sistema.

Watanabe *et al.* (2010) relataram que a lisozima apresentou solubilidade retrógrada em carbamato de amônio (maior solubilidade em temperaturas menores) nas concentrações de 3,55; 2,94; 2,44; 1,86; 1,29 e 0,69 mol/kg. Segundo os dados medidos (APÊNDICE 2), a lisozima apresentou tal comportamento para maiores concentrações de sal (3,55 a 1,86 mol/kg), concordando com os dados de Watanabe *et al.* (2010). Para essa faixa de concentração de sal, a solubilidade da lisozima variou de 0,096 a 0,945 mg/mL a 15 °C, enquanto que para 25 °C os valores foram de 0,033 a 0,780 mg/mL. Já para as menores concentrações de carbamato de amônio (1,29 a 0,06 mol/kg) a solubilidade dessa proteína aumentou com o aumento da temperatura. Os métodos para a determinação de tal parâmetro aqui relatado e o utilizado por Watanabe *et al.* (2010) foram diferentes, o que talvez, explica a diferença nos valores encontrados.

As insulinas suína e bovina tiveram comportamentos de solubilidade em função da temperatura diferentes entre si. Apesar de as proteínas serem similares e diferirem apenas em dois aminoácidos nas posições A8 e A10 da estrutura primária, a solubilidade da insulina bovina apresentou um comportamento retrógrado, enquanto que a insulina suína teve sua solubilidade aumentada com a temperatura para a faixa de sal estudada (3,55 a 0,06 mol/kg).

Dados de solubilidade para as insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 15 e 25 °C foram relatados por Lima (2006). Esse autor determinou a solubilidade através de ensaios de precipitação e o comportamento de “salting-out” foi observado para essas duas proteínas. A faixa de concentração de sal estudada foi diferente (1,0 a 4,0 mol/kg de carbamato para a insulina bovina e 2,0 a 3,5 mol/kg de

carbamato para a insulina suína) e a concentração inicial de proteína para os ensaios de precipitação foi de 5 mg/mL de insulina em tampão Tris-HCl 0,01 mol/L a pH 9,8 com NaCl 0,01 mol/L. Os valores de solubilidade diferem bastante em relação aos obtidos neste trabalho, provavelmente por causa do método adotado para a obtenção desses dados e do sistema tampão utilizado. Lima (2006) também concluiu que apesar das insulinas serem semelhantes, no que diz respeito a estrutura, massa molar, pl, o comportamento de solubilidade observado também foi diferente. A insulina suína apresentou solubilidade retrógrada no sistema estudado por Lima (2006), enquanto aqui, neste trabalho, foi a insulina bovina que apresentou esse comportamento.

Tashima (2007) também estudou a solubilidade da insulina suína próximo ao seu ponto isoelétrico na região ácida. Neste trabalho, a solubilidade da insulina suína em soluções aquosas com dióxido de carbono foi determinada em três diferentes temperaturas (5, 15 e 25 °C) mostrando um comportamento retrógrado.

A solubilidade retrógrada não é um fato incomum. Christopher *et al.* (1998) realizaram um estudo com 30 proteínas e avaliaram a dependência da solubilidade com a temperatura. A partir de seus resultados, concluíram que a solubilidade de 24 proteínas era afetada pela temperatura, das quais 13 apresentavam um aumento de solubilidade com a diminuição da temperatura.

Durante os ensaios de solubilidade para as três proteínas, observou-se o mesmo comportamento observado por Bernardo *et al.* (2005), que estudaram o comportamento polimórfico durante ensaios de dissolução da lisozima e da insulina suína a 25°C em diferentes valores de pH, fenômeno também observado por Hirata (2009) para a insulina suína em soluções aquosas com dióxido de carbono: a quantidade de proteína inicialmente adicionada à solução de carbamato de amônio se dissolveu quase totalmente e, após alguns dias a precipitação ocorreu. O aumento inicial da concentração da proteína seguido pela sua diminuição foi atribuído a uma mudança na estrutura cristalina ou do grau de cristalinidade.

Outro fato comum observado para as três proteínas foi o fenômeno de “salting-out”, em que houve uma diminuição da solubilidade com o aumento da concentração do sal. Esta dependência é consistente com a equação de Cohn (COHN, 1925), expressa em termos de concentração de sal:

$$\ln S = \beta - K'_S m_{sal} \quad (4.1)$$

onde  $S$  é a solubilidade da proteína em mg/mL,  $m_{sal}$  a concentração de sal em mol/kg,  $\beta$  e  $K'_s$  são parâmetros da Equação de Cohn.

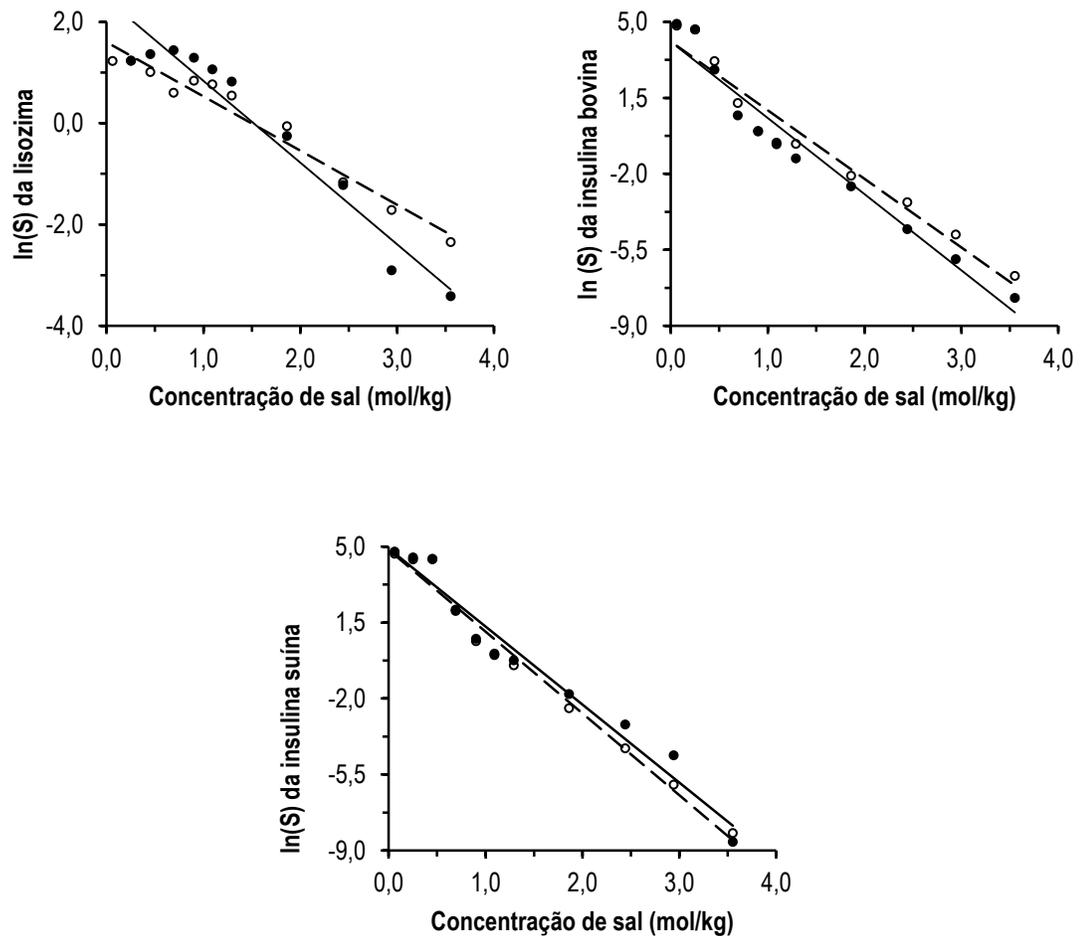
A constante  $\beta$  é dependente do pH e da temperatura enquanto a constante de “salting-out”  $K'_s$  é dependente da proteína e do tipo de sal, porém, segundo Trevino *et al.* (2008), a dependência de  $K'_s$  com a natureza da proteína é insignificante. A constante  $K'_s$  pode ser relacionada a interações eletrostáticas entre a proteína e o eletrólito. Segundo Melander e Horvath (1977), o conceito da série de Hofmeister e a equação de Cohn indicam a capacidade de o sal induzir a precipitação da proteína através da constante de “salting-out”: maior o  $K'_s$  mais efetivo é o sal.

Shiau e Chen (1997) avaliaram a influência da concentração inicial de proteína na precipitação por “salting-out” para quatro proteínas: lisozima, albumina bovina, amiloglucosidase e  $\alpha$ -quimotripsina. Nesse estudo, houve pouca variação dos parâmetros da equação de Cohn com a concentração inicial de proteína e nenhuma relação foi observada.

Shih *et al.* (1992) estudaram a solubilidade da lisozima,  $\alpha$ -quimotripsina e albumina de soro bovino em soluções aquosas de sal como função do pH, força iônica, natureza química do sal e concentração inicial da proteína. Para a lisozima, a solubilidade foi representada pela equação de Cohn e a efetividade dos sais estudados (sulfato, fosfato e cloreto) foi consistente com a série de Hofmeister. A constante  $\beta$  obtida por Shih *et al.* (1992) mostrou-se dependente do pH e sua variação foi pouco significativa para diferentes sais, soluções de sulfato e fosfato de sódio. Mas, para as soluções de cloreto de sódio esse parâmetro variou cerca de 30% em relação às soluções de sulfato e potássio de sódio. A constante  $K'_s$  para a lisozima foi maior para os íons sulfato e fosfato indicando uma maior capacidade de precipitação, para a mesma concentração de sal de acordo com a sequência: sulfato > fosfato > cloreto.

A correlação dos dados de solubilidade para as três proteínas aqui estudadas é apresentada na Figura 4.3 e os valores dos parâmetros  $\beta$  e  $K'_s$  estão na Tabela 4.1. Comparando os valores de  $\beta$  e  $K'_s$  da lisozima obtidos para o carbamato de amônio, observa-se que  $\beta$  variou com a temperatura (1,60 a 15 °C e 2,45 a 25 °C) e  $K'_s$  foi maior que o valor obtido para o cloreto de sódio, o sal menos efetivo na precipitação da lisozima no estudo de Shih *et al.* (1992). Para as insulinas suína e bovina,  $\beta$  não sofreu grandes variações com a temperatura e  $K'_s$  (em torno de 3,5) foi próximo para essas duas proteínas, mas relativamente alto, sugerindo que o carbamato de amônio possa ser efetivo no processo “salting-out” quando comparado aos outros sais. Watanabe (2004) estudou a precipitação de tripsina suína em carbamato de amônio e sulfato de amônio a 4°C. O valor de  $K'_s$  da tripsina em sal volátil foi distinto do

valor obtido neste trabalho para as três proteínas e o valor de  $\beta$  também foi diferente, talvez por depender da natureza da proteína e temperatura (4 °C). Os resultados de Watanabe (2004) indicaram uma baixa efetividade do sal volátil na precipitação de tripsina quando comparado ao sulfato de amônio.



**Figura 4.3** – Correlação da solubilidade das proteínas estudadas com a concentração de carbamato de amônio a 25 °C (●) e 15 °C (○) segundo a equação de Cohn (1925).

**Tabela 4.1** – Parâmetros da equação de Cohn (1925) para as proteínas em carbamato de amônio a diferentes temperaturas e para a lisozima a 25 °C em diferentes sais.

Parâmetros	Literatura					Este trabalho					
	Lisozima			Tripsina		Lisozima		Insulina suína		Insulina bovina	
	25 °C <sup>1</sup>			4 °C <sup>2</sup>		15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
$K'_s$ (kg/mol)	0,447 <sup>a</sup>	2,38 <sup>b</sup>	2,095 <sup>c</sup>	0,78 <sup>d</sup>	0,25 <sup>e</sup>	1,07	1,61	3,77	3,59	3,16	3,51
$\beta$	0,903 <sup>a</sup>	3,71 <sup>b</sup>	3,77 <sup>c</sup>	2,62 <sup>d</sup>	2,96 <sup>e</sup>	1,60	2,45	4,84	4,90	4,09	4,08

1 – dados de Shih *et al.* (1992).

2 – dados de Watanabe (2004).

a – solução aquosa de cloreto de sódio a pH 9,0.

b – solução aquosa de sulfato de sódio a pH 9,0.

c – solução aquosa de fosfato de sódio a pH 8,0.

d – solução aquosa de sulfato de amônio a pH 5,4.

e – solução aquosa de carbamato de amônio a pH  $\approx$  10,0.

#### 4.2 Determinações experimentais do parâmetro termodinâmico $B_{22}$

Para a determinação do parâmetro  $B_{22}$  foram testadas inicialmente duas técnicas, osmometria de membranas e o espalhamento de luz e, assim, seria feita a seleção do melhor método para os sistemas escolhidos neste estudo. No entanto, testes preliminares permitiram avaliar e reconsiderar as concentrações de sal inicialmente propostas (0,69; 1,29; 1,86; 2,44; 2,94 e 3,56 mol/kg) devido à baixa solubilidade das proteínas nas concentrações de carbamato de amônio de 1,86 a 3,56 mol/kg, as concentrações de sal utilizadas neste estudo foram menores: 0,06; 0,25; 0,45; 0,69; 0,90; 1,09 e 1,29 mol/kg.

No que diz respeito à osmometria, esperava-se que, para essas concentrações salinas mais baixas e com o uso de membrana de massa molar de corte menor que o padrão do equipamento, seria possível determinar o valor de  $B_{22}$ . Entretanto, por limitações de solubilidade, os valores medidos de pressão osmótica se encontravam no limite da precisão do aparelho, ou seja, praticamente não houve nenhuma variação desse parâmetro em função da concentração de lisozima. A proteína albumina de soro bovino, por possuir uma alta solubilidade, também foi testada em concentrações maiores de proteína em sal volátil (5 a 30 mg/mL), porém a variação da pressão osmótica também não foi significativa, o que sugere que o sal possa ter influenciado nas medidas, talvez por apresentar algum tipo de interação com o material da membrana (celulose regenerada e polietersulfona). Os resultados de alguns dos testes, para fins ilustrativos, são mostrados na Tabela 4.2.

Desse modo, a osmometria de membranas não serviu aos propósitos deste trabalho e os dados de  $B_{22}$  foram obtidos por espalhamento de luz estático (SLS) e por cromatografia de auto-interação (SIC). Como o equipamento disponível para a realização das cromatografias não possui controle de temperatura, as medidas foram realizadas apenas a 25 °C (temperatura ambiente).

#### 4.2.1 Ensaios de SLS para as soluções aquosas de proteína em carbamato de amônio a 15 e 25 °C

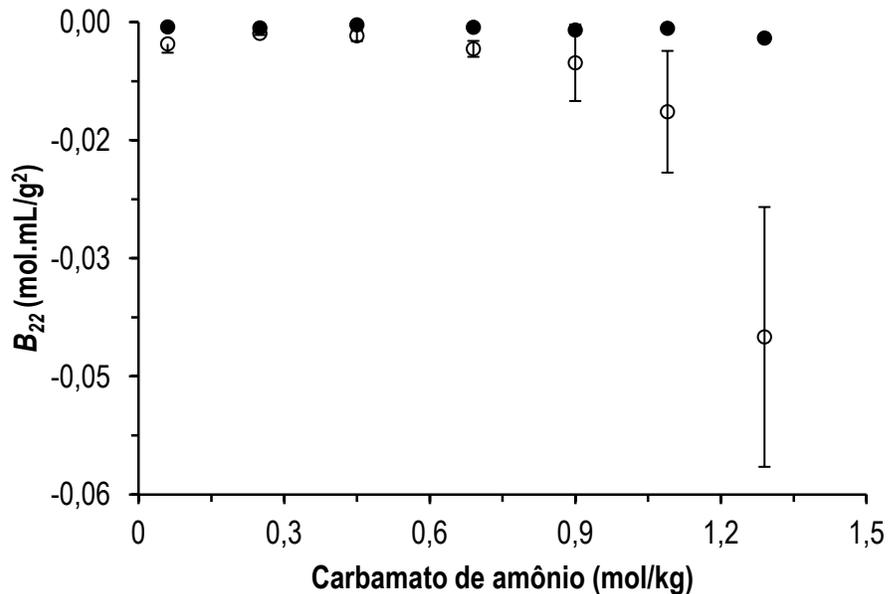
Os resultados dos parâmetros e propriedades obtidos para a determinação por SLS do  $B_{22}$  a 15 e 25 °C para as concentrações de sal de 0,06 a 1,29 mol/kg encontram-se no Apêndice 2. Como descrito no item 2.3.2, um gráfico de  $Kc/R$  versus  $c$  lineariza os dados de espalhamento de luz e a partir da inclinação da curva, o valor de  $B_{22}$  é encontrado (Equação 2.6).

**Tabela 4.2** - Pressão osmótica para lisozima em carbamato de amônio a 25 °C.

Carbamato de amônio (mol/kg)	Concentração de lisozima (mg/mL)	Pressão osmótica* (mmHg)
0,69	1,93	1,2 ± 0,1
	3,66	1,5 ± 0,1
	5,28	1,5 ± 0,1
	6,74	1,6 ± 0,1
	10,06	1,4 ± 0,1
1,29	1,69	1,6 ± 0,1
	3,42	1,6 ± 0,2
	5,08	2,0 ± 0,4
	6,65	1,2 ± 0,3

\* dados da pressão osmótica (valor médio para N=3).

O comportamento do parâmetro termodinâmico para a lisozima em função da concentração de carbamato de amônio é mostrado na Figura 4.4. Os valores de  $B_{22}$  encontram-se em uma faixa mais ampla do que a “janela de cristalização” estabelecida por George e Wilson (1994) ( $-1 \times 10^{-4}$  a  $-8 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup>), variando de  $-20,4 \times 10^{-4}$  a  $-3,6 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para 25 °C e de  $-400 \times 10^{-4}$  a  $-14,4 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para 15 °C.



**Figura 4.4** – Efeito da concentração de sal volátil no valor de  $B_{22}$  para o sistema lisozima/carbamato de amônio a 25 °C (●) e 15 °C (○).

Apesar de a lisozima ser uma proteína geralmente muito solúvel em alguns sistemas, ela apresenta baixa solubilidade nas maiores concentrações de carbamato de amônio, fato confirmado por valores de  $B_{22}$  altamente negativos que refletem uma forte interação atrativa entre as moléculas de proteína e, conseqüentemente, favorecem a precipitação. Quanto maior a força iônica da solução de sal volátil menor é o valor do  $B_{22}$  e maior é o efeito “salting-out”. Logo, isso classifica o carbamato de amônio como um “mau” solvente para a lisozima, fato comprovado experimentalmente por Lima (2006), Watanabe *et al.* (2006), Watanabe *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2010), de modo que esse sal volátil pode ser utilizado como agente precipitante.

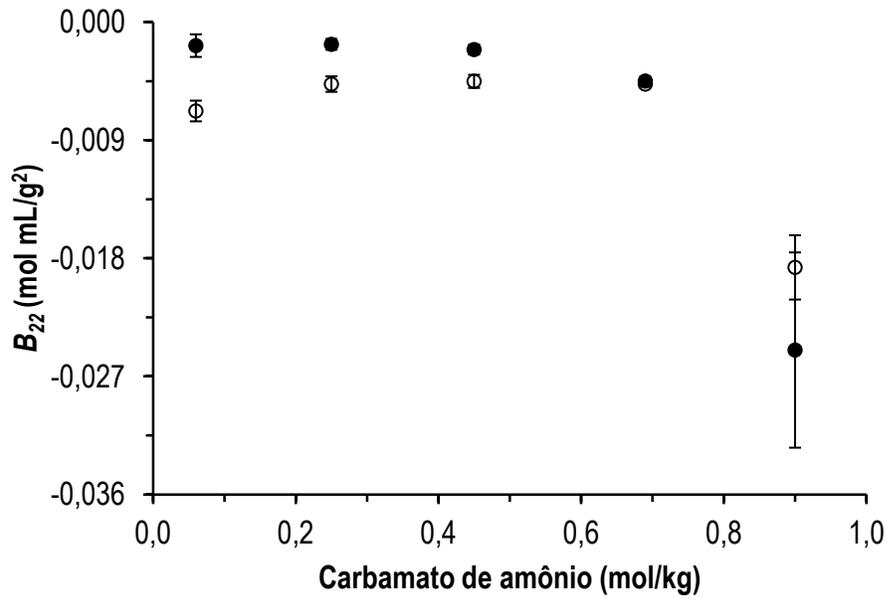
Outro fator que contribui para a baixa solubilidade da lisozima, refletida pelo valor negativo de  $B_{22}$ , é o pH da solução de carbamato de amônio (9,5) muito próximo de seu ponto isoelétrico (11,0) no qual a repulsão eletrostática entre as moléculas é mínima.

No entanto, o valor de  $B_{22}$  implica não somente na capacidade ou não de cristalização da proteína, mas também na influência de diferentes tipos de sais no comportamento da proteína em solução. Dumetz *et al.* (2007) estudaram sete proteínas (ovoalbumina, ribonuclease A, albumina de soro bovino,  $\alpha$ -lactoalbumina, mioglobina, citocromo c e catalase) em diferentes sistemas a pH 7,0 para compreender o

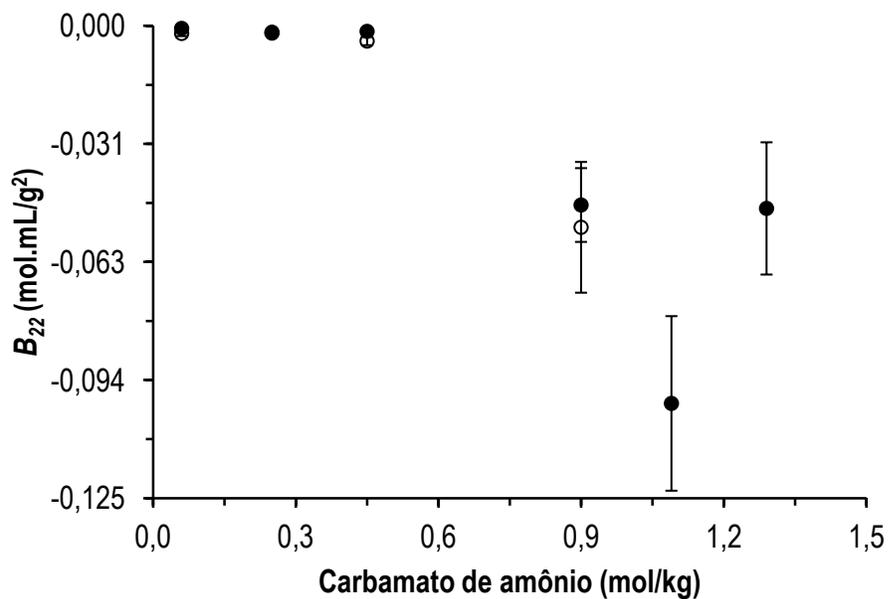
efeito do sal nas interações proteína-proteína. A tendência do  $B_{22}$  foi completamente diferente para cada sal estudado: com o sulfato de amônio os valores de  $B_{22}$  caíram drasticamente com o aumento da concentração salina, enquanto que para o cloreto de sódio o valor permaneceu praticamente constante para todas as sete proteínas estudadas. Esses resultados estão de acordo com a série de Hofmeister (1888) que classifica a capacidade que cátions e ânions têm em precipitar uma proteína.

Por se tratar de um sal volátil, a avaliação do carbamato de amônio foi realizada apenas no pH 9,5 (pH da solução) próximo ao pI da proteína. Dessa maneira, apesar de a lisozima ser uma proteína bastante estudada não é possível comparar os valores de  $B_{22}$ , na presença de carbamato de amônio. Devido à proximidade do pH da solução com o pI da proteína, a literatura consultada não apresenta dados para valores de pH  $\geq 9,5$ . Talvez, por essa particularidade da solução, a precipitação da proteína seja favorecida independente do valor de  $B_{22}$  encontrado para as diferentes condições testadas.

O comportamento do  $B_{22}$  para as insulinas suína e bovina em função da concentração de carbamato de amônio (Figuras 4.5 e 4.6) é semelhante ao apresentado para lisozima. Para a insulina suína os valores de  $B_{22}$  a 25 °C variaram de  $-250 \times 10^{-4}$  a  $-17 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup>, enquanto que para 15 °C os valores de  $B_{22}$  foram de  $-187 \times 10^{-4}$  a  $-45,2 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para as concentrações de sal de 0,90 a 0,06 mol/kg em ambas as temperaturas. Já para a insulina bovina os valores de  $B_{22}$  a 25 °C variaram de  $-474 \times 10^{-4}$  a  $-6,7 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para 0,90 a 0,06 mol/kg, enquanto que para 15 °C os valores de  $B_{22}$  foram de  $-533 \times 10^{-4}$  a  $-16,7 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para 0,90 a 0,06 mol/kg. O efeito da temperatura no comportamento do parâmetro  $B_{22}$  é menos pronunciado do que a concentração de sal (para as insulinas praticamente não houve influência da temperatura). Ao contrário do que foi obtido aqui, Bonneté *et al.* (1999) verificaram que a temperatura apresenta certa influência no valor de  $B_{22}$  para menores concentrações de força iônica, porém para um mesmo valor de  $B_{22}$  para diferentes tipos de sal, a força iônica variou largamente, destacando novamente a importância do tipo de sal na precipitação. Outros autores também estudaram o efeito da temperatura no  $B_{22}$ . Valente *et al.* (2005) observaram um aumento no valor de  $B_{22}$  com o aumento da temperatura que poderia estar correlacionado ao aumento da solubilidade com a temperatura, mas Antipova *et al.* (1999) encontraram o efeito contrário, argumentando que com o aumento da temperatura, as proteínas podem ficar parcialmente desnoveladas, expondo suas regiões hidrofóbicas que levariam a interações mais atrativas.



**Figura 4.5** – Efeito da concentração de sal volátil no valor de  $B_{22}$  medido por SLS para o sistema insulina suína/carbamato de amônio a 25 °C (●) e 15 °C (○).



**Figura 4.6** – Efeito da concentração de sal volátil no valor de  $B_{22}$  medido por SLS para o sistema insulina bovina/carbamato de amônio a 25 °C (●) e 15 °C (○).

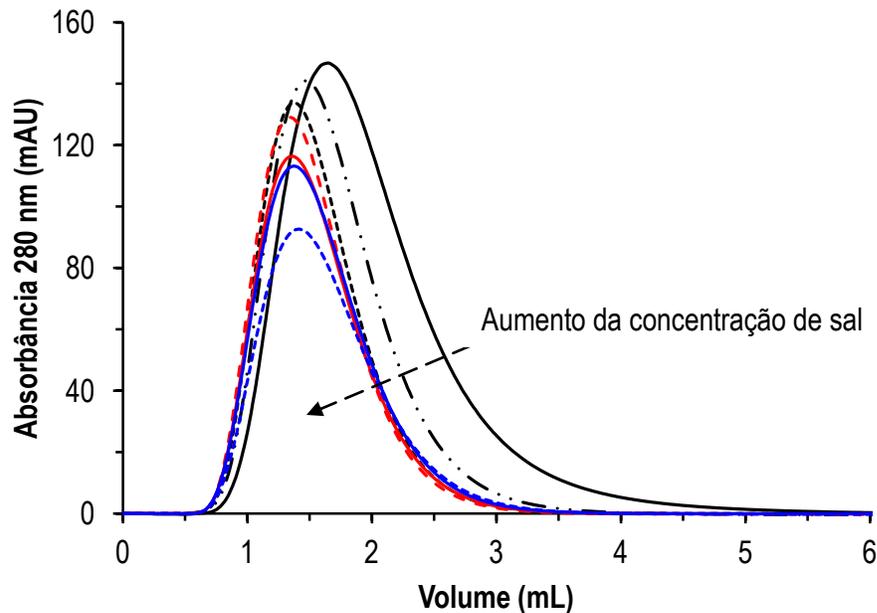
Uma diminuição do valor de  $B_{22}$  em função do aumento da concentração do sal é típico do comportamento de “salting-out” em que os íons salinos sequestram as moléculas de água e evitam que elas formem pontes de hidrogênio com a superfície da proteína. Conseqüentemente, as proteínas acabam tendo interações intermoleculares que resultam na atração proteína-proteína (COLLINS, 2004; CURTIS e LUE, 2006). Moon *et al.* (2000) estudaram as interações proteína-proteína para a lisozima e a BSA em soluções aquosas de sulfato de amônio em diferentes valores de pH e concentrações de sal. Para a lisozima, a diminuição do valor de  $B_{22}$  com o aumento da concentração de sal foi atribuído a interações hidrofóbicas e à desidratação da superfície polar da proteína. Já para a BSA as interações foram repulsivas, sendo concluído por aqueles autores que as forças de hidratação (forças entre as superfícies carregadas e hidrofílicas das moléculas de proteína) influenciaram nas interações, devido à superfície dessa proteína ser mais hidrofílica.

A efetividade de sais no processo de “salting-out” de proteínas depende muito do tipo de sal e a eficácia dos ânions segue a série de Hofmeister de acordo com a carga dessas macromoléculas em solução. Quando o pH da solução é maior que o pI da proteína (caso das insulinas suína e bovina em carbamato de amônio), estando as moléculas com carga líquida negativa, o comportamento de “salting-out” é observado de acordo com a posição do íon na série direta de Hofmeister. Já para proteínas carregadas positivamente (caso da lisozima cujo pI 11 está acima do pH da solução de carbamato, 9,50) a ordem inversa da série é válida, mas apenas para concentrações de sais monovalentes menores que 0,2 mol/L (ZHANG e CREMER, 2009; BÖSTROM *et al.*, 2011). O íon carbamato não está classificado nessa série, mas grandes ânions monovalentes (caso do carbamato) são menos hidratados do que os ânions divalentes, sendo chamados íons caotrópicos (RIES-KAUTT e DUCRUIX, 1989; FONSECA *et al.*, 2006; SILVA, 2008; ZHANG e CREMER, 2010). Ânions com carga dupla têm maior efeito “salting-out” que ânions monovalentes, sendo esse efeito mais influenciado pelo cátion do que pelo ânion, segundo Görgényi *et al.* (2006). Desse modo, uma explicação provável para a capacidade precipitante do carbamato de amônio é que o cátion amônio tenha promovido a precipitação das proteínas, ainda que o ânion carbamato não fosse um bom agente precipitante, de acordo com a série de Hofmeister. Além disso, existe uma pequena quantidade de íons carbonato em solução (BALDWIN, 1996; SILVA, 2008).

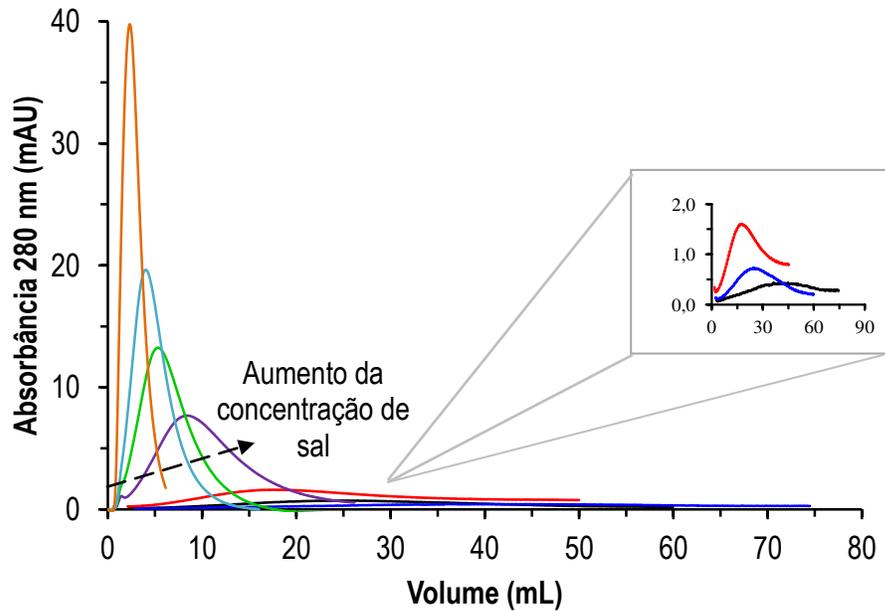
#### 4.2.2 Ensaio de SIC para as soluções aquosas de proteína em carbamato de amônio a 15 e 25 °C

O método desenvolvido por Tessier *et al.* (2002a) para a determinação do parâmetro  $B_{22}$  tem como vantagens a redução da quantidade de proteína e tempo utilizados na sua determinação. Conforme discutido no item 2.3.3 a partir das Equações 2.8 a 2.10, os volumes de retenção das cromatografias (Figuras 4.7 a 4.9) foram obtidos e os valores de  $B_{22}$  calculados. Os parâmetros necessários para o cálculo do valor de  $B_{22}$  para a lisozima e as insulinas suína e bovina a 25 °C são mostrados na Tabela 4.3 e os valores de  $B_{22}$  na Tabela 4.4.

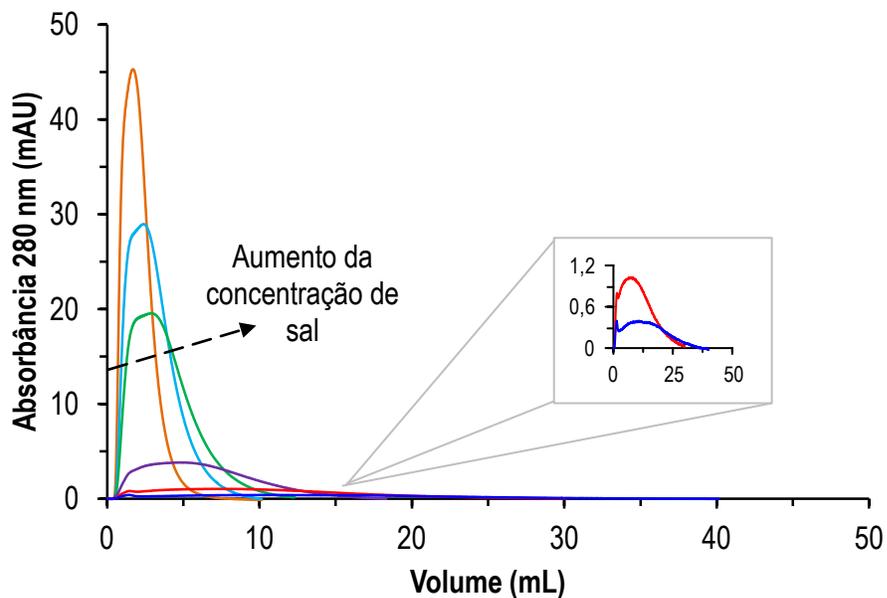
Os perfis de eluição para as proteínas lisozima e insulinas suína e bovina nas condições estudadas (0,06 a 1,29 mol/kg de carbamato de amônio) são mostrados nas Figuras 4.7 a 4.9. Para a lisozima, o aumento da concentração de sal teve pouco efeito no volume de retenção da amostra, diferentemente do comportamento das insulinas. Os volumes de retenção das insulinas suína e bovina foram maiores para as concentrações de sal mais altas, o que reflete uma maior intensidade da interação entre a proteína imobilizada e a proteína presente na fase móvel.



**Figura 4.7** – Perfis de eluição obtidos por SIC a 25 °C para a lisozima em função da concentração de carbamato de amônio (em mol/kg): 0,06 (—), 0,25 (---), 0,45 (----), 0,69 (-----), 0,90 (— · —), 1,09 (— · —) e 1,29 (— · — · —). Concentração das amostras injetadas (mg/mL): 3,15 (—), 2,15 (---), 2,05 (----), 1,95 (-----), 1,85 (— · —), 1,80 (— · —) e 1,55 (— · — · —).



**Figura 4.8** - Perfis de eluição obtidos por SIC a 25 °C para a insulina suína em função da concentração de carbamato de amônio (em mol/kg): 0,06 (—), 0,25 (—), 0,45 (—), 0,69 (—), 0,90 (—), 1,09 (—) e 1,29 (—). Concentração das amostras injetadas (mg/mL): 3,75 (—), 3,25 (—), 3,15 (—), 3,05 (—), 0,90 (—), 0,60 (—) e 0,30 (—).



**Figura 4.9** - Perfis de eluição obtidos por SIC a 25 °C para a insulina bovina em função da concentração de carbamato de amônio (em mol/kg): 0,06 (—), 0,25 (—), 0,45 (—), 0,69 (—), 0,90 (—) e 1,09 (—). Concentração das amostras injetadas (mg/mL): 3,85 (—), 3,65 (—), 3,35 (—), 1,30 (—), 0,60 (—), 0,30 (—).

**Tabela 4.3** – Parâmetros utilizados no cálculo do valor de  $B_{22}$  para as proteínas lisozima e insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 25 °C através da cromatografia de auto-interação.

Descrição dos parâmetros	Lisozima	Insulina suína	Insulina bovina
massa de proteína/volume de partícula <sup>a</sup> (mg/mL)	15,06	7,66	37,30
volume de vazios da coluna/volume de partícula empacotada <sup>b</sup>	0,84	0,84	0,84
$\Phi$ - área superficial acessível/volume de fase móvel <sup>c</sup> (m <sup>2</sup> /mL)	42,5	43,7	43,6
$\rho_s$ - moléculas de proteína/área superficial acessível <sup>d</sup> (moléculas/m <sup>2</sup> )	$1,78 \cdot 10^{16}$	$2,17 \cdot 10^{16}$	$10,7 \cdot 10^{16}$
$\Phi$ - área superficial acessível/volume de fase móvel <sup>c</sup> (m <sup>2</sup> /mL)	32,3	36,2	35,8
$B_{HS}$ - volume excluído <sup>e</sup> (cm <sup>3</sup> )	$6,24 \cdot 10^{-20}$	$2,62 \cdot 10^{-20}$	$2,86 \cdot 10^{-20}$

a – determinado experimentalmente.

b – valores obtidos a partir dos dados de DePhillips e Lenhoff (2000) para a agarose.

c – valores obtidos por interpolação a partir dos dados de DePhillips e Lenhoff (2000).

d – valores calculados (massa de proteína/volume de partícula pela porosidade e razão de fase).

e –  $d = 3,11$  nm para a lisozima e  $d = 2,32$  para a insulina suína ( $d$  é o diâmetro da proteína calculado a partir do volume molecular, Connolly, 1993; Neal e Lenhoff, 1995).

**Tabela 4.4** – Dados experimentais da SIC para a determinação e valores de  $B_{22}$  correspondentes para a lisozima e para as insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 25 °C.

Carbamato de amônio (mol/kg)	Lisozima		Insulina suína		Insulina bovina	
	$k'$	$B_{22} \times 10^4$ (mol.mL/g <sup>2</sup> )	$k'$	$B_{22} \times 10^4$ (mol.mL/g <sup>2</sup> )	$k'$	$B_{22} \times 10^4$ (mol.mL/g <sup>2</sup> )
1,29	0,15	$-5,53 \pm 0,24$	26,74	$-6130 \pm 277$	-	-
1,09	0,16	$-6,43 \pm 0,00$	21,09	$-4830 \pm 361$	6,44	$-303 \pm 32$
0,90	0,15	$-5,85 \pm 0,25$	14,4	$-2100 \pm 687$	4,84	$-226 \pm 13$
0,69	0,14	$-5,12 \pm 0,44$	5,55	$-1270 \pm 84$	2,80	$-129 \pm 19$
0,45	0,17	$-6,79 \pm 0,51$	3,35	$-763 \pm 36$	1,31	$-57,5 \pm 2,5$
0,25	0,21	$-9,04 \pm 1,57$	2,30	$-523 \pm 40$	0,94	$-39,7 \pm 2,7$
0,06	0,16	$-6,65 \pm 1,89$	0,90	$-201 \pm 11$	0,38	$-12,9 \pm 0,3$

\*  $k'$  - fator de retenção médio para N=3 (triplicata).

A lisozima apresenta pouca variação da solubilidade em função da concentração de carbamato de amônio (2,28 a 7,51 mg/mL) o que reflete pouca variação nos valores de  $B_{22}$  já que a solubilidade também

é resultado de uma interação entre as moléculas de proteína. As insulinas suína e bovina possuem uma ampla faixa de solubilidade no sistema estudado (de 0,8 a 117 mg/mL para a insulina suína e 0,28 a 136,6 mg/mL para a insulina bovina). Porém, mesmo com altos valores de solubilidade para concentrações de sal relativamente baixas, o valor de  $B_{22}$  foi negativo (de  $-6.130 \times 10^{-4}$  a  $-201 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para a insulina suína e  $-303 \times 10^{-4}$  a  $-12,9 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para a insulina bovina), o que teoricamente indica uma forte atração entre as moléculas de proteína nas soluções de carbamato de amônio. Esse sistema ainda não foi relatado em estudos anteriores, mas os resultados estão de acordo com a literatura em relação à tendência do  $B_{22}$ , menores valores de  $B_{22}$  para maiores concentrações de sal. No entanto, valores muito negativos, como os obtidos neste trabalho, sugerem a ocorrência da precipitação ou formação de “praggs” (agregados que provavelmente resultarão em precipitados). Assim, a cristalização de insulina suína e insulina bovina com esse sal volátil, de acordo com a “janela de cristalização” de George e Wilson (1994), talvez não seja favorecida nas condições de temperatura, pH e concentrações de sal analisadas.

#### **4.3 Ensaios de cristalização/precipitação das proteínas com sal volátil a 15 e 25 °C**

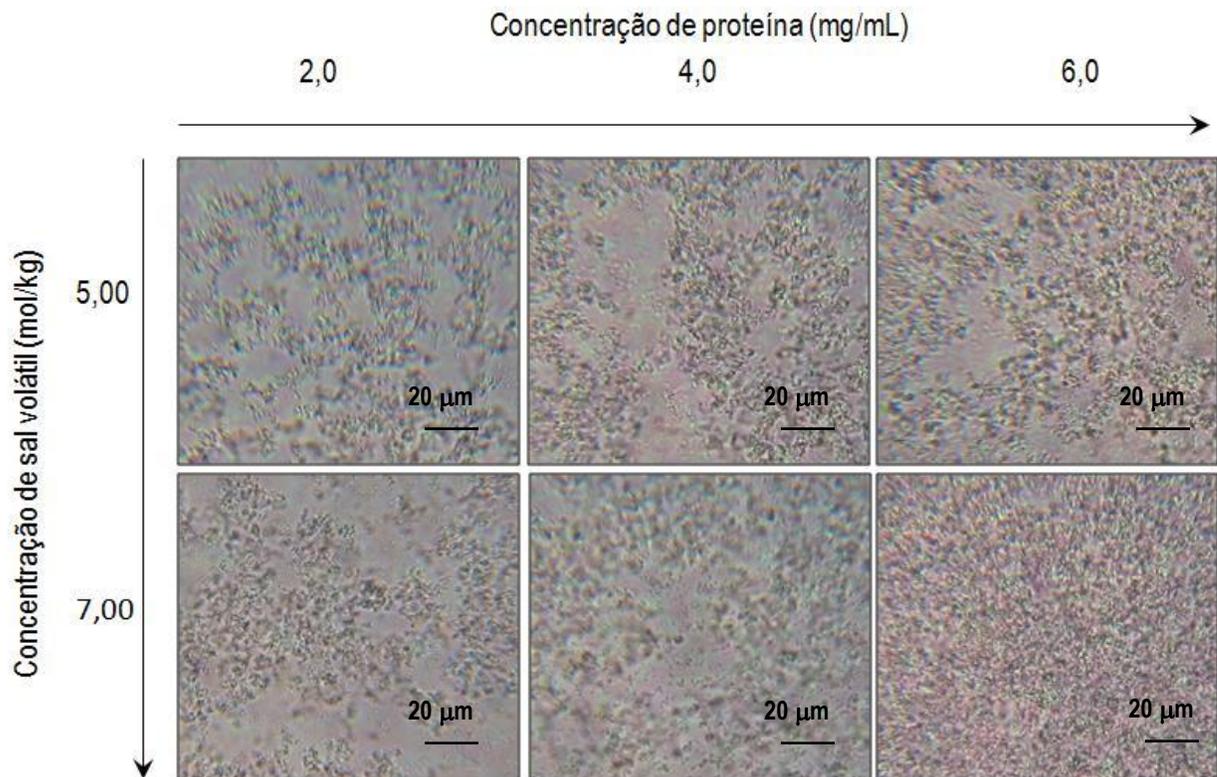
##### **4.3.1 Ensaios preliminares para verificação da cristalização de insulina suína com sal volátil a 15 °C**

Os ensaios preliminares aqui reportados foram realizados apenas com a insulina suína para verificar a viabilidade da sua cristalização em sal volátil, pois não há relatos de cristalização de proteínas em carbamato de amônio. Esses foram os primeiros ensaios realizados neste trabalho e os resultados positivos descritos a seguir é que validaram o carbamato de amônio como agente de cristalização e o sal a ser usado neste estudo.

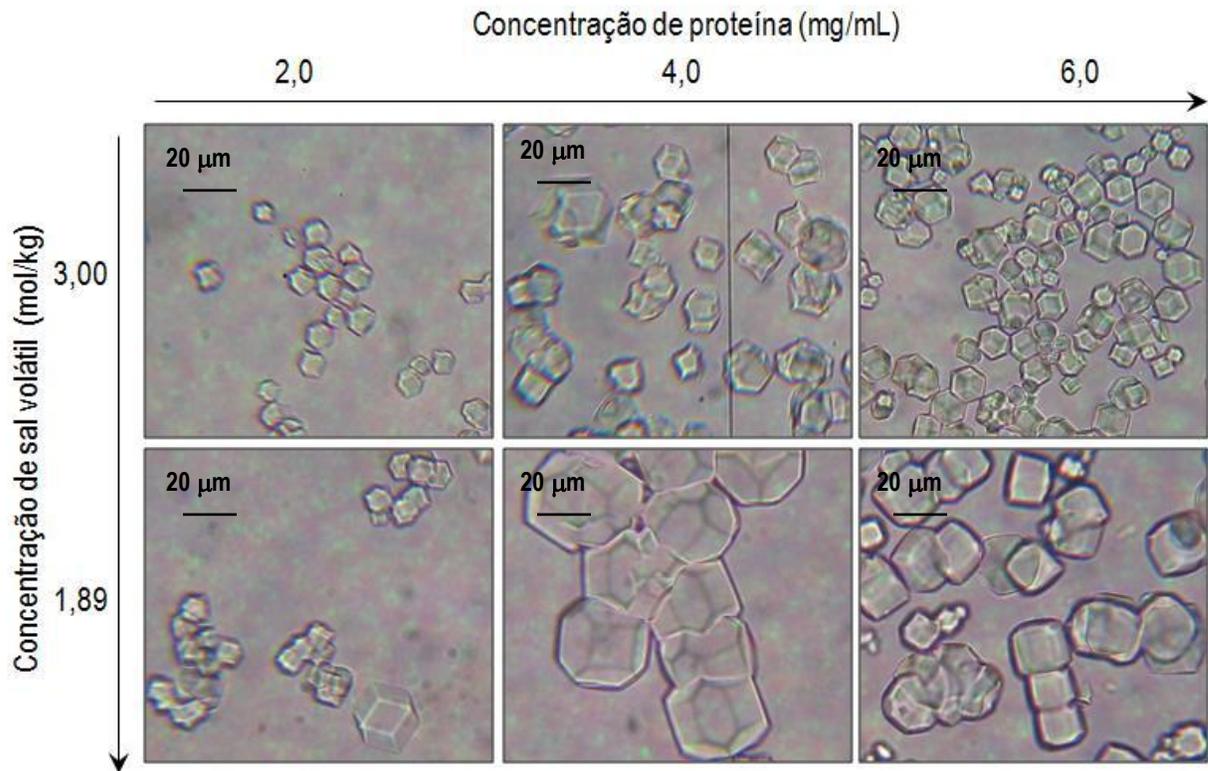
Sabe-se da literatura que cristais de insulina são obtidos na faixa de pH 6,0 a 6,5 na presença de cátions divalentes (CROWFOOT, 1935; SCHLICHTKRULL, 1956; LADISCH, 2001). A formação da unidade cristalina da insulina suína, conhecida como hexâmero, é favorecida para valores de pH em torno de 6,0 e na presença de zinco. Para pH maior que 8,0 a dissociação da insulina e do zinco torna-se predominante (BLUNDELL *et al.*, 1972). Assim, não foi adicionado zinco aos ensaios de cristalização de insulina realizados neste trabalho, pois o pH da solução de carbamato de amônio é próximo de 10,0.

Nos ensaios preliminares, foram testadas diferentes concentrações de carbamato de amônio entre 1,0 a 7,0 mol/kg a 15 °C. As concentrações iniciais de proteína foram 2,0; 4,0 e 6,0 mg/mL. Para as concentrações de sal de 5,0 e 7,0 mol/kg, independente da concentração inicial de insulina suína, não houve a formação de cristais visíveis e bem definidos, apenas precipitados (Figura 4.10). Cristais foram

obtidos nas concentrações de 1,89 e 3,0 mol/kg (Figura 4.11) e de 1,26 e 2,0 mol/kg (dados não apresentados) para as quais houve formação de cristais apenas para a maior concentração de proteína (6 mg/mL). Para a concentração de 1,0 mol/kg a solução permaneceu límpida para as três concentrações de proteína analisadas. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio com volume de 10 mL para cada condição testada. Todos os ensaios foram mantidos à temperatura constante de 15 °C em banho termostático e em repouso por 72 horas. Os dados apresentados neste trabalho são inéditos para a cristalização de proteína em sal volátil, pois não foram encontrados relatos de cristalização de insulina suína em carbamato de amônio.



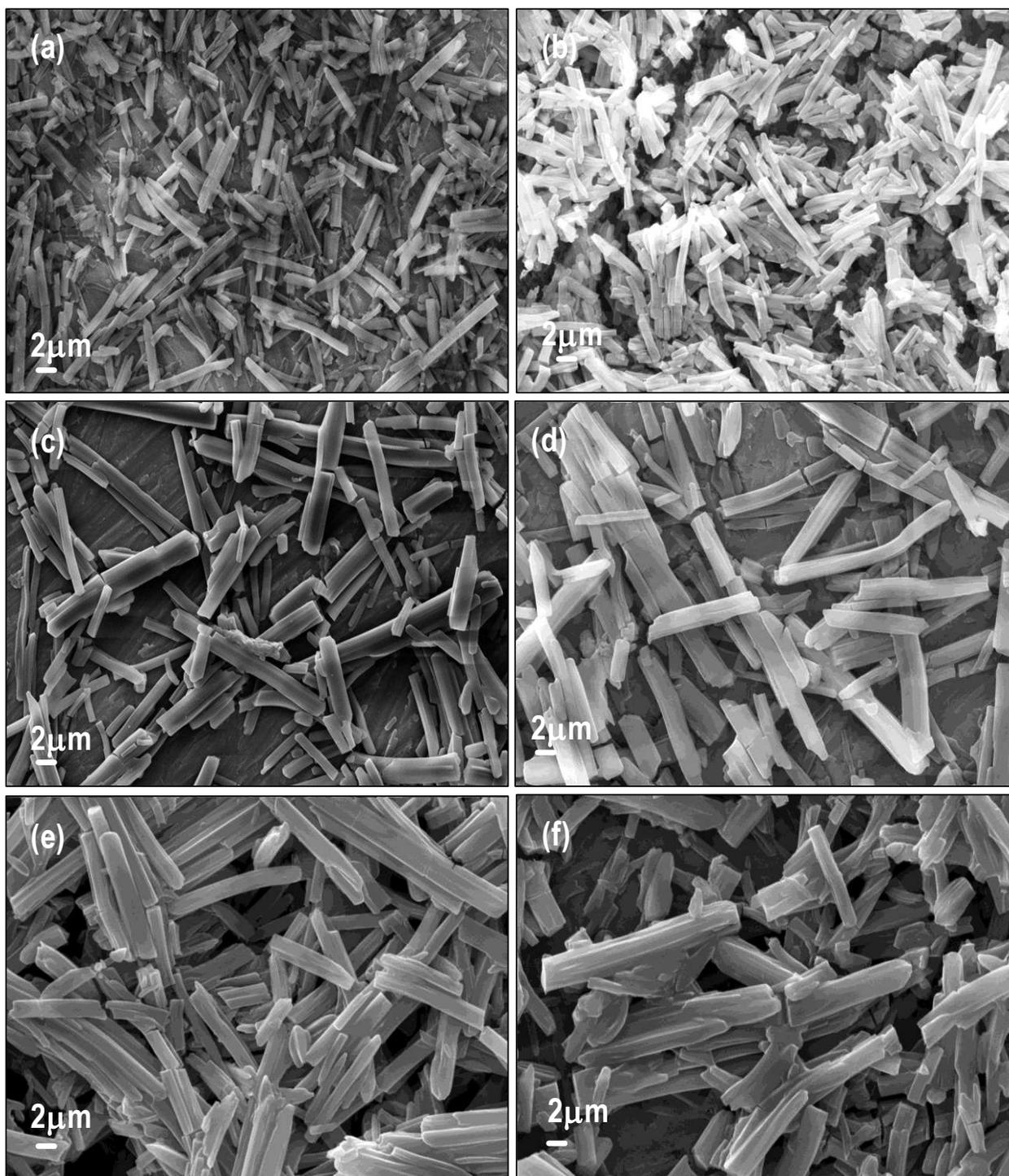
**Figura 4.10** – Fotomicrografias de precipitados de insulina suína em carbamato de amônio a 15°C (ampliação de 400x).



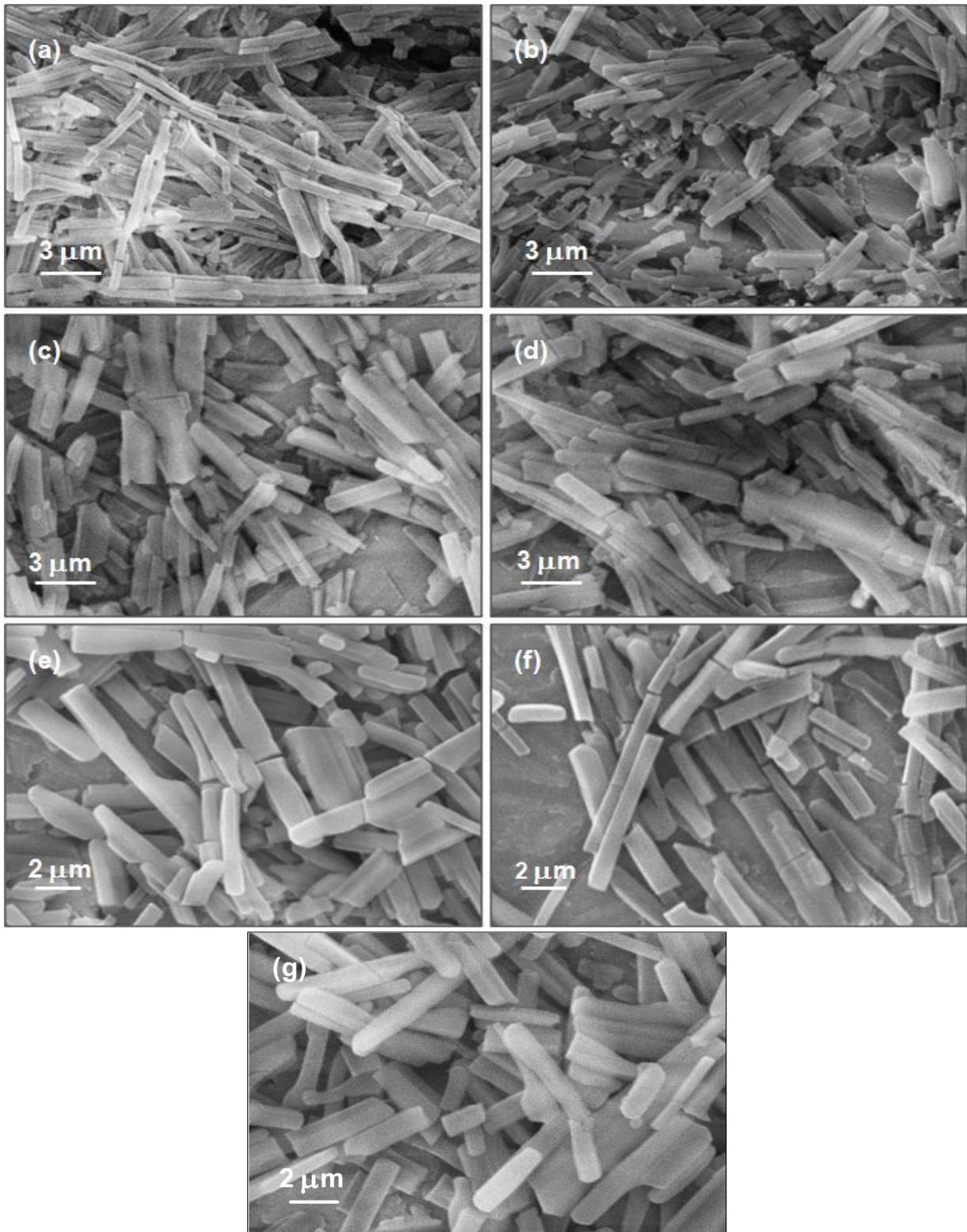
**Figura 4.11** – Fotomicrografias de cristais de insulina suína em carbamato de amônio a 15 °C (ampliação de 400x).

#### 4.3.2 Ensaio de cristalização/precipitação com sal volátil nas condições de medição do parâmetro $B_{22}$

O objetivo destes ensaios foi analisar conjuntamente os valores de  $B_{22}$ , as fases sólidas das proteínas lisozima e insulinas suína e bovina em sal volátil e a janela de cristalização estabelecida por George e Wilson (1994) para os sistemas às temperaturas de 15 e 25 °C. Para a lisozima houve a cristalização em todas as condições testadas, observando-se que a 25 °C (Figura 4.12) os cristais foram maiores quando comparados aos cristais obtidos a 15 °C (Figura 4.13). Avaliando os valores de  $B_{22}$  obtidos para ambas as temperaturas, verificou-se que a 25 °C ( $-20,4 \times 10^{-4}$  a  $-3,6 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para SLS e  $-9,04 \times 10^{-4}$  a  $-5,12 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para SIC) os seus valores foram mais próximos da “janela de cristalização” do que os valores a 15 °C ( $-400 \times 10^{-4}$  a  $-14,4 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para SLS).



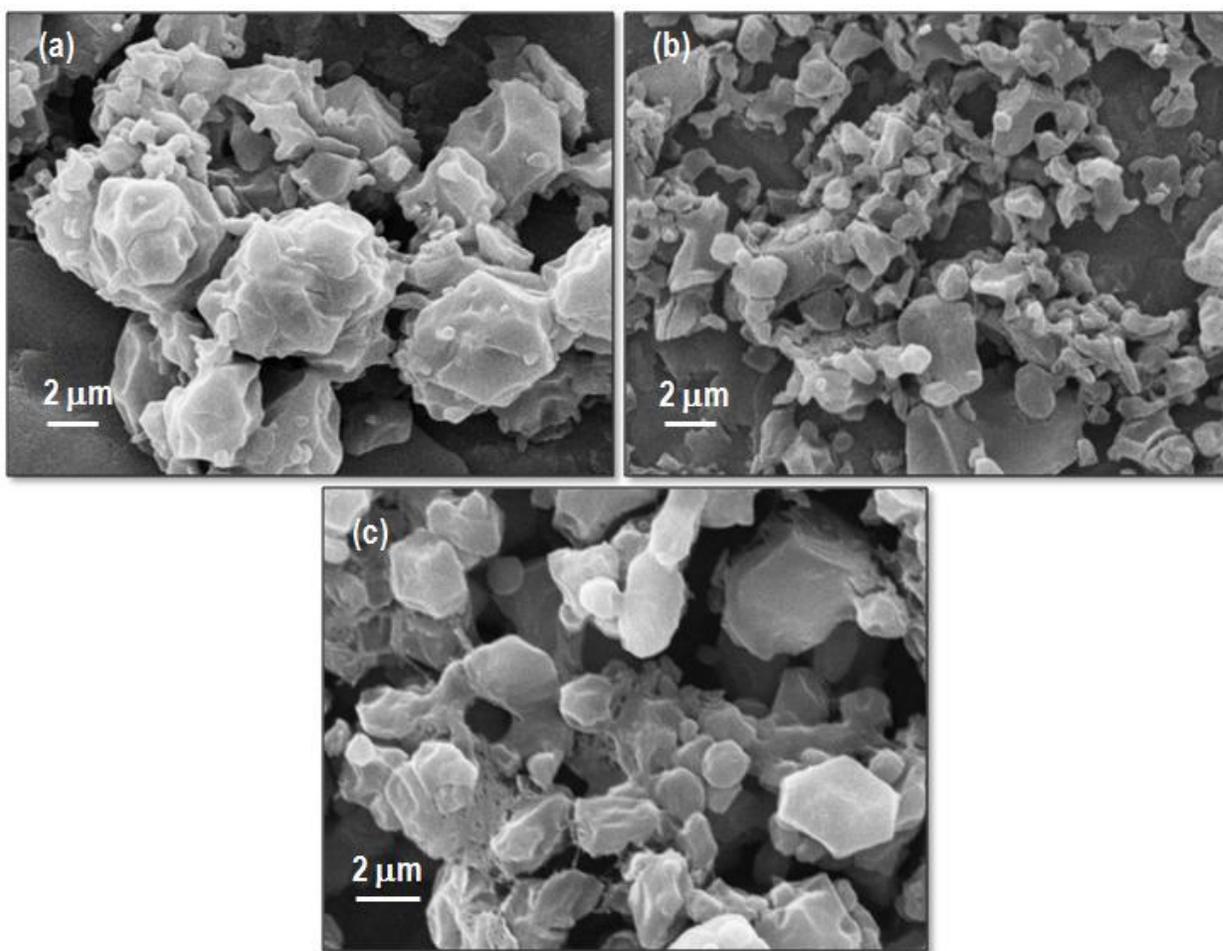
**Figura 4.12** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos cristais de lisozima obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 25 °C: 1,29 (a), 1,09 (b), 0,90 (c), 0,69 (d), 0,45 (e) e 0,25 (f).



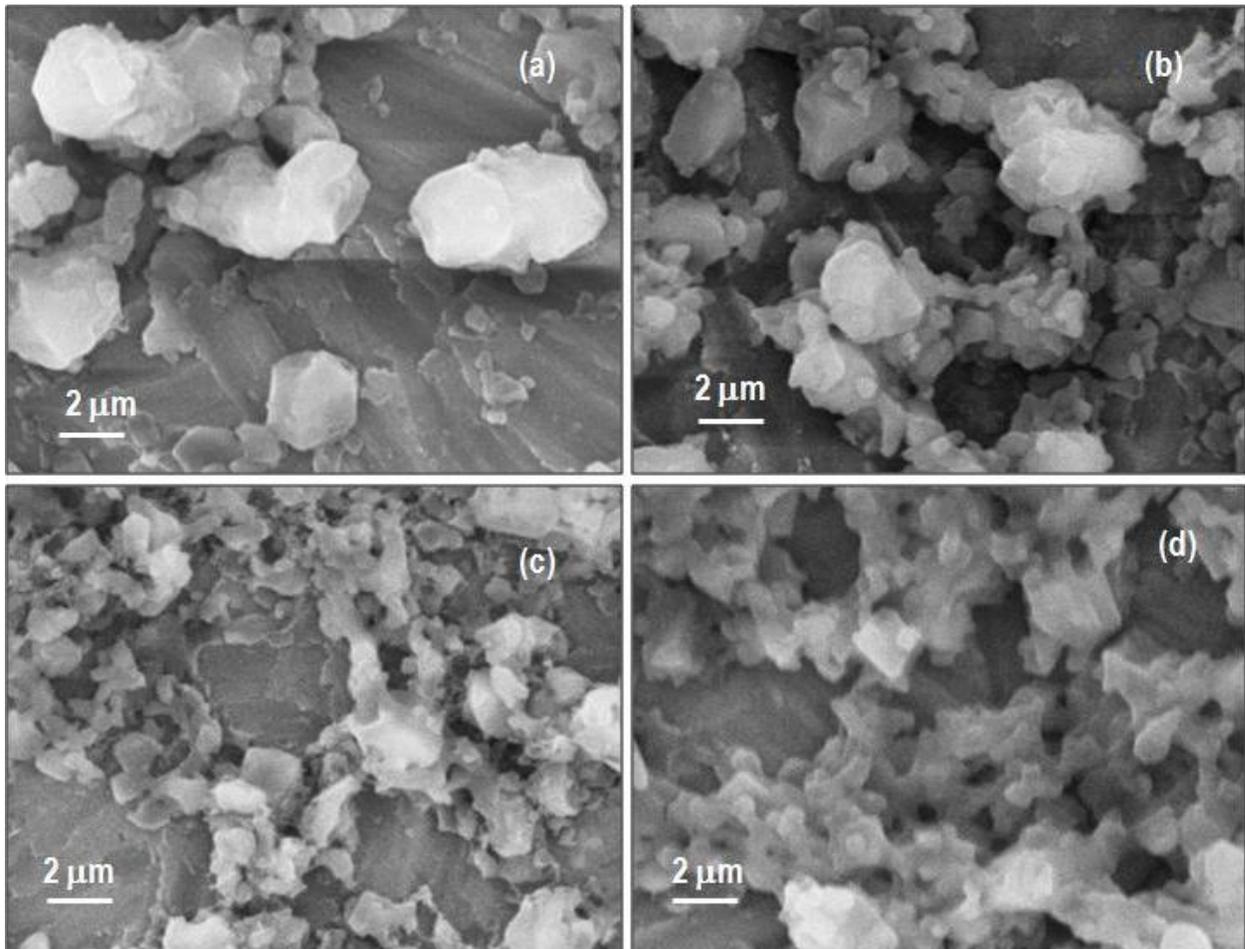
**Figura 4.13** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos cristais de lisozima obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 15 °C em carbamato de amônio 1,29 (a), 1,09 (b), 0,90 (c), 0,69 (d), 0,45 (e), 0,25 (f) e 0,06 (g).

Já para a insulina, tanto para a suína (Figuras 4.14 e 4.15) quanto para a bovina (Figuras 4.16 e 4.17), a formação dos cristais não foi favorecida. De acordo com a literatura (BLUNDELL *et al.*, 1972; DODSON *et al.*, 1978), sabe-se que cristais de insulina normalmente são obtidos em valores de pH próximo a 6,5 na presença de cátions divalentes, geralmente o zinco. Para valores de pH acima de 8,0 o hexâmero não é estável – unidade cristalina presente nos cristais de insulina – e ocorre a dissociação da insulina e do zinco. Por este motivo, não se adicionou zinco a solução de carbamato de amônio devido ao pH desta solução ser alcalina e próxima de 10,0. Aparentemente, as partículas de insulina suína e bovina estavam bastante aglomeradas nas condições estudadas, nas quais os valores de  $B_{22}$  para ambas as proteínas foram bastante negativos ( $-250 \times 10^{-4}$  a  $-17 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> e  $-483 \times 10^{-4}$  a  $-6,7 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> para as insulinas suína e bovina obtidos por SLS, respectivamente), indicando justamente a formação de precipitados. Os ensaios de cristalização para a insulina suína nas concentrações de 0,45 e 0,25 mol/kg de sal volátil foram realizados a 25 °C, mas não houve alteração da concentração durante os quatro primeiros dias de ensaio e em seguida, uma solução com aparência de gel foi formada. Assim, não foram realizados ensaios para as insulinas nas concentrações menores de sal (0,45 a 0,06 mol/kg para insulina suína a 15 e 25 °C e 0,25 e 0,06 mol/kg para a insulina bovina a 25 °C) por causa do seu alto valor de solubilidade (80 a 120 mg/mL e 105 a 136 mg/mL, respectivamente para as insulinas suína e bovina) e da dificuldade de se obter soluções supersaturadas nessas condições (optou-se por não adicionar ácidos e bases ao sal volátil para não alterar suas reações de equilíbrio).

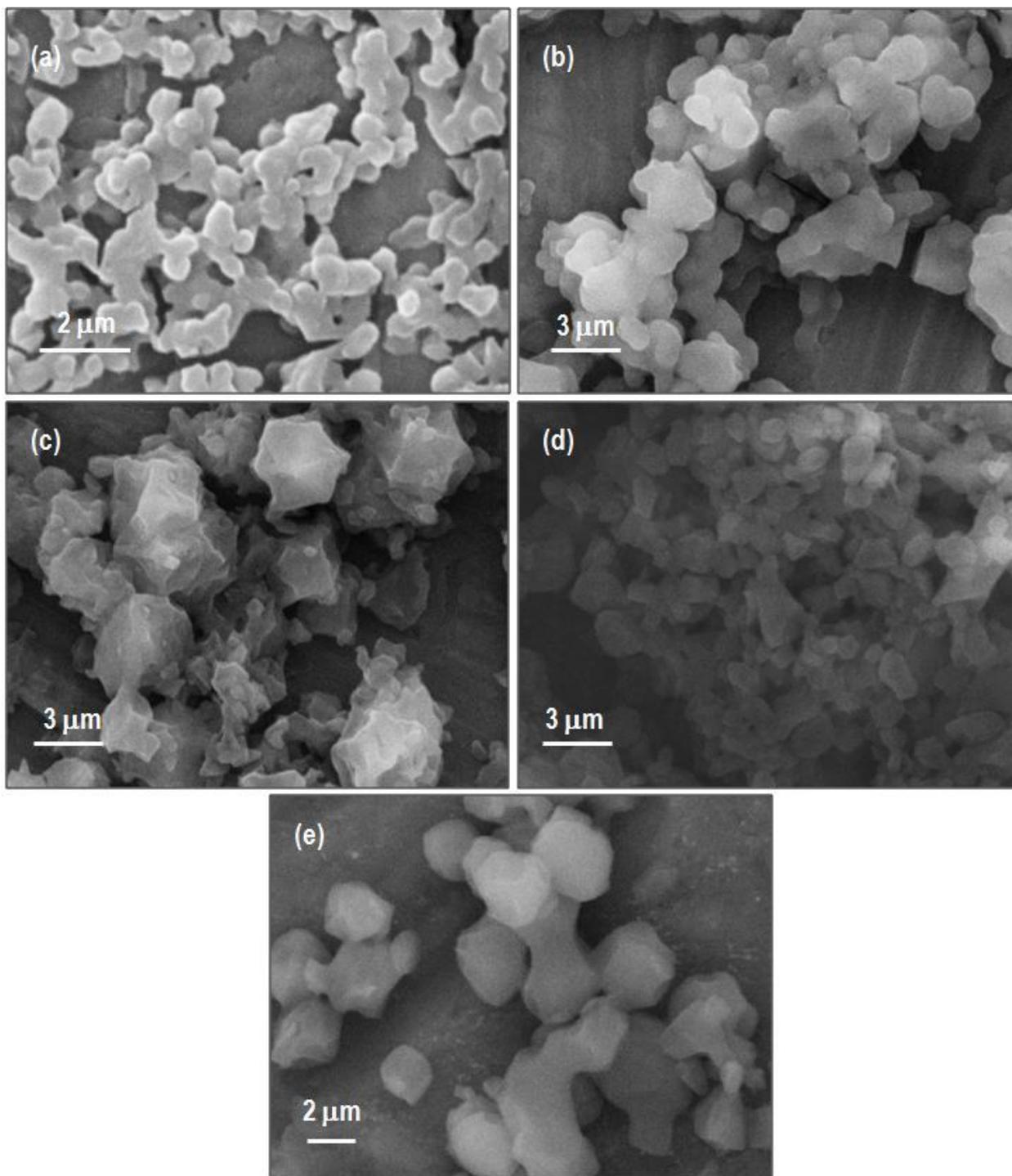
Nos ensaios preliminares de cristalização de insulina suína, aparentemente, a concentração ótima de carbamato de amônio para se obterem cristais foi de 1,89 a 3,0 mol/kg. De acordo com a tendência dos valores de  $B_{22}$  para a insulina suína em carbamato de amônio (Figura 4.5), para concentrações maiores de sal volátil, mais negativo será o seu valor. Nessas condições, a solubilidade da insulina suína é bastante reduzida e a supersaturação é bastante elevada, mas, curiosamente, cristais foram formados (Figura 4.11).



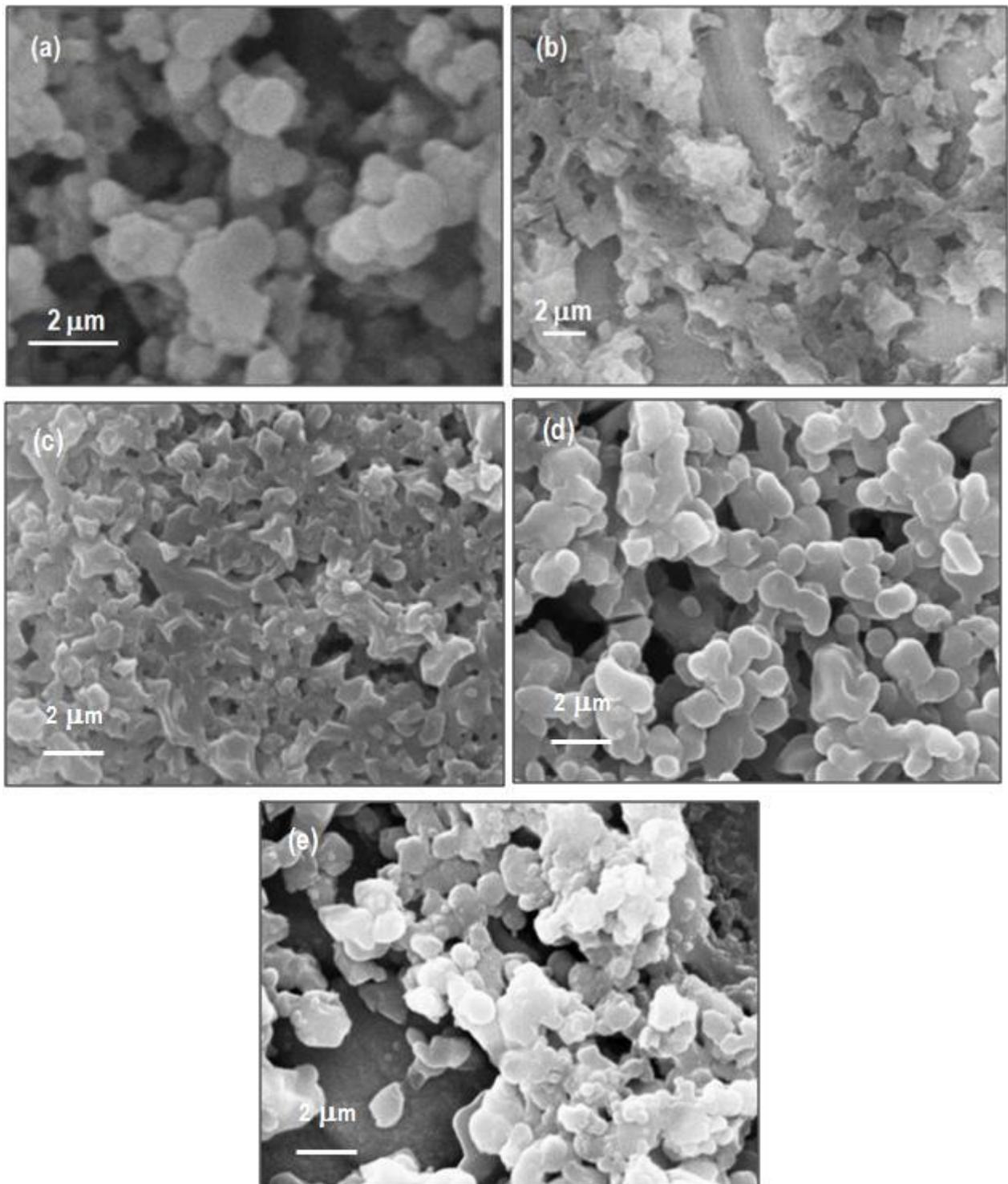
**Figura 4.14** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos precipitados de insulina suína obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 25 °C: 1,29 (a), 1,09 (b) e 0,90 (c).



**Figura 4.15** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos precipitados de insulina suína obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 15 °C: 1,29 **(a)**, 1,09 **(b)**, 0,90 **(c)** e 0,69 **(d)**.



**Figura 4.16** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos precipitados de insulina bovina obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 25 °C: 1,29 (a), 1,09 (b), 0,90 (c), 0,69 (d) e 0,45 (e).



**Figura 4.17** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos precipitados de insulina bovina obtidos a diferentes concentrações de carbamato de amônio (em mol/kg) a 15 °C: 1,29 **(a)**, 1,09 **(b)**, 0,90 **(c)**, 0,69 **(d)**, 0,45 **(e)**.

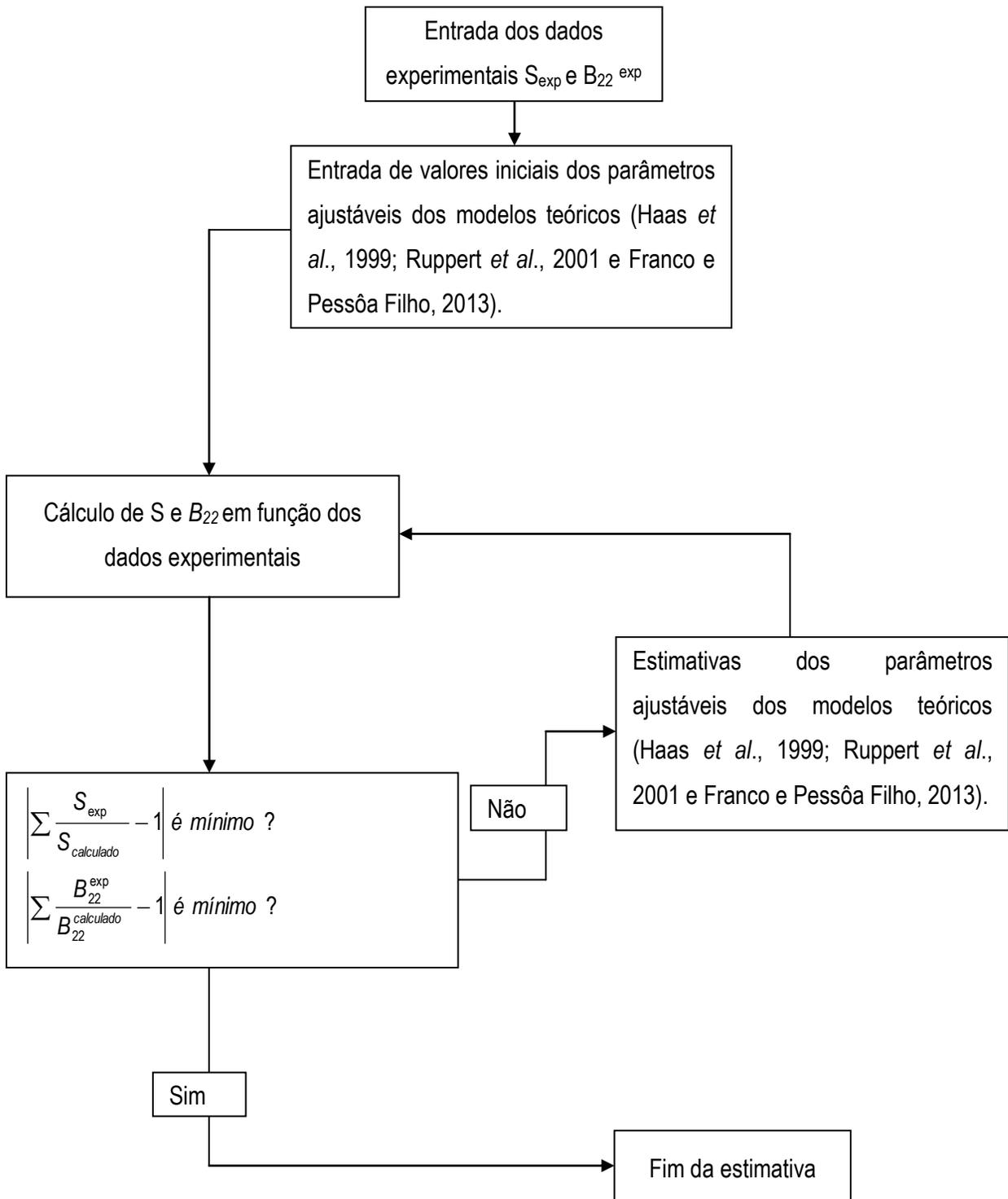
#### 4.4 Determinação de valores de $B_{22}$ através do uso de modelos termodinâmicos

Os valores de  $B_{22}$  determinados por SLS foram correlacionados com as medidas de solubilidade das proteínas lisozima e insulinas suína e bovina às temperaturas de 15 e 25 °C de acordo com os modelos termodinâmicos já apresentados no item 2.4. A determinação dos parâmetros (Tabela 4.5) foi realizada de acordo com a Figura 4.18 em que são destacados os passos para a execução dos modelos de modo a se obter valores que representem de forma adequada os dados experimentais obtidos. Aplicando a metodologia adotada para estimativa dos parâmetros obteve-se os resultados descritos pelas Tabelas 4.6 a 4.8. Os resultados da aplicação dos modelos de Haas *et al.* (1999), Ruppert *et al.* (2001) e Franco e Pessoa Filho (2013) são mostrados nas Figuras 4.19 a 4.21.

**Tabela 4.5** – Valores ajustados dos parâmetros e utilizados nos modelos termodinâmicos para estimativa do segundo coeficiente virial.

		Haas <i>et al.</i> (1999)		Ruppert <i>et al.</i> (2001)		Franco e Pessoa Filho (2013)	
		$z^*$	A	Ac	K	$B^*(\text{mol.mL/g}^2)$	$m_{\text{sal}}^*(\text{mol/kg})$
Lisozima	15 °C	4	0,115	0,01	85,6	-0,077	3,030
	25 °C	4	0,0111	0,01	16,5	-0,0389	3,030
Insulina suína	15 °C	8	1,725	-3445	0,1	-0,595	1,538
	25 °C	8	1,75	-984	200	-0,1961	1,538
Insulina bovina	15 °C	8	3,24	-630	406	-0,00685	0,400
	25 °C	8	4,69	-500	77,1	-0,00430	0,400

\* valor de  $z$  retirado de Mehta *et al.* (2012) e Bergeron *et al.* (2003).



**Figura 4.18** – Esquema ilustrativo utilizado para a estimativa dos parâmetros ajustáveis dos modelos teóricos de Haas *et al.* (1999), Ruppert *et al.* (2001) e Franco e Pessoa Filho (2013).

**Tabela 4.6** – Condições utilizadas para as estimativas e ajustes dos parâmetros do modelo de Haas *et al.* (1999). Valores de solubilidade e  $B_{22}$  calculados ( $S$  e  $B_{22}$ ) a partir dos dados experimentais ( $S_{exp}$  e  $B_{22exp}$ ).

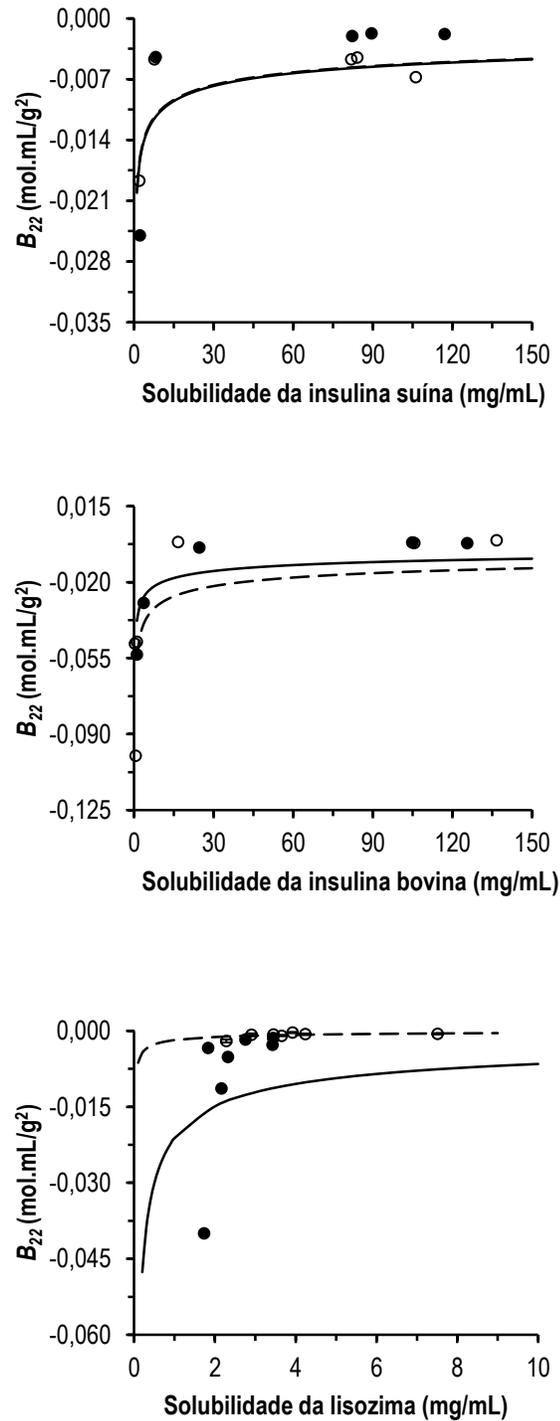
Concentração de sal (mol/kg)	Lisozima				Insulina suína				Insulina bovina				Verificação $B_{22}$
	25 °C		15 °C		25 °C		15 °C		25 °C		15 °C		
	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	
1,29	2,7087	1,7637	6,1166	2,4946	-	-	-	-	0,1692	0,6276	-	-	1,00
1,09	0,6916	0,7961	0,6384	0,7958	-	-	-	-	5,2679	1,5385	-	-	1,00
0,90	1,2969	1,1725	0,1485	0,3750	4,8042	1,5221	1,5265	1,1209	0,5475	0,8528	3,6092	1,4003	1,00
0,69	0,7673	0,8429	0,0530	0,2188	0,0454	0,3942	0,0533	0,4162	-	-	1,3938	1,0936	1,00
0,45	0,2997	0,4327	0,0236	0,1382	0,0556	0,3579	0,5126	0,8074	0,0006	0,0562	0,0142	0,2538	1,00
0,25	0,7464	0,8321	0,0210	0,1274	0,0416	0,3120	0,5734	0,8378	0,0053	0,1262	0,0092	0,1619	1,00
0,06	1,2132	1,1409	0,0679	0,2454	0,0602	0,3553	2,3558	1,3036	0,0021	0,0478	0,0151	0,2038	1,00
$\left  \sum \left( \frac{B_{22exp}}{B_{22}} - 1 \right) \right $ ou $\left  \sum \left( \frac{S_{exp}}{S} - 1 \right) \right $	<b>0,724</b>	<b>0,019</b>	<b>0,069</b>	<b>2,605</b>	<b>0,007</b>	<b>2,059</b>	<b>0,022</b>	<b>0,514</b>	<b>0,007</b>	<b>2,751</b>	<b>0,042</b>	<b>1,887</b>	

**Tabela 4.7** – Condições utilizadas para as estimativas e ajustes dos parâmetros do modelo de Ruppert *et al.* (2001). Valores de solubilidade e  $B_{22}$  calculados ( $S$  e  $B_{22}$ ) a partir dos dados experimentais ( $S_{exp}$  e  $B_{22exp}$ ).

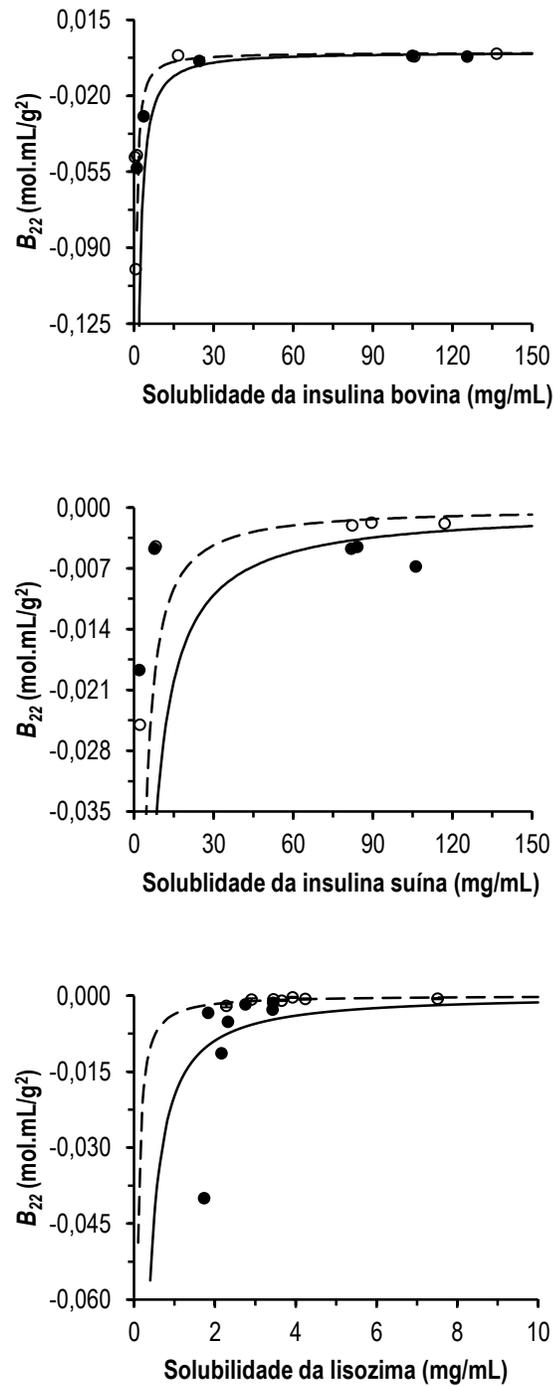
Concentração de sal (mol/kg)	Lisozima				Insulina suína				Insulina bovina				Verificação $B_{22}$
	25 °C		15 °C		25 °C		15 °C		25 °C		15 °C		
	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	$S_{exp}/S$	$B_{22exp}/B_{22}$	
1,29	1,3527	1,4046	3,2036	3,7945	-	-	-	-	0,1700	0,1483	-	-	1,00
1,09	0,7420	0,7188	1,3361	1,3986	-	-	-	-	0,6402	0,6181	-	-	1,00
0,90	1,1668	1,1855	0,7277	0,6905	0,3430	0,3075	0,1178	0,1187	0,5802	0,5554	0,2482	0,2015	1,00
0,69	0,9207	0,9139	0,4016	0,3452	0,2764	0,2415	0,1169	0,1204	-	-	0,5433	0,4897	1,00
0,45	0,4736	0,4526	0,3422	0,2846	1,3685	1,3914	1,2324	1,2228	0,3778	0,3646	0,7095	0,6591	1,00
0,25	0,8337	0,8184	0,3622	0,3037	1,2762	1,2894	1,2571	1,2467	3,1650	3,0076	1,4739	1,5884	1,00
0,06	1,5224	1,5571	0,6314	0,5832	1,7420	1,7708	2,3627	2,2912	1,3758	1,3061	2,0402	2,3347	1,00
$\left  \sum \left( \frac{B_{22}^{exp}}{B_{22}} - 1 \right) \right $ ou $\left  \sum \left( \frac{S_{exp}}{S} - 1 \right) \right $	<b>0,0117</b>	<b>0,0509</b>	<b>0,0048</b>	<b>0,4004</b>	<b>0,0057</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0864</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,3090</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0151</b>	<b>0,2734</b>	

**Tabela 4.8** – Condições utilizadas para as estimativas e ajustes dos parâmetros do modelo de Franco e Pessoa Filho (2013). Valores de concentração de sal e  $B_{22}$  calculados ( $m$  e  $B_{22}$ ) a partir dos dados experimentais ( $m_{exp}$  e  $B_{22exp}$ ).

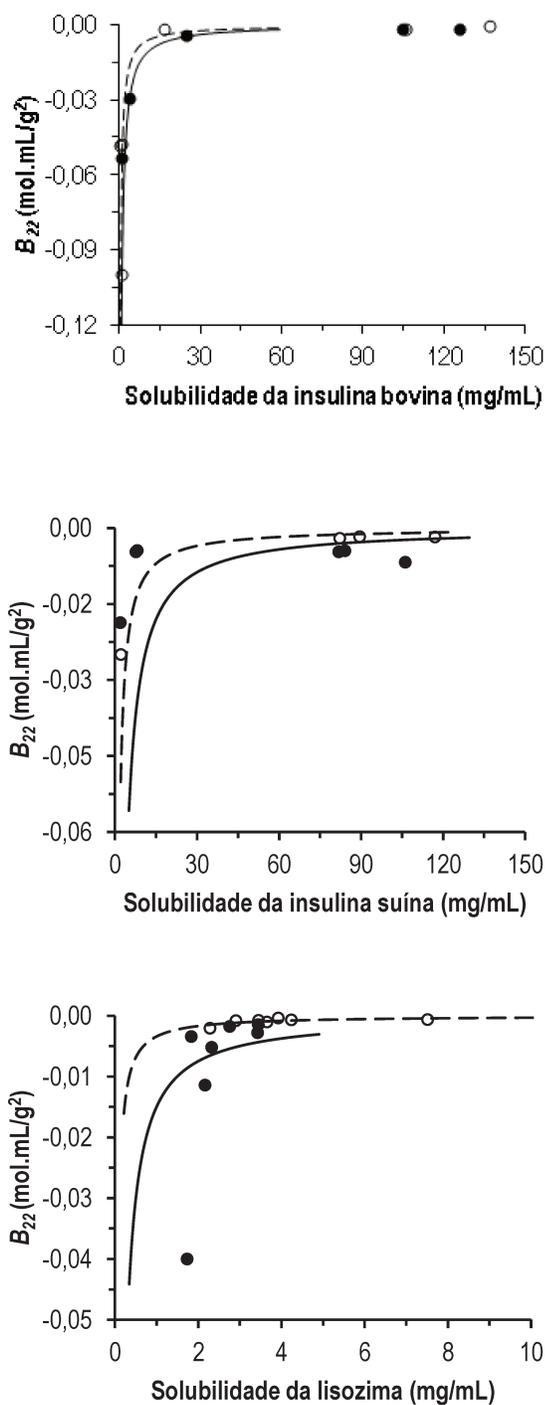
Concentração de sal (mol/kg)	Lisozima				Insulina suína				Insulina Bovina				Verificação $B_{22}$
	25 °C		15 °C		25 °C		15 °C		25 °C		15 °C		
	$m^{exp}/m$	$B_{22exp}/B_{22}$	$m^{exp}/m$	$B_{22exp}/B_{22}$	$m^{exp}/m$	$B_{22exp}/B_{22}$	$m^{exp}/m$	$B_{22exp}/B_{22}$	$m^{exp}/m$	$B_{22exp}/B_{22}$	$m^{exp}/m$	$B_{22exp}/B_{22}$	
1,29	1,0760	0,8636	0,5335	3,3430	-	-	-	-	1,1844	0,4941	-	-	1,00
1,09	1,7719	0,4656	0,8757	1,1801	-	-	-	-	0,8409	2,0620	-	-	1,00
0,90	1,1713	0,8091	1,7732	0,6571	0,9334	1,2594	1,4511	0,3483	0,8304	1,9060	0,8577	1,6027	1,00
0,69	1,3650	0,7430	5,9061	0,5416	1,4235	0,4786	2,6995	0,1944	-	-	0,8004	1,7224	1,00
0,45	3,7030	0,5893	-0,8882	0,3593	1,6817	0,5195	1,8476	0,4592	4,9835	0,2829	1,9518	0,4998	1,00
0,25	0,4330	1,6941	-0,3629	0,3662	1,1265	0,9041	0,9781	1,0213	1,4810	0,7520	-5,3587	0,3916	1,00
0,06	0,1310	1,8985	-0,8100	0,8664	0,2593	1,8500	0,1709	2,9966	-0,4628	0,5139	6,7991	0,8507	1,00
$\left  \sum \left( \frac{B_{22}^{exp}}{B_{22}} - 1 \right) \right $ ou $\left  \sum \left( \frac{S_{exp}}{S} - 1 \right) \right $	<b>2,651</b>	<b>0,063</b>	<b>0,027</b>	<b>0,314</b>	<b>0,424</b>	<b>0,012</b>	<b>2,147</b>	<b>0,020</b>	<b>2,858</b>	<b>0,011</b>	<b>0,050</b>	<b>0,067</b>	



**Figura 4.19** – Correlações entre o segundo coeficiente virial osmótico e a solubilidade das proteínas lisozima e insulinas suína e bovina obtidas pelo modelo termodinâmico Haas *et al.* (1999). (●, —) 15 °C e (○, - - - -) 25 °C. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas ao ajuste teórico.



**Figura 4.20** – Correlações entre o segundo coeficiente virial osmótico e a solubilidade das proteínas lisozima e insulinas suína e bovina obtidas pelo modelo termodinâmico Ruppert *et al.* (2001). (●, —) 15 °C e (○, -----) 25 °C. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas ao ajuste teórico.



**Figura 4.21** – Correlações entre o segundo coeficiente virial osmótico e a solubilidade das proteínas lisozima e insulinas suína e bovina obtidas pelo modelo termodinâmico Franco e Pessoa Filho (2013). (●, —) 15 °C e (○, - - - -) 25 °C. Os símbolos correspondem aos dados experimentais e as linhas ao ajuste teórico.

A estrutura e o comportamento dos gráficos obtidos (Figuras 4.19 a 4.21), com pouca variação na ordenada (eixo y) e muita na abscissa (eixo x), tornou difícil o ajuste pelos modelos aqui estudados. Apesar da dificuldade na análise das funções estudadas, pois as duas variáveis (solubilidade e  $B_{22}$ ) têm valores e comportamentos muito distintos, os valores ótimos para cada parâmetro foram obtidos a partir da análise qualitativa do comportamento. Assim, tanto os valores de  $B_{22}$  quanto os de solubilidade foram calculados a partir dos dados experimentais a fim de se comparar e checar os valores de  $B_{22}$  estimados pelos modelos com os dados experimentais (APÊNDICE 3). A condição adotada para encontrar os parâmetros foi um valor mínimo da razão entre os dados experimentais e os calculados, sem um peso definido para as funções. Os valores mínimos (Tabelas 4.6 a 4.8) indicam que os parâmetros estimados são adequados para representar de forma qualitativa os dados experimentais do segundo coeficiente virial naquelas condições de temperatura e concentrações de sal estudadas. A verificação dos valores de  $B_{22}$  é igual à razão do valor de  $B_{22}$  obtido para a solubilidade calculada a partir do parâmetro experimental pelo valor de  $B_{22}$  experimental.

Observando-se as Figuras 4.19 a 4.21 nota-se que todos os modelos representam o comportamento do segundo coeficiente virial em função da solubilidade. O valor mínimo da função objetivo

$$\left| \sum \left( \frac{B_{22}^{exp}}{B_{22}} - 1 \right) \right| \text{ ou } \left| \sum \left( \frac{S_{exp}}{S} - 1 \right) \right|$$

foi utilizado como condição para avaliar os modelos. Os valores obtidos para cada conjunto de dados mostraram certa variação (2,858 a 0,007) dos dados experimentais em relação aos ajustes termodinâmicos nos modelos de Haas *et al.* (1999) e Franco e Pessôa Filho (2013). O modelo de Ruppert *et al.* (2001) mostrou uma menor variação do valor mínimo (0,400 a 0,0002) sendo o mais apropriado dos três modelos para correlacionar os dados experimentais para as três proteínas nas duas temperaturas estudadas (15 e 25 °C). Este fato ocorre, provavelmente, por causa da presença de mais de um parâmetro ajustável neste último modelo. Mehta *et al.* (2012) também avaliaram os modelos de Ruppert *et al.* (2001) e Haas *et al.* (1999). Em seu estudo, esses autores concluíram que o segundo coeficiente virial osmótico é diretamente proporcional ao logaritmo da solubilidade de proteínas individuais em soluções salinas, o que explica a melhor correlação obtida pelo modelo de Ruppert *et al.* (2001), uma vez que essa correlação é do tipo  $B_{22} \propto \ln S/S$ .

Já a relação proposta por Franco e Pessôa Filho (2013) (valor mínimo obtido entre 2,858 e 0,011), conforme discutido anteriormente, é válida apenas para a região do diagrama de fases em que o fenômeno de “salting-out” ocorre e que foi evidente para as três proteínas em todas as condições estudadas. Esse

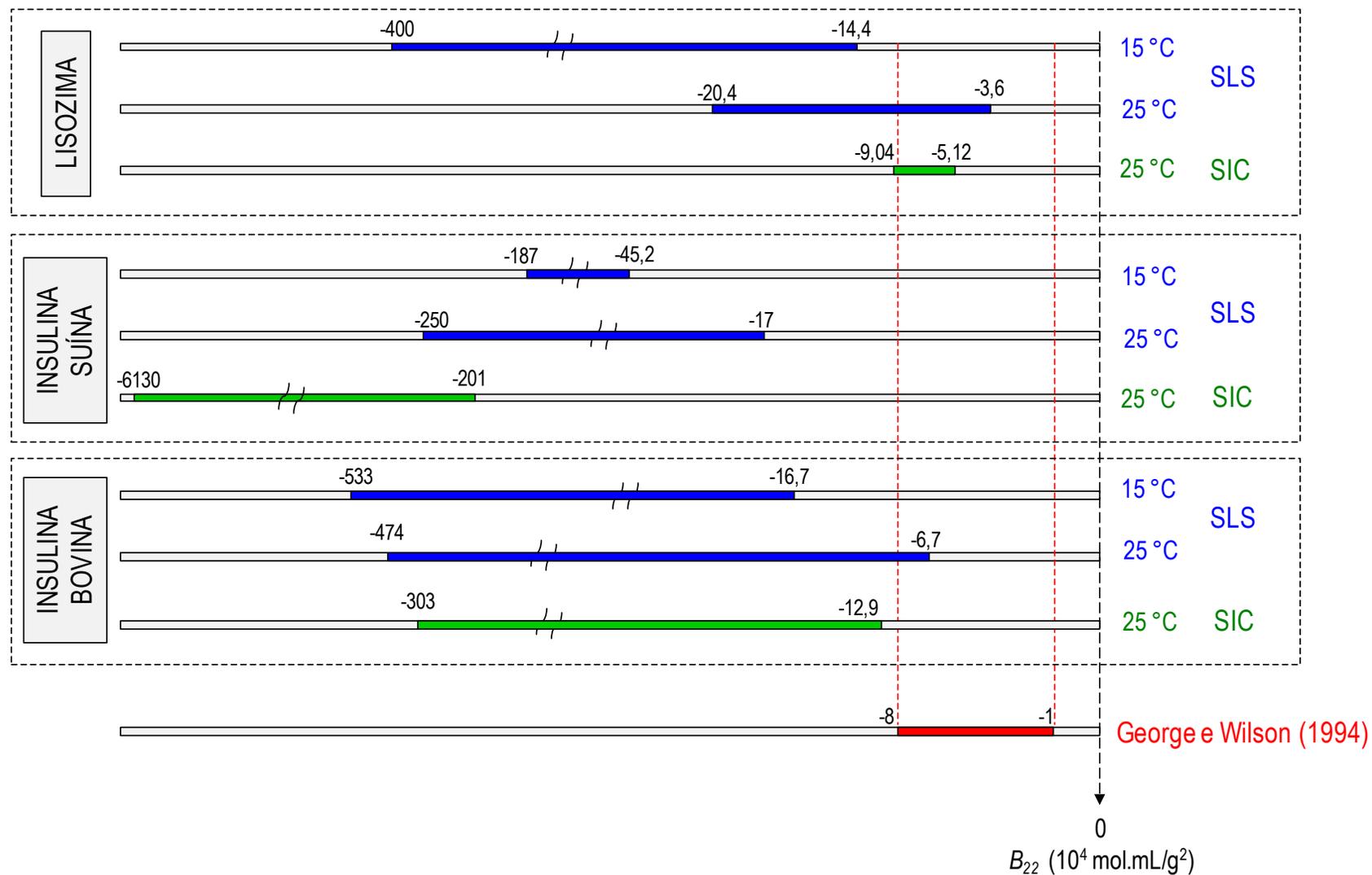
modelo também descreve de forma qualitativa os dados experimentais e relaciona novamente a capacidade de o sal induzir a precipitação e o seu efeito na solubilidade da proteína. A aplicação desse modelo é mais simples podendo ser facilmente utilizado para o cálculo do parâmetro  $B_{22}$  em condições em que sua obtenção é relativamente difícil de determinar experimentalmente, em altas concentrações de sal devido à baixa solubilidade das proteínas. Além disso, os outros modelos aqui discutidos requerem medidas de outros parâmetros independentes enquanto a relação de Franco e Pessoa Filho (2013) utiliza apenas os dados de concentração de sal e solubilidade.

#### 4.5 Relação entre o $B_{22}$ e as condições de cristalização

A relação entre as medidas de  $B_{22}$  com as condições de cristalização foi muito pouco investigada experimentalmente. Dessa forma, foi feita uma análise dos dados obtidos nas etapas anteriores para revisar as condições estabelecidas por George e Wilson (1994) para a ocorrência de cristalização em sal volátil carbamato de amônio (Figura 4.22).

A lisozima foi cristalizada em duas temperaturas e nas concentrações de sal de 0,06 a 1,29 mol/kg, sendo a concentração de sal mais influente no tamanho dos cristais a 25°C. Nas concentrações mais altas de carbamato de amônio (1,29 e 1,09 mol/kg) os cristais foram aparentemente menores e em maior quantidade (valores de  $B_{22}$  mais negativos). Apesar dos valores de  $B_{22}$  a 15 °C terem sido bem menores, a cristalização foi favorecida, o que contraria a “janela de cristalização” de George e Wilson (1994). A faixa de valores de  $B_{22}$  medidos por SLS variou entre  $-20,4 \times 10^{-4}$  e  $-3,6 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup>, enquanto que os valores medidos por SIC foram de  $-9,04 \times 10^{-4}$  a  $-5,12 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup>. A tendência obtida pelo método SLS foi a esperada: menores valores de  $B_{22}$  para maiores concentrações de sal. Já para o método SIC houve certa oscilação (Tabela 4.4) entre os valores, não se observando tendência definida.

Para a insulina suína, a mesma tendência para os valores de  $B_{22}$  foi observada com os dois métodos adotados. Quanto maior a concentração de sal, mais negativo o valor de  $B_{22}$ . A faixa de valores de  $B_{22}$  medidos por SLS para a insulina suína foi de  $-250 \times 10^{-4}$  a  $-17 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup>, enquanto os valores obtidos por SIC foram de  $-6.130 \times 10^{-4}$  a  $-201 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup>. Nas condições estudadas neste trabalho, a cristalização de insulina suína foi favorecida, não obedecendo a “janela de cristalização” de George e Wilson (1994). Precipitados bastante aglomerados foram formados e nenhuma relação com tamanho e concentração de sal volátil pôde ser observada.



**Figura 4.22** - Esquema comparativo entre os coeficientes viriais medidos por SLS e SIC para as proteínas lisozima e insulinas suína e bovina em carbamato de amônio a 15 °C e 25 °C (escala ilustrativa para os valores de  $B_{22}$ ).

No caso da insulina bovina, a tendência observada para os valores de  $B_{22}$  obtidos por SLS foi característica, menores valores de  $B_{22}$  para maiores concentrações de sal. A faixa de valores de  $B_{22}$  medidos por SLS foi de  $-483 \times 10^{-4}$  a  $-6,7 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> mais próxima dos valores encontrados por SIC, variando de  $-303 \times 10^{-4}$  a  $-12,9 \times 10^{-4}$  mol.mL/g<sup>2</sup> a 25°C. A cristalização dessa proteína não foi favorecida no sistema estudado. A formação de agregados, refletido pelo alto valor de  $B_{22}$ , está de acordo com a “janela de cristalização”.

A correlação entre os coeficientes viriais e a solubilidade das proteínas é muito útil, embora a “janela de cristalização” não permita uma seleção “exata” de melhores condições para cristalizar uma determinada proteína. Com os resultados deste estudo pode-se afirmar que as medidas do parâmetro  $B_{22}$  são adequados para otimizar ensaios de cristalização em relação aos números de experimentos inicialmente testados e quantidades de materiais utilizados. Entretanto, não existe uma “janela de cristalização universal” válida para todos os sistemas. A cristalização de proteínas é um processo de múltiplos parâmetros bastante complexo, sendo as etapas clássicas de nucleação e crescimento de cristais ainda dependentes da concentração inicial da proteína, ou seja, da supersaturação. O conhecimento da solubilidade da biomolécula e de propriedades termodinâmicas de soluções de proteínas é de grande importância para aperfeiçoar os processos de separação e informações de como diferentes fatores possam afetar a solubilidade leva a melhor entender o comportamento de cristalização e, conseqüentemente, racionalizar o processo.

---

## 5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

### 5.1 Conclusões

A principal conclusão deste estudo foi que a faixa de valores de  $B_{22}$  de cristalização estabelecida por George e Wilson (1994) ( $-1 \times 10^{-4}$  a  $-8 \times 10^{-4}$  mL.mol/g<sup>2</sup>) não se aplica aos sistemas estudados. Assim, os valores de  $B_{22}$  para a “janela de cristalização” não representam todos os sistemas existentes e esse parâmetro não pode ser considerado um preditor “universal” para a cristalização de proteínas, mas pode indicar se o solvente é ou não adequado para induzir a separação de fases.

Para a lisozima obteve-se a formação de cristais independente do valor de  $B_{22}$  encontrado para as diferentes concentrações de sal, provavelmente influenciado pelo pH da solução de sal volátil muito próximo ao  $pI$  da proteína. Para as insulinas suína e bovina a formação de precipitados foi favorecida, fato corroborado pelos valores negativos de  $B_{22}$  obtidos para estas duas proteínas. A área superficial hidrofóbica da lisozima é muito menor quando comparada à da insulina, assim, a tendência a formar agregados é reduzida (LEUNISSEN, 2001).

Os resultados dos ensaios de cristalização para as insulinas concordam com a janela de cristalização de George e Wilson (1994) apenas em parte. A precipitação de aglomerados foi observada para as insulinas suína e bovina às temperaturas de 15 e 25 °C, mas de acordo com a tendência do comportamento de  $B_{22}$  (valores mais negativos para maiores concentrações de sal) a obtenção de cristais deveria ocorrer em concentrações menores de sal. Contudo, conforme observado nos ensaios preliminares de cristalização de insulina suína a 15 °C, cristais foram obtidos em concentrações ainda maiores de sal volátil (3 mol/kg), ou seja, valores de  $B_{22}$  ainda mais negativos. Tal comportamento contraria o que foi proposto por George e Wilson (1994) em que fracas interações atrativas levariam à formação de cristais bem definidos.

A cristalização de proteínas com sal volátil carbamato de amônio é viável. O fenômeno de “salting-out” foi observado no diagrama de fases para as três proteínas estudadas. Conforme a equação de Cohn (1925), o carbamato de amônio pode ser considerado um bom agente precipitante. Os valores de  $K'_s$ , relacionado à capacidade de precipitar proteína e indicadores da efetividade do sal, obtidos neste trabalho

para o carbamato de amônio (valores entre 1,07 a 3,77 kg/mol) foram superiores a de outros sistemas (valores de  $K'_s$  entre 0,447 a 2,38 kg/mol para cloreto de sódio, sulfato de sódio, fosfato de sódio e sulfato de amônio), sugerindo uma maior capacidade de “salting-out” desse sal volátil.

Dentre os dois métodos de determinação dos valores de  $B_{22}$ , o método de SLS é o mais adequado para as condições exploradas aqui, pois a SIC depende de muitos outros fatores que ainda precisam ser mais bem avaliados (por exemplo, cobertura de superfície e concentração da proteína na amostra injetada). A faixa de valores de  $B_{22}$  foi bastante extensa para as três proteínas nas duas temperaturas empregadas. A baixa solubilidade da lisozima e insulinas suína e bovina em soluções aquosas de carbamato de amônio foi confirmada pelos valores negativos de  $B_{22}$ , refletindo a forte interação atrativa entre as moléculas de proteína em concentrações mais altas de sal. Esse comportamento, típico de “salting-out”, sugere que as interações hidrofóbicas e a desidratação da superfície da proteína sejam responsáveis pela diminuição do valor de  $B_{22}$  e, conseqüentemente, pelo aumento das interações atrativas intermoleculares.

O uso de modelos preditivos para determinar os valores de  $B_{22}$  e indicar a ocorrência da formação de uma fase sólida é útil. Dos três modelos estudados neste trabalho, o de Ruppert *et al.* (2001) foi o mais apropriado e representou qualitativamente os resultados obtidos para as três proteínas, podendo ser utilizado para correlacionar os dados experimentais e estimar os valores de  $B_{22}$  em condições difíceis de se medir o parâmetro termodinâmico.

### 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para complementação deste estudo sugere-se como trabalhos futuros:

- 1) Utilizar outros sais voláteis na precipitação/cristalização de proteínas, como por exemplo, o carbonato de amônio, uma vez que sais com íons bivalentes são mais efetivos na precipitação de proteínas de acordo com a série de Hofmeister, e também a avaliação e classificação da efetividade dos íons para compreender a capacidade de precipitação de proteínas do carbamato de amônio e verificar se é uma característica do íon carbamato ou devido à presença de íons carbonato e do cátion amônio.
- 2) Avaliar o processo de cristalização/precipitação como um todo (cinética de nucleação e crescimento) com diferentes eletrólitos voláteis e diferentes proteínas a fim de se entender melhor o comportamento “salting-out” de biomoléculas nesses compostos.

- 3) Estudar diferentes modelos termodinâmicos para a determinação do parâmetro  $B_{22}$ . Devido ao comportamento e estrutura dos dados de  $B_{22}$  experimentais o ajuste pelos modelos aqui estudados tornou-se difícil.
- 4) Explorar a técnica de cromatografia de auto-interação. A cromatografia é uma técnica vantajosa em relação a quantidade de material e tempo utilizados para a determinação do segundo coeficiente virial osmótico. A análise da influência de diferentes parâmetros na cromatografia pode ajudar a aperfeiçoar essa técnica para os sistemas proteína/sal volátil, como por exemplo, a cobertura de superfície do suporte cromatográfico, a concentração de injeção e a quantidade de amostra utilizada.



---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHAMED T., OTTENS M., VAN DEDEM G. W.K., VAN DER WIELEN L. A. M. Design of self-interaction chromatography as an analytical tool for predicting protein phase behavior. *Journal of Chromatography A*, v. 1089, p. 111-124, 2005.
- AHAMED T., OTTENS M., NFOR B. K., VAN DEDEM G. W.K., VAN DER WIELEN L. A.M. A generalized approach to thermodynamic properties of biomolecules for use in bioseparation process design. *Fluid Phase Equilibria*, v. 241, p. 268–282, 2006.
- ALDERTON G., FEVOLD H. L. Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme. *Journal of Biological Chemistry*, v. 164, p. 1-5, 1946.
- ANNUNZIATA O., PAYNE A., WANG Y. Solubility of lysozyme in the presence of aqueous chloride salts: common-ion effect and its role on solubility and crystal thermodynamics. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, 13347–13352, 2008.
- ANTIPOVA A. S., SEMENOVA M. G., BELYAKOVA, L. E. Effect of sucrose on the thermodynamic properties of ovalbumin and sodium caseinate in bulk solution and at air–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 12, p. 261–270, 1999.
- ASHERIE N. Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, v. 34, p. 266-272, 2004.
- ASHERIE N., GINSBERG C., BLASS S., GREENBAUM A., KNAFO S. Solubility of thaumatin. *Crystal Growth & Design*, v. 8, n. 6, p. 1815–1817, 2008.
- ATAKA M. Protein crystal growth: an approach based on phase diagram determination. *Phase Transitions*, v. 45, p. 205–219, 1993.
- BAJAJ H., SHARMA V. K., KALONIA D. S. Determination of second virial coefficient of proteins using a dual-detector cell for simultaneous measurements of scattered light intensity and concentration in SEC-HPLC. *Biophysical Journal*, v. 87, p. 4048-4055, 2004.
- BALDWIN R. L. How hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, v. 71, p. 2056-2063, 1996.

- BERGER B. W., BLAMEY C. J., NAIK U. P., BAHNSON B. J., LENHOFF A. M. Roles of additives and precipitants in crystallization of calcium- and integrin-binding protein. *Crystal Growth & Design*, v. 5, n. 4, p. 1499-1507, 2005.
- BERGERON L., FILOBELO L. F., GALKIN O., VEKILOV P. G. Thermodynamics of the hydrophobicity in crystallization of insulin. *Biophysical Journal*, v. 85, p. 3935–3942, 2003.
- BERNARDO A., CALMANOVICI C. E., MIRANDA E. A. Observance of polymorphic behavior during dissolution of insulin and lysozyme. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, n. 3, p. 331-339, 2005.
- BLUNDELL T., DODSON G., HODGKIN D. MERCOLA D. Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Advances in Protein Chemistry*, v. 26, p. 279-402, 1972.
- BONNETÉ F., FINET S., TARDIEU A. Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions. *Journal of Crystal Growth*, v. 196, n. 2, p. 403-414, 1999.
- BONTURI N., RADKE V. S. C. O., BUENO S. M. A., FREITAS S., AZZONI A. R., MIRANDA E. A. Sodium citrate and potassium phosphate as alternative adsorption buffers in hydrophobic and aromatic thiophilic chromatographic purification of plasmid DNA from neutralized lysate. *Journal of Chromatography B*, v. 919-920, p. 67–74, 2013.
- BOSTRÖM M., TAVARES F. W., FINET S., SKOURI-PANET F., TARDIEU A., NINHAM T. B. W. Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. *Biophysical Chemistry*, v. 117, p. 217–224, 2005.
- BOSTRÖM M., PARSONS D. F., SALIS A., NINHAM B. W., MONDUZZI M. Possible origin of the inverse and direct hofmeister series for lysozyme at low and high salt concentrations. *Langmuir*, v. 27, p. 9504–9511, 2011.
- BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROIDE M. L., TOMINC T. M., SAXOWSKY M. D. Using phase transitions to investigate the effect of salts on protein interactions. *Physical Review E*, v. 53, p. 6325-6335, 1996.
- BROMBERG L. RASHBA-STEP J., SCOTT T. Insulin particle formation in supersaturated aqueous solutions of poly(ethylene glycol). *Biophysical Journal*, v. 89, p. 3424-3433, 2005.

BROWN L. R. Glucose-Mediated Insulin Delivery from Implantable Polymers, in: *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*, Edited by Severian Dumitriu, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 1101-1115, 2002.

CACCIPO E., PUSEY M. L. The solubility of the tetragonal form of hen egg white lysozyme from pH 4.0 to 5.4, *Journal of Crystal Growth*, v. 114, p. 286-292, 1991.

CAPITO F., BAUER J., RAPP A., SCHRÖTER C., KOLMAR H., STANISLAWSKI B. Feasibility study of semi-selective protein precipitation with salt-tolerant copolymers for industrial purification of therapeutic antibodies. *Bioseparations and Downstream Processing Biotechnology and Bioengineering*, DOI 10.1002/bit.24950, 2013.

CARPINETI M., PIAZZA R. Metastability and supersaturation limit for lysozyme crystallization. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 6, p. 1506–1511, 2004.

CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA R., LEŚNIEWSKI G., KIJOWSKI J. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, v. 58, n. 1, p. 5-10, 2008.

CHENG Y-C., LOBO R. F., SANDLER S. I., LENHOFF A. M. Kinetics and equilibria of lysozyme precipitation and crystallization in concentrated ammonium solution. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94, p. 177-188, 2006.

CLONIS Y. D. Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop. *Journal of Chromatography A*, v. 1101, p. 1-24, 2006.

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

COHN E. J. The physical chemistry of the proteins. *Physiological Reviews*, v. 5, p. 349-437, 1925.

COLLINS K. D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, v. 34, p. 300–311, 2004.

CONNOLLY M. L. The molecular-surface package. *Journal of Molecular Graphics*, v. 11, p. 139–143, 1993.

CROWFOOT D. X-ray single crystal photographs of insulin. *Nature*, v. 135, p. 591-592, 1935.

- CURTIS R.A., ULRICH J., MONTASER A., PRAUSNITZ J. M., BLANCH H. W. Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions: Hofmeister series effects. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 79, p. 367-380, 2001.
- CURTIS R. A., ULRICH J., MONTASER A., PRAUSNITZ J. M., BLANCH H.W. Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions - Hofmeister-series effects. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 79, p. 367 – 380, 2002.
- CURTIS R. A., LUE L. A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions. *Chemical Engineering Science*, v. 61, p. 907-923, 2006.
- DEPHILLIPS P., LENHOFF A. M. Pore size distributions of cation exchange adsorbents determined by inverse size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 883, p. 39–54, 2000.
- DODSON E. J., DODSON G. G., LEWITOVA A., SABESAN M. Zinc-free cubic pig insulin: crystallization and structure determination. *Journal of Molecular Biology*, v. 125, p. 387-396, 1978.
- DUMETZ A. C., SNELLINGER-O'BRIEN A. M. KALER E. W., LENHOFF A. M. Patterns of protein-protein interactions in salt solutions and implications for protein crystallization. *Protein Science*, v. 16, p. 1867–1877, 2007.
- ESPITALIER F., CHENG Y. C., LENHOFF A. M. Mechanism of formation of lysozyme crystals in concentrated ammonium sulfate solution from concentration profiles and equilibria: influence of the 2nd osmotic virial coefficient. *Powder Technology*, v. 190, p. 112-117, 2009.
- FEIGELSON R. S. The relevance of small molecule crystal growth theories and techniques to the growth of biological macromolecules. *Journal of Crystal Growth*, v. 90, 1–13, 1988.
- FONSECA L. C., CORRÊA N. C. R., GARROTE-FILHO M. S, CUNHA C. C., PENHA-SILVA N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006.
- FRANCO L. F. M., PESSÔA FILHO P. DE A. On the relationship between the solubility of proteins and the osmotic second virial coefficient. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 01, p. 95 - 104, 2013.
- FORSYTHE E., SNELL E. H., PUSEY M. L. Crystallization of chicken egg white lysozyme from ammonium sulfate. *Acta Crystallographica Section D*, v. 53, p. 795-797, 1997.

- FORSYTHE E., SNELL E. H., MALONE C. C., PUSEY M. L. Crystallization of chicken egg white lysozyme from assorted sulfate salts. *Journal of Crystal Growth*, v. 196, p. 332-343, 1999.
- FUGLSANG C.C., JOHANSEN C., CHRISTGAU S., ADLER-NISSEN J. Antimicrobial enzymes: Application and future potential in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 12, p. 390–396, 1995.
- GARCÍA-RUIZ, J. M. Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology*, v. 142, n. 1, p. 22–31, 2003.
- GEORGE A., WILSON W. W. Predicting protein crystallization from a dilute solution property. *Acta Crystallographica Section D*, v. 50, p. 361-365, 1994.
- GÖRGÉNYI M., DEWULF J., VAN LANGENHOVE H., HÉBERGER K. Aqueous salting-out effect of inorganic cations and anions on non-electrolytes. *Chemosphere*, v. 65, n. 5, p. 802–810, 2006.
- GUO B., KAO S., MCDONALD H., ASANOV A., COMBS L. L., WILSON W. W. Correlation of second virial coefficients and solubilities useful in protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth*, v. 196, p. 424-433, 1999.
- HAAS C., DRENTH J., WILSON W. W. Relation between the solubility of proteins in aqueous solutions and the second virial coefficient of the solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 103, p. 2808-2811, 1999.
- HARRISON R. G., TODD P., RUDGE S. R., PETRIDES D. P. *Bioseparations science and engineering*, Oxford University Press, Oxford, 432 p., 2003.
- HAYNES C. A., TAMURA K., KORFER H. R., BLANCH H. W., PRAUSNITZ J. M. Thermodynamic properties of aqueous  $\alpha$ -chymotrypsin solutions from membrane osmometry measurements. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 96, p. 905-912, 1992.
- HEBEL D., URDINGEN M., HEKMAT D., WEUSTER-BOTZ D. Development and scale up of high-yield crystallization processes of lysozyme and lipase using additives. *Crystal Growth and Design*, v. 13, p. 2499–2506, 2013.
- HIRATA, G. A. M. *Cristalização de insulina suína com dióxido de carbono como agente acidificante*. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009, 95 p., Dissertação (Mestrado).

- HIRATA G. A. M., BERNARDO A., MIRANDA E. A. Crystallization of porcine insulin with carbon dioxide as acidifying agent. *Powder Technology*, v. 197, p. 54-57, 2010.
- HOFLAND G. W., VAN ES M., VAN DER WIELEN L. A. M., WITKAMP G. J. Isoelectric precipitation of casein using high-pressure CO<sub>2</sub>. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 38, p. 4919-4927, 1999.
- HOFMEISTER F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. *Archiv fuer experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, v. 24, p. 247-260, 1888.
- HOWARD S. B., TWIGG P. J., BAIRD J. K., MEEHAN E. J. The solubility of hen egg-white lysozyme. *Journal of Crystal Growth*, v. 90, p. 94-104, 1988.
- HUBBUCH J., KULA M. R. Isolation and purification of biotechnological products. *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics*, v. 32, p. 99-127, 2007.
- JOHNSON D. H., PARUPUDI A., WILSON W. W., DELUCAS L. J. High-throughput self-interaction chromatography: applications in protein formulation prediction. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 2, p. 296-305, 2009.
- JORDAN P.J., LAY K., NGAN N., RODLEY G. F. Casein production using high pressure carbon dioxide. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, v. 22, p. 247–256, 1987.
- JUDGE R. A., JOHNS M. R., WHITE, E. T. Protein purification by bulk crystallization: the recovery of ovalbumin. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 316-323, 1995.
- KHORSHID N., HOSSAIN M. M., FARID M. M. Precipitation of food protein using high pressure carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 1214-1220, 2007.
- LADISCH M. R. Bioseparations engineering: Principles, practice, and economics. Wiley-Interscience, New York, 735 p., 2001.
- LE BRUN, V., FRIESS W., SCHULTZ-FADEMRECHT T., MUEHLAU S., GARIDEL P. Lysozyme-lysozyme self-interactions as assessed by the osmotic second virial coefficient: impact for physical protein stabilization. *Biotechnology Journal*, v. 4, p. 1305–1319, 2009.
- LEUNISSEN M. Protein crystallization: an essay on several aspects of protein crystallization research. Disponível em: <<http://people.ds.cam.ac.uk/ml527/publications/assets/leunissenliteraturereseach.pdf>>. Acesso em: 14/01/2014.
- LEVINE I. N. *Physical chemistry*, 6ª ed., New York, McGraw-Hill, 356-358, 2009.

- LIMA L. H. F. *Precipitação de lisozima e insulinas bovina e suína por “salting-out” com uso de eletrólitos voláteis*. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006, 87 p., Tese (Mestrado).
- LIN Y. B., ZHU D. W., WANG T., SONG J., ZOU Y. S., ZHANG Y. L., LIN S. X. An extensive study of protein phase diagram modification: increasing macromolecular crystallizability by temperature screening. *Crystal Growth & Design*, v. 8, p. 4277-4283, 2008.
- LIU Y., WANG X., CHING C. B. Toward further understanding of lysozyme crystallization: phase diagram, prote-protein interaction, nucleation kinetics and growth kinetics. *Crystal Growth & Design*, v. 10, p. 548-558, 2010a.
- LIU H. F., MA J., WINTER C., BAYER R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs*, v. 2, p. 480-499, 2010b.
- LU Y., CHEN D. J., WANG G. K., YAN C. L. Study of interactions of bovine serum albumin in aqueous  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution at 25°C by osmotic pressure measurements. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 54, p. 1975-1980, 2009.
- MCMILLAN W. G., MAYER J. E. The statistical thermodynamics of multicomponent systems. *Journal of Chemical Physics*, v. 13, p. 276-305, 1945.
- MCPHERSON A. *Crystallization of biological macromolecules*, Cold Spring Harbor, New York, 586 p., 1999.
- MEHTA C. M., WHITE E. T., LITSTER J. D. Correlation of second virial coefficient with solubility for proteins in salt solutions. *American Institute of Chemical Engineers*, v. 28, p. 163-170, 2012.
- MELANDER W, HORVÁTH C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 183, p. 200-215, 1977.
- MIERS H. A., ISAAC F. The spontaneous crystallization of binary mixtures: experiments on salol and betol. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, v. 79, n. 531, p. 322-351, 1907.
- MIKOL V., GIEGÉ R. The physical chemistry of protein crystallization. In *Crystallization of nucleic acids and proteins: A practical approach*, IRL Press, Oxford, p. 219-240, 1992.

- MOLLERUP J. M., BREIL M. P. The osmotic second virial coefficient and the Gibbs-McMillan-Mayer framework. *Fluid Phase Equilibria*, v. 286, n. 1, 78-84, 2009.
- MOON Y. U., CURTIS R. A., ANDERSON C. O., BLANCH H. W., PRAUSNITZ J. M. Protein-protein interactions in aqueous ammonium sulfate solutions. Lysozyme and bovine serum albumin (BSA). *Journal of Solution Chemistry*, v. 29 n. 8, 699-717, 2000.
- MORETTI J. J.; SANDLER S. I., LENHOFF A. M. Phase equilibria in the lysozyme-ammonium sulfate-water system. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 70, p. 498-506, 2000.
- MYERSON A. S. *Handbook of industrial crystallization*, edited by Allan S. Myerson, 2<sup>nd</sup> edition, Butterworth, Woburn, 313 p., 2002.
- NEAL B. L., LENHOFF A. M. Excluded-volume contribution to the osmotic 2<sup>nd</sup> virial-coefficient for proteins. *AIChE Journal*, v. 41, p. 1010–1014, 1995.
- NEAL B. L., ASTHAGIRI D., LENHOFF A. M. Molecular origins of osmotic second virial coefficient of proteins. *Biophysical Journal*, v. 75, p. 2469-2477, 1998.
- NORRMAN M., HUBÁLEK F., SCHLUCKEBIER G. Structural characterization of insulin NPH formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30, n. 5, p. 414–423, 2007.
- NÝVLT J. Induction period of nucleation and metastable zone width. *Czechoslovak Chemical Communications*, v. 48, p. 1977-1983, 1983.
- PAYNE R. W., NAYAR R., TARANTINO R., DEL TERZO S., MOSCHERA J., DI, J., HEILMAN D., BRAY B., MANNING M. C., HENRY C. S. Second virial coefficient determination of a therapeutic peptide by self-interaction chromatography. *Biopolymers*, v. 84, p. 527-33, 2006.
- PATRO S. Y., PRZYBYCIEN T. M. Self-interaction chromatography: a tool for the study of protein-protein interactions in bioprocessing environments. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 52, p. 193–203, 1996.
- PRZYBYCIEN T. M. Protein-protein interactions as a means of purification. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 9, p. 164-170, 1998.
- PRAUSNITZ J. M. Molecular thermodynamics for some applications in biotechnology. *Pure and Applied Chemistry*, v. 75, p. 859–873, 2003.
- PRAUSNITZ J. M., LICHTENTHALER R. N., AZEVEDO E. G. Molecular thermodynamics for fluid-phase equilibria, 3<sup>rd</sup> ed, Prentice Hall PTR, New Jersey, 860 p., 1999.

- PYO D. Two different shapes of insulin microparticles produced by solution enhanced dispersion supercritical fluid (SEDS) process. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 30, n. 5, p. 1215-1217, 2009.
- RETAILLEAU P., RIÈS-KAUTT M., DUCRUIX A. No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH. *Biophysical Journal*, v. 73, p. 2156-2163, 1997.
- RETAILLEAU P., DUCRUIX A., RIÈS-KAUTT M. Importance of the nature of anions in lysozyme crystallization correlated with protein net charge variation. *Acta Crystallographica Section D*, v. 58, p. 1576-1581, 2002.
- RIES-KAUTT M. M., DUCRUIX A. F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 2, p. 745-748, 1989.
- ROSENBAUM D.F., ZUKOSKI C.F. Protein interactions and crystallization. *Journal of Crystal Growth*, v. 169, p. 752-758, 1996.
- RUCKENSTEIN E., SHULGIN I. L. Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 123-126, p. 97-103, 2006.
- RUDOLPH R., LILIE H., SCHWARZ E. *In vitro* folding of inclusion body proteins on an industrial scale, in *Biotechnology: Recombinant Proteins, Monoclonal Antibodies and Therapeutic Genes, Volume 5a, Second Edition* (eds H.-J. Rehm and G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, p. 111-123 (1999).
- RUPPERT S., SANDLER S. I., LENHOFF A. M. Correlation between the osmotic second virial coefficient and the solubility of proteins. *Biotechnology Progress*, v. 17, p. 182-187, 2001.
- SALT D. J., LESLIE R. B., LILLFORD P. J., DUNNILL P. Factors influencing protein structure during acid precipitation: a study of soya proteins. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 14, p. 144-148, 1982.
- SARIDAKIS E. E. G., STUART S. P. D., LLOYD L. F., BLOW D. M. Phase diagram and dilution experiments in the crystallization of carboxypeptidase G2. *Acta Crystallographica Section D*, v. 50, p. 293-297, 1994.
- SARIDAKIS E., CHAYEN N. E. Systematic improvement of protein crystals by determining the supersolubility curves of phase diagrams. *Biophysical Journal*, v. 84, p. 1218-1222, 2003.

- SCHAIK H. M., SMIT J. A. M. Determination of the osmotic second virial coefficient and the dimerization of  $\beta$ -lactoglobulin in aqueous solution with added salt at the isoelectric point. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 2, p. 1537-1541, 2000.
- SCHWARTZ A. M., MYERSON A. S. Handbook of industrial crystallization, edited by Allan S. Myerson, 2<sup>nd</sup> edition, Butterworth, Woburn, 2002. Cap. 1: Solutions and solution properties, p. 1-31.
- SCHLICHTKRULL J. Insulin Crystals: II. Shape of rhombohedral Zn-insulin crystals in relation to species and crystallization media. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 10, p. 1459-1464, 1956.
- SCOPES R. K. Protein purification, 2<sup>a</sup> ed., New York, Springer-Verlag New York Inc., 1988.
- SHENOY B., WANG Y., SHAN W., MARGOLIN A. L. Stability of crystalline proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 73, n. 5, p. 358-69, 2001.
- SHIAU K. S., CHEN T. L. Initial protein concentration effects on precipitation by salt. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 53, p. 202–206, 1997.
- SHIH Y. C., PRAUSNITZ J. M., BLANCH H. W. Some characteristics of protein precipitation by salts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, p. 1155-1164, 1992.
- SILVA L. L. Avaliação do efeito do sal volátil carbamato de amônio sobre a estabilidade de enzimas. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008, 109 p., Tese (Mestrado).
- SILVA L. L., PESSÔA FILHO P. A., MIRANDA E. A., Evaluation of the effect of ammonium carbamate on the stability of proteins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, p. 962-967, 2010.
- SMEJKAL B., HELK B., RONDEAU J. M., ANTON S., WILKE A., SCHEYERER P., FRIES J., HEKMAT D., WEUSTER-BOTZ D. Protein crystallization in stirred systems—scale-up via the maximum local energy dissipation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 110, n. 7, p. 1956-1963, 2013a.
- SMEJKAL B., AGRAWAL N. J., HELK B., SCHULZ H., GIFFARD M., MECHELKE M., ORTNER F., HECKMEIER P., TROUT B. L., HEKMAT D. Fast and scalable purification of a therapeutic full-length antibody based on process crystallization. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 110, n. 9, p. 2452-2461, 2013b.

- TALREJA S., PERRY S. L., GUHA S., BHAMIDI V., ZUKOSKI C. F., KENIS P. J. A. Determination of the Phase Diagram for Soluble and Membrane Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, p. 4432–4441, 2010.
- TASHIMA, A. K. *Estudo da precipitação isoelétrica da insulina suína em soluções aquosas com o dióxido de carbono*. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007, 208 p., Tese (Doutorado).
- TASHIMA A. K., OTTENS M., VAN DER WIELEN L., CYNTRA D. E., PAULI J. R., PESSÔA FILHO P. A., MIRANDA E. A. Precipitation of porcine insulin with carbon dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, p. 909-9019, 2009.
- TESSIER P. M., LENHOFF A. M., SANDLER S. I. Rapid measurement of protein osmotic second virial coefficients by self-interaction chromatography. *Biophysical Journal*, v. 82, p. 1620-1631, 2002a.
- TESSIER P. M., VANDREY S. D., BERGER B. W., PAZHIANUR R., SANDLER A. I., LENHOFF A. M. Self-interaction chromatography: a novel screening method for rational protein crystallization. *Acta Crystallographica D*, v. 58, p. 1531-1535, 2002b.
- TESSIER P. M., LENHOFF A. M. Measurements of protein self-association as a guide to crystallization. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, p. 512–516, 2003.
- TESSIER P. M., JOHNSON H. R., PAZHIANUR R., BERGER B. W., PRENTICE J. L., BAHNSON B. J., SANDLER S. I., LENHOFF A. M. Predictive crystallization of ribonuclease a via rapid screening of osmotic second virial coefficients. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, v. 50, p. 303–311, 2003.
- THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 4th ed. Geneva: WHO, 2013.
- THIERING R., HOFLAND G., FOSTER N., WITKAMP G. J., VAN DE WIELEN L. Carbon dioxide induced soybean protein precipitation: protein fractionation, particle aggregation, and continuous operation. *Biotechnology Progress*, v. 17, p. 513–521, 2001.
- TREVINO S. R., SCHOLTZ J. M., PACE C. N. Measuring and increasing protein solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 4155-4166, 2008.
- ULRICH J., BÜLAU H. C. Handbook of industrial crystallization, edited by Allan S. Myerson, 2<sup>nd</sup> edition, Butterworth, Woburn, 2002. Cap. 7: Melt crystallization, p. 161-179.

- VAN BERLO M., OTTENS M., LUYBEN K. C., VAN DER WIELEN, L. A. Feasible boundaries of aqueous two-phase systems with  $\text{nh}_3$  and  $\text{co}_2$  as recyclable volatile salts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 70, n. 1, p. 65-71, 2000.
- VAN ROSMALEN G. M., BERMINGHAM S., BRUINSMA D., KRAMER H., DERENZO S., SECKLER M., RÉ M. I., CEKINSKI E., GIULIETTI M. TU DELFT – IPT lectures on industrial crystallization and precipitation, 2004.
- VALENTE J. J., PAYNE R. W., MANNING, M. C., WILSON W. W., HENRY C. S. Colloidal behavior of proteins: effects of the second virial coefficient on solubility, crystallization and aggregation of proteins in aqueous solution. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 6, n. 6, p. 427-436, 2005.
- VELEV O. D., KALER E. W., LENHOFF A. M. Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen. *Biophysical Journal*, v. 75, p. 2682-2697, 1998.
- WATANABE E. O. *Estudo da precipitação de tripsina com uso de sais voláteis*. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004, 97 p., Tese (Mestrado).
- WATANABE E. O., PESSÔA FILHO P. A., MIRANDA E. A., MOHAMED, R. S. Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 124-129, 2006.
- WATANABE E. O. , POPOVA E., MIRANDA E. A., MAURER G., PESSÔA FILHO P. A. Phase equilibria of lysozyme precipitation with the volatile salt ammonium carbamate. *Fluid Phase Equilibria*, v. 292, p. 42-47, 2010.
- WEBER P. C. Physical principles of protein crystallization. *Advances in Protein Chemistry*, v. 41, p. 1-36, 1991.
- WHITTINGHAM J. L., CHANCE K., WILSON A., FINCH J., BRANGE J., SCOTT D. J., DODSON G. G. Insulin at pH2: Structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *Journal of Molecular Biology*, v. 318, n. 2, p. 479-490, 2002.
- WU J., PRAUSNITZ J. M. Osmotic pressures of aqueous bovine serum albumin solutions at high ionic strength. *Fluid Phase Equilibria*, v. 155, p. 139-154, 1999.

YU J., LI A., CHEN X, CHEN Y, XIE J., WU J., YING H. Experimental determination of metastable zone width, induction period, and primary nucleation kinetics of cytidine 5'-monophosphate disodium salt in an ethanol–aqueous mixture. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 58, p. 1244–1248, 2013.

ZANG Y., KAMMERE B., EISENKOLB M., LOHR K., KIEFER H. Towards protein crystallization as a process step in downstream processing of therapeutic antibodies: screening and optimization at microbatch scale. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, e25282 p. 1-8, 2011.

ZHANG Y., CREMER P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, p. 658–663, 2006.

ZHANG Y., CREMER P. S. The inverse and direct Hofmeister series for lysozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 36, p. 15249–15253, 2009.

ZHANG Y., CREMER P. S. Chemistry of hofmeister anions and osmolytes. *Annual Review of Physical Chemistry*, v. 61, p. 63–83, 2010.

ZIMM B. H. Application of the methods of molecular distribution to solutions of large molecules. *The Journal of Chemical Physics*, v.14. n. 3, p. 164-179,1946.



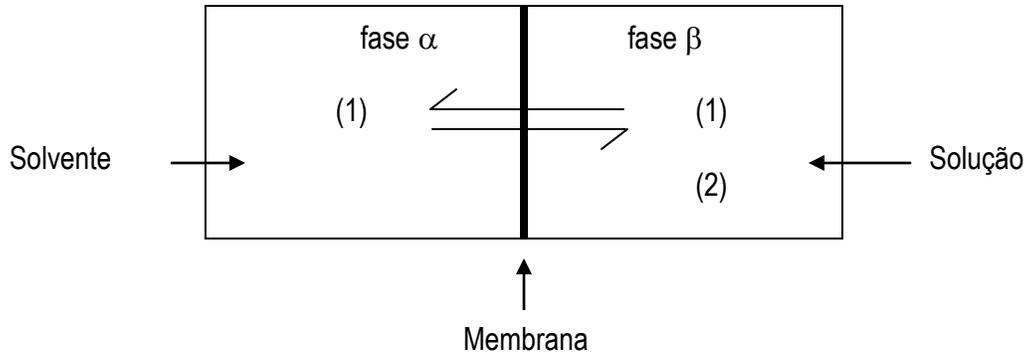
---

## APÊNDICE 1

Moléculas na fase gasosa a baixa pressão interagem em um meio “livre” (vácuo) enquanto solutos dissolvidos interagem em um meio solvente. A diferença essencial é que a interação entre duas moléculas em um solvente é influenciada pela natureza molecular do solvente, enquanto no vácuo não há influência do meio na interação de duas moléculas. A interação entre duas moléculas em um solvente é descrita pelo potencial de força média,  $w$ , que é importante na ciência dos colóides e na físico-química de soluções protéicas. Para duas moléculas em um solvente, o potencial intermolecular inclui a energia de interação soluto-soluto e também qualquer mudança na energia de interação solvente-soluto e solvente-solvente quando as moléculas se aproximam. Uma molécula de soluto se aproxima de outra molécula de soluto deslocando uma molécula de solvente. Para uma distância fixa de separação, em um meio “livre”, duas moléculas podem se atrair, mas em solvente elas podem se repelir caso o trabalho necessário para deslocar uma molécula de solvente exceda o que foi ganho na aproximação das moléculas de soluto. A ordenação local das moléculas de solvente geralmente são perturbadas pelas moléculas de soluto. Se a energia associada a essa perturbação depende da distância entre as duas moléculas dissolvidas, essa energia produz uma força de solvatação adicional entre elas (PRAUSNITZ *et al.*, 1999). A natureza molecular do solvente pode produzir potenciais de força média muito diferentes daqueles correspondentes ao potencial de interação de dois corpos no vácuo.

A teoria de solução de McMillan-Mayer (1945) fornece uma relação quantitativa entre o potencial de força média com propriedades termodinâmicas macroscópicas, os coeficientes viriais. Os coeficientes viriais osmóticos podem ser obtidos a partir de medidas experimentais de pressão osmótica, um fenômeno frequentemente encontrado na natureza, especialmente em sistemas biológicos.

Considerando um sistema separado por um membrana semi-permeável em duas partes,  $\alpha$  e  $\beta$  (Figura A1.1):



**Figura A1.1** – Diagrama esquemático de um equilíbrio osmótico. Membrana é permeável ao solvente (1), mas não ao soluto (2).

Considerando que as fases  $\alpha$  e  $\beta$  estão na mesma temperatura, a pressão na fase  $\alpha$  é  $P$ , enquanto na fase  $\beta$  é  $P+\pi$ , a equação de equilíbrio químico é:

$$\mu_1^\alpha = \mu_1^\beta \quad (\text{A.1})$$

em que o potencial químico  $\mu$  é dado por:

$$\mu_1^\alpha = \mu_{1,puro}^\alpha(T, P) \quad (\text{A.2})$$

$$\mu_1^\beta = \mu_{1,puro}^\beta(T, P + \pi) + RT \ln a_1$$

em que  $a$  é a atividade relacionada a composição:

$$a_1 = \gamma_1 X_1 \quad (\text{A.3})$$

em que  $\gamma$  é o coeficiente de atividade e  $x$  é a fração molar.

Para um fluido puro:

$$\left(\frac{\partial \mu}{\partial P}\right)_T = v \quad (\text{A.4})$$

Assumindo que o volume molar,  $v$  não varia com a pressão (fluido incompressível), tem-se:

$$\mu_{1,puro}(P + \pi) = \mu_{1,puro}(P) + \pi v_{1,puro} \quad (\text{A.5})$$

Reescrevendo a Equação (A.3):

$$-\ln a_1 = \frac{\pi v_{1,puro}}{RT} \quad (\text{A.6})$$

Se a solução na fase  $\beta$  é diluída,  $x_1$  é próximo de 1 e a Equação (A.6) torna-se:

$$-\ln x_1 = \frac{\pi v_{1,puro}}{RT} \quad (\text{A.7})$$

Quando  $x_2 \ll 1$ ,  $\ln x_1 = \ln(1-x_2) \approx -x_2$ . Assim, reescrevendo a Equação (A.6):

$$\pi v_{1,puro} = x_2 RT \quad (\text{A.8})$$

Como  $x_2 \ll 1$ ,  $n_2 \ll n_1$  e  $x_2 \approx n_2/n_1$ . A Equação (A.6) torna-se então:

$$\pi V = n_2 RT \quad (\text{A.9})$$

em que  $V = n_1 v_{1,puro}$  é o volume total disponível para  $n_2$  mols de soluto.

A Equação A.9 é a equação de van't Hoff para a pressão osmótica  $\pi$ , análoga à equação de gás ideal assumindo que a solução é muito diluída e incompressível. Para concentrações finitas de soluto a Equação A.7 é expressa como uma expansão em série em função da concentração mássica (g/L):

$$\frac{\pi}{c_P} = RT \left( \frac{1}{M_p} + B_{22} c_P + B_{222} c_P^2 + \dots \right) \quad (\text{A.10})$$

Em que  $M_p$  é a massa molar do soluto, o segundo coeficiente virial osmótico é  $B_{22}$  e o terceiro coeficiente é  $B_{222}$ , etc.

---

## APÊNDICE 2

Apresentam-se nesta seção os resultados de coleta de dados diversos necessários para a obtenção do valor de  $B_{22}$ , ou seja, dados de índice de refração, densidade, viscosidade e incremento do índice de refração com a temperatura e solubilidade das soluções de carbamato de amônio. As curvas de calibração para determinação da concentração das proteínas na solução de sal volátil também são apresentadas nesta seção.

### A2.1 Índice de refração, densidade e viscosidade das soluções de carbamato de amônio nas temperaturas de 15 °C e 25 °C

**Tabela A2.1** - Índice de refração ( $n_0$ ) para a água e para as soluções de carbamato de amônio.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	$n_0$ (nD)	
	15 °C	25 °C
3,5665	1,3876	1,3840
2,9375	1,3786	1,3750
2,4404	1,3714	1,3680
1,8601	1,3626	1,3594
1,2964	1,3539	1,3512
0,6943	1,3447	1,3427

**Tabela A2.2** - Densidade das soluções do sal volátil carbamato de amônio em diferentes temperaturas.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )		
	5 °C	15 °C	25 °C
0,06	-	1,00131	0,99902
0,25	-	1,00841	1,00558
0,45	-	1,01562	1,01233
0,69	1,02749	1,02442	1,02061
0,90	-	1,03221	1,02791
1,09	-	1,03941	1,03481
1,29	1,05008	1,04588	1,04108
1,86	1,07044	1,06524	1,05958
2,44	1,09030	1,08453	1,07814
2,94	1,10666	1,10029	1,09423
3,55	1,12578	1,11925	1,11247

**Tabela A2.3** - Viscosidade das soluções sal volátil de carbamato de amônio em diferentes temperaturas.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Viscosidade (cP)		
	5 °C	15 °C	25 °C
0,06	-	1,1637	0,9140
0,25	-	1,1973	0,9415
0,45	-	1,2335	0,9702
0,69	1,7747	1,3451	1,0548
0,90	-	1,3513	1,0623
1,09	1,7747	1,4022	1,1019
1,30	1,9550	1,4777	1,1597
1,86	2,2244	1,6803	1,3145
2,44	2,5484	1,9184	1,4920
2,94	2,9456	2,2026	1,7016
3,55	3,5329	2,6193	2,0054

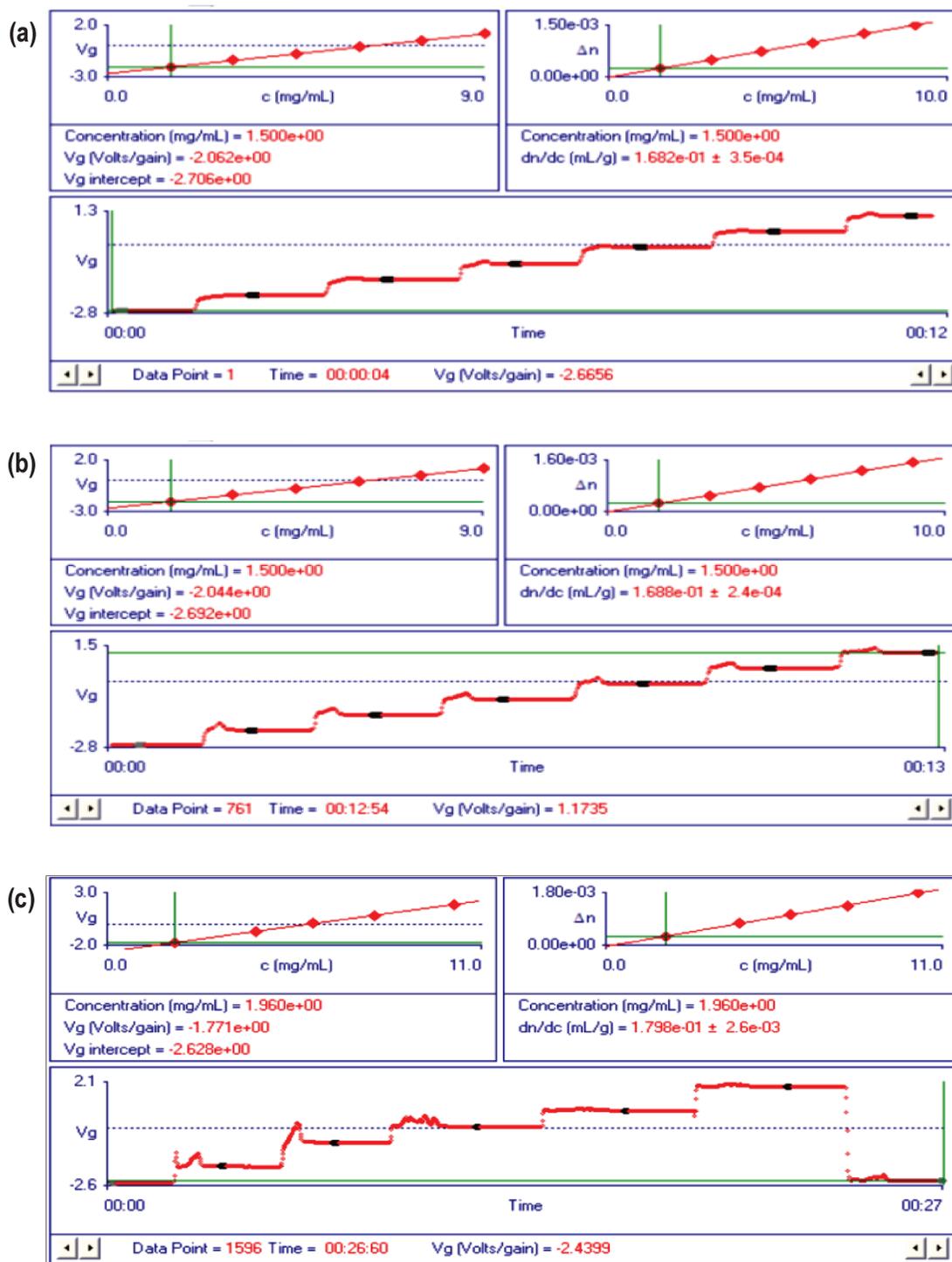
## A2.2 Determinação do incremento do índice de refração em função da concentração da proteína para a lisozima a 25 °C

**Tabela A2.4** - Incremento do índice de refração em função da concentração da lisozima a 25 °C.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	dn/dc <sub>P</sub> (mL/g)
0,69	0,1778 ± 0,0079
1,29	0,1798 ± 0,0026
1,86	0,1884 ± 0,0370
2,44	0,1830 ± 0,0230
2,94	-0,5005 ± 0,1300
3,56	0,4634 ± 0,1300

Nota: Devido a baixa solubilidade da lisozima em carbamato de amônio para as concentrações mais altas de sal (2,94 e 3,56 mol/kg), e por causa da limitação técnica do equipamento, os valores de dn/dc<sub>P</sub> não são confiáveis para estas condições (erro > 25%). O valor de 0,18 mL/g foi assumido para todas as condições de sal utilizada, uma vez que, este valor é próximo das medidas dos valores para as outras concentrações de sal medidas e é comum para várias proteínas em diferentes sistemas citados na literatura. O erro da medida também foi utilizado como critério para considerar o valor adotado de dn/dc<sub>P</sub>.

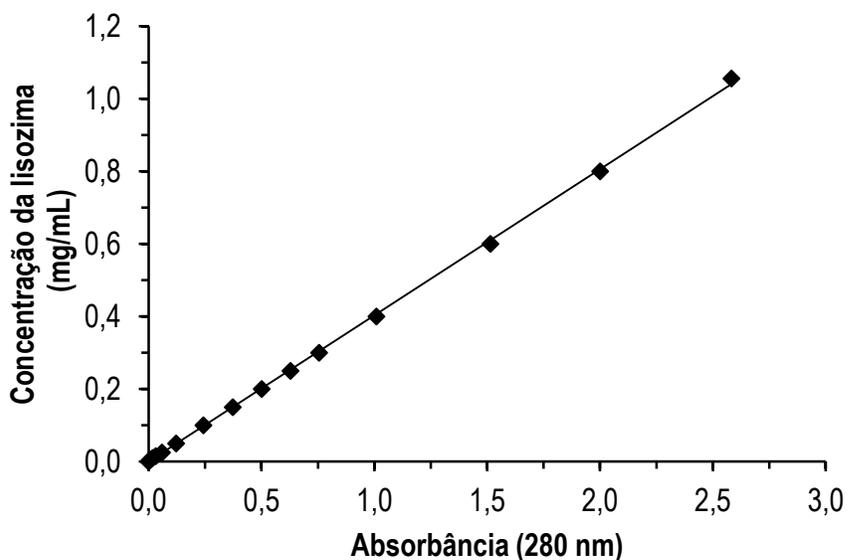
Para as insulinas suína e bovina também foram determinados os valores do incremento do índice de refração em função da concentração destas proteínas a 25 °C (Figura A2.2). Para a insulina suína o valor do parâmetro dn/dc<sub>P</sub> foi de 0,168 (mL/g) e para a insulina bovina foi de 0,169 (mL/g).



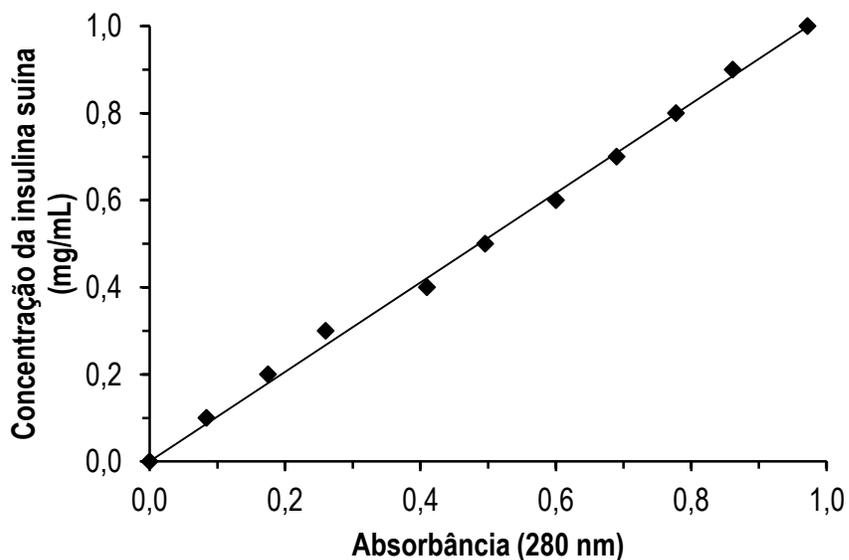
**Figura A2.1** – Determinação do incremento do índice de refração em função da concentração da proteína para a insulina suína (a), bovina (b) em carbamato de amônio 0,06 mol/kg e lisozima (c) em carbamato de amônio 1,29 mol/kg a 25 °C.

### A2.3 Curvas padrão para dosagem de proteína por absorvância a 280 nm

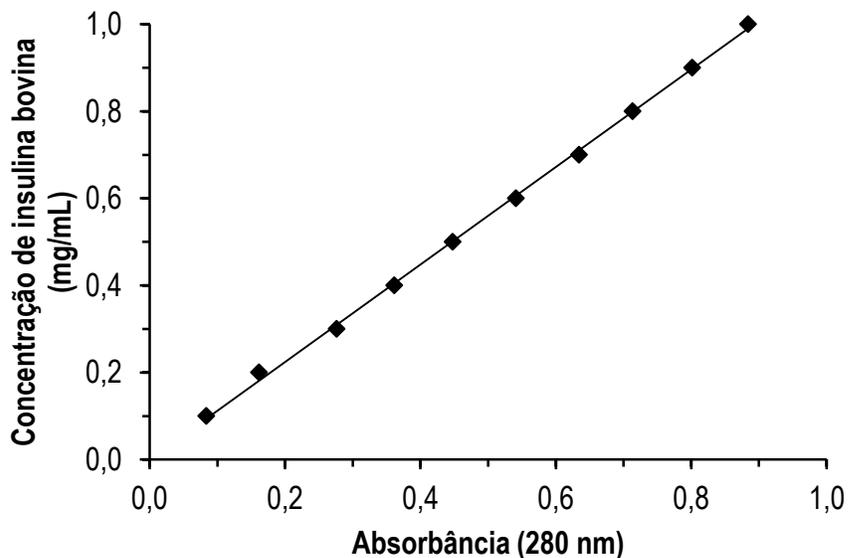
Para os ensaios de solubilidade e cristalização das proteínas lisozima, insulinas suína e bovina as medidas da concentração das moléculas em solução foram determinadas por absorvância a 280 nm e calculadas de acordo com a equação da reta obtida pela curva de calibração (Figuras A2.3 a A2.5). A curva padrão determina o coeficiente de absorção específico da proteína em questão e correlaciona de forma linear a concentração da proteína com os valores de absorvância medidos. Para os ensaios de cromatografia de auto-interação também foram construídas as curvas padrão para as três proteínas para se determinar a quantidade de proteína imobilizada no suporte cromatográfico (Figuras A2.6 a A2.8).



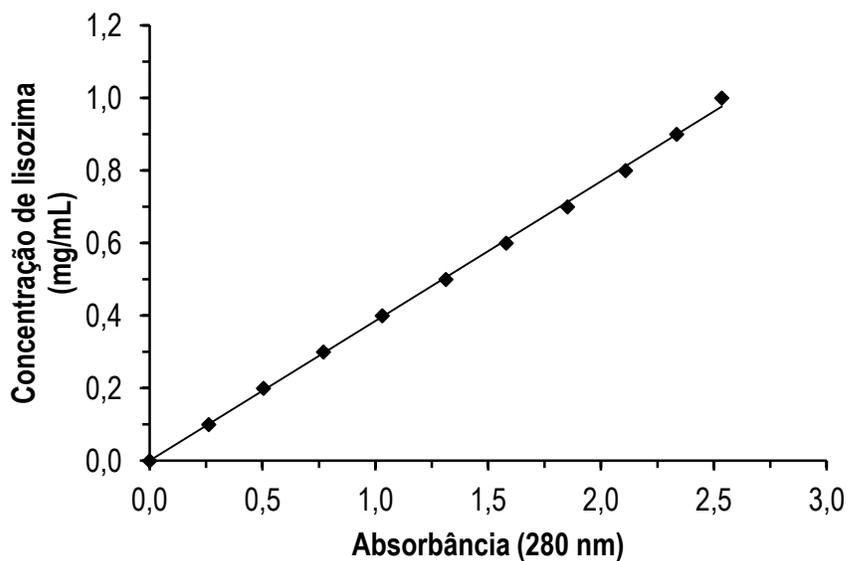
**Figura A2.2** – Curva padrão para a medida de absorvância a 280 nm da solução de lisozima em água, Concentração de lisozima =  $0,4029 \times$  Absorvância (280 nm),  $R^2 = 0,999$ .



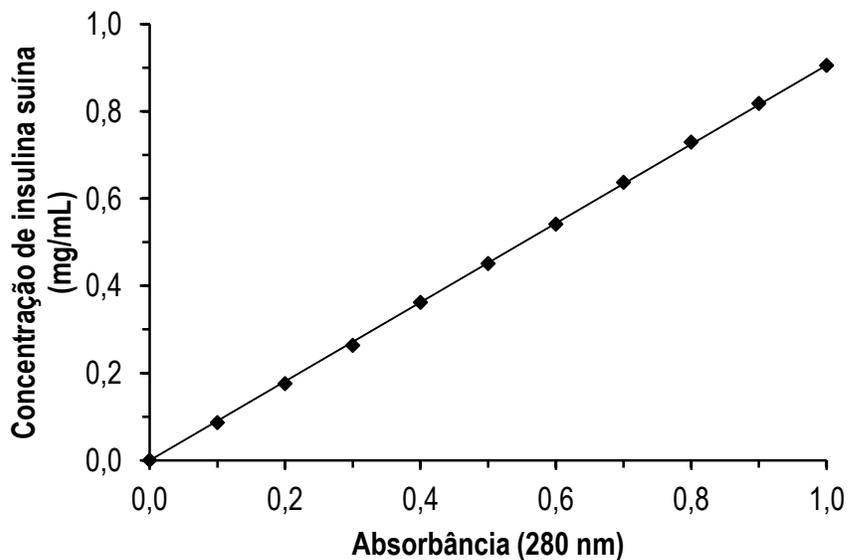
**Figura A2.3** – Curva padrão para a medida de absorbância a 280 nm da solução de insulina suína em carbamato de amônio 0,06 mol/kg, Concentração de insulina suína =  $1,0273 \times$  Absorbância (280 nm),  $R^2 = 0,998$ .



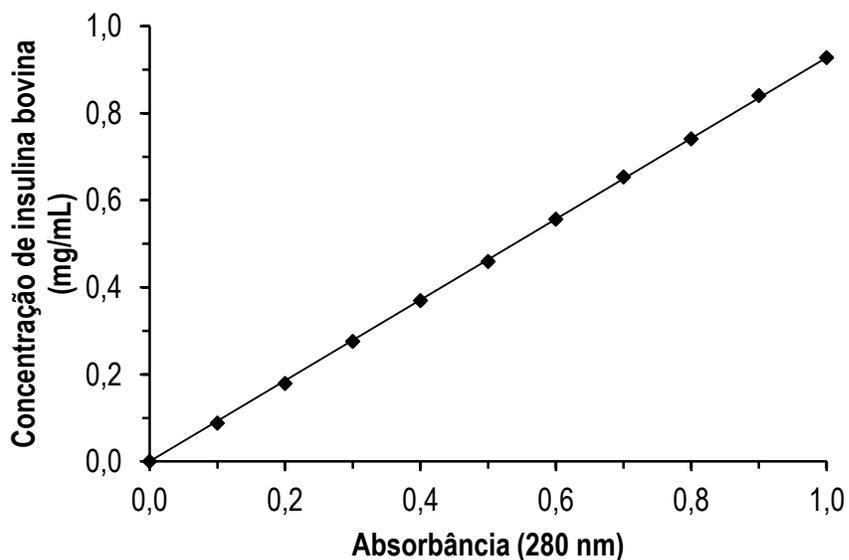
**Figura A2.4** – Curva padrão para a medida de absorbância a 280 nm da solução de insulina bovina em carbamato de amônio 0,06 mol/kg, Concentração de insulina bovina =  $1,1202 \times$  Absorbância (280 nm),  $R^2 = 0,999$ .



**Figura A2.5** – Curva padrão para a medida de absorbância a 280 nm da solução de lisozima em  $\text{NaHCO}_3$  0,1 mol/L e NaCl 0,5 mol/L, Concentração de lisozima =  $0,385 \times$  Absorbância (280 nm),  $R^2 = 0,999$ .



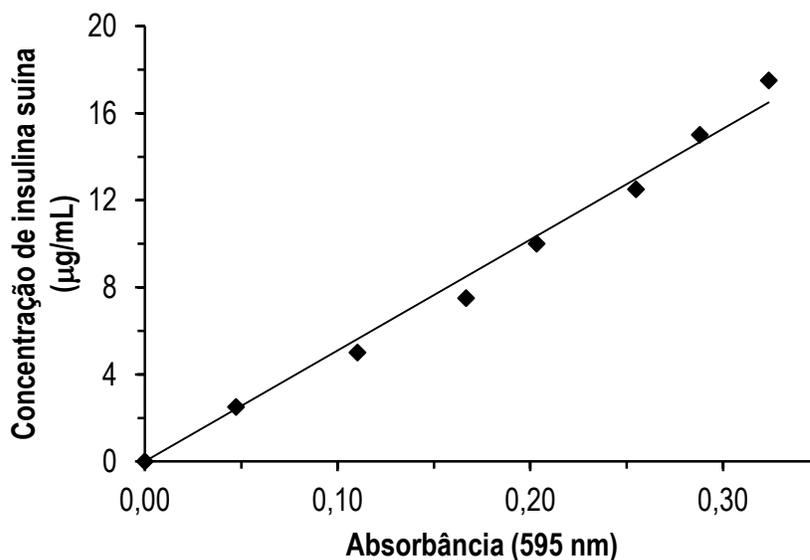
**Figura A2.6** – Curva padrão para a medida de absorbância a 280 nm da solução de insulina suína em  $\text{NaHCO}_3$  0,1 mol/L e NaCl 0,5 mol/L, Concentração de insulina suína =  $0,906 \times$  Absorbância (280 nm),  $R^2 = 0,999$ .



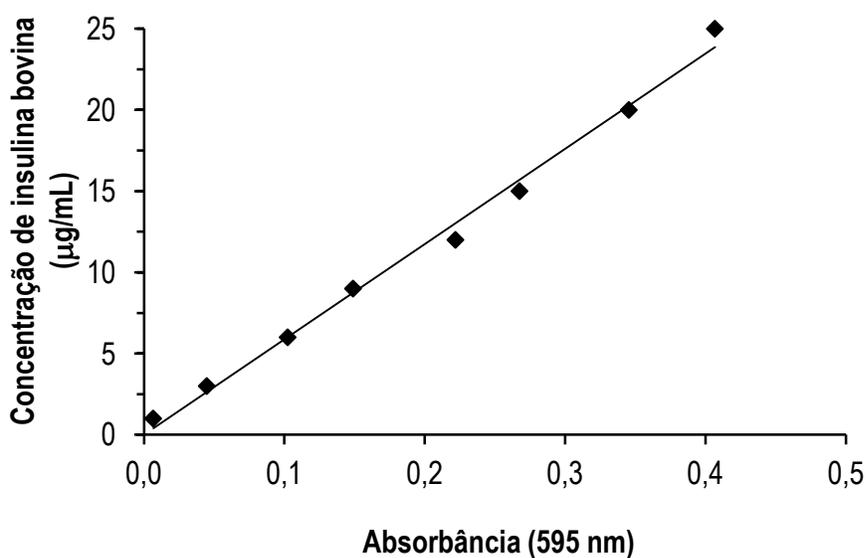
**Figura A2.7** – Curva padrão para a medida de absorbância a 280 nm da solução de insulina bovina em  $\text{NaHCO}_3$  0,1 mol/L e  $\text{NaCl}$  0,5 mol/L, Concentração de insulina bovina =  $0,928 \times$  Absorbância (280 nm),  $R^2 = 0,999$ .

#### A2.4 Curvas padrão para dosagem de proteína por absorbância a 595 nm

Para a determinação da solubilidade, nos ensaios de dissolução de proteína, nas maiores concentrações de sal volátil (3,55 a 1,86 mol/kg) em que a solubilidade das insulinas suína e bovina foi muito baixa, as medidas da concentração da proteína em solução foram determinadas pelo método de Bradford modificado (método de maior sensibilidade para valores menores de concentração) e calculadas de acordo com a equação da reta obtida pela curva de calibração (Figuras A2.9 e A2.10).



**Figura A2.8** – Curva padrão para a medida de absorvância a 595 nm da solução de insulina suína em bicarbonato de amônio 10 mmol/L, Concentração de insulina suína =  $50,93 \times$  Absorvância (280 nm),  $R^2 = 0,989$ .



**Figura A2.9** – Curva padrão para a medida de absorvância a 595 nm da solução de insulina bovina em bicarbonato de amônio 10 mmol/L, Concentração de insulina bovina =  $58,68 \times$  Absorvância (280 nm),  $R^2 = 0,993$ .

### A2.5 Solubilidade das proteínas lisozima, insulina suína e insulina bovina em carbamato de amônio a 15 e 25 °C

**Tabela A2.5** – Dados de solubilidade para a insulina bovina em diferentes concentrações de carbamato de amônio a 15 e 25 °C.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Concentração de insulina bovina (mg/mL)	
	15 °C	25 °C
3,55	0,0012 ± 0,0001	0,0005 ± 0,0001
2,94	0,0083 ± 0,0001	0,0027 ± 0,0004
2,44	0,0369 ± 0,0002	0,0107 ± 0,0014
1,86	0,1251 ± 0,0065	0,0766 ± 0,0050
1,29	0,5426 ± 0,0089	0,2775 ± 0,0208
1,09	0,5732 ± 0,0465	0,5328 ± 0,0376
0,90	0,9806 ± 0,0159	0,9638 ± 0,0100
0,69	3,5566 ± 0,2034	2,0138 ± 0,0596
0,45	24,5287 ± 0,4171	16,5342 ± 0,5586
0,25	104,8104 ± 1,0535	105,5751 ± 2,7242
0,06	125,5184 ± 4,8531	136,6022 ± 2,2750

\* Erros representados pelo desvio padrão para N=3.

**Tabela A2.6** – Dados de solubilidade para a insulina suína em diferentes concentrações de carbamato de amônio a 15 e 25 °C.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Concentração de insulina suína (mg/mL)	
	15 °C	25 °C
3,55	0,0003 ± 0,0001	0,0002 ± 0,0001
2,94	0,0026 ± 0,0006	0,0099 ± 0,0018
2,44	0,0136 ± 0,0027	0,0408 ± 0,0025
1,86	0,0863 ± 0,0154	0,1658 ± 0,0048
1,29	0,6227 ± 0,0284	0,7833 ± 0,0458
1,09	0,9980 ± 0,0300	1,0660 ± 0,0840
0,90	1,8910 ± 0,0530	2,1150 ± 0,0840
0,69	7,6093 ± 0,5891	8,0901 ± 0,2805
0,45	84,0656 ± 2,1667	82,1762 ± 2,8473
0,25	81,8132 ± 3,2726	89,4494 ± 3,3046
0,06	106,1500 ± 9,3914	117,0100 ± 7,9498

\* Erros representados pelo desvio padrão para N=3.

**Tabela A2.7** – Dados de solubilidade para a lisozima em diferentes concentrações de carbamato de amônio a 15 e 25 °C.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	Concentração de lisozima (mg/mL)	
	15 °C	25 °C
3,55	0,0960 ± 0,0001	0,0330 ± 0,0002
2,94	0,1810 ± 0,0006	0,0550 ± 0,0018
2,44	0,3130 ± 0,0027	0,2960 ± 0,0025
1,86	0,9450 ± 0,0154	0,7800 ± 0,0048
1,29	1,7300 ± 0,0284	2,2800 ± 0,0458
1,09	2,1600 ± 0,0300	2,9030 ± 0,0840
0,90	2,3200 ± 0,0558	3,6500 ± 0,0840
0,69	1,8300 ± 0,5891	4,2350 ± 0,4317
0,45	2,7530 ± 0,2058	3,9200 ± 0,1147
0,25	3,4400 ± 0,4234	3,4470 ± 0,2059
0,06	3,4240 ± 0,1809	7,5100 ± 0,6109

\* Erros representados pelo desvio padrão para N=3.

### A2.6 Dados de $B_{22}$ para as proteínas de interesse em carbamato de amônio a 15 e 25 °C determinados por SLS

**Tabela A2.8** – Valores de  $B_{22}$  para a lisozima em carbamato de amônio a 25 °C e 15 °C obtidos por espalhamento de luz.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	$B_{22 \text{ exp } 25 \text{ °C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )	$B_{22 \text{ exp } 15 \text{ °C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )
1,29	-0,00204 ± 0,00029	-0,04000 ± 0,01650
1,09	-0,00080 ± 0,00026	-0,01140 ± 0,00773
0,90	-0,00102 ± 0,00007	-0,00518 ± 0,00485
0,69	-0,00067 ± 0,00011	-0,00341 ± 0,00101
0,45	-0,00036 ± 0,00012	-0,00175 ± 0,00067
0,25	-0,00075 ± 0,00017	-0,00144 ± 0,00021
0,06	-0,00062 ± 0,00012	-0,00278 ± 0,00112

**Nota:** erro experimental fornecido pelo equipamento Zetasizer Nano (Malvern, Inglaterra) e calculado pelo método dos mínimos quadrados.

**Tabela A2.9** – Valores de  $B_{22}$  para a insulina suína em carbamato de amônio a 25 °C e 15 °C obtidos por espalhamento de luz.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	$B_{22 \text{ exp } 25 \text{ °C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )	$B_{22 \text{ exp } 15 \text{ °C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )
0,90	-0,02500 ± 0,00744	-0,01870 ± 0,00245
0,69	-0,00450 ± 0,00034	-0,00473 ± 0,00019
0,45	-0,00210 ± 0,00037	-0,00452 ± 0,00050
0,25	-0,00170 ± 0,00041	-0,00473 ± 0,00059
0,06	-0,00180 ± 0,00086	-0,00678 ± 0,00079

**Nota:** erro experimental fornecido pelo equipamento Zetasizer Nano (Malvern, Inglaterra) e calculado pelo método dos mínimos quadrados.

**Tabela A2.10** – Valores de  $B_{22}$  para a insulina bovina em carbamato de amônio a 25 °C e 15 °C obtidos por espalhamento de luz.

Concentração de carbamato de amônio (mol/kg)	$B_{22 \text{ exp } 25 \text{ °C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )	$B_{22 \text{ exp } 15 \text{ °C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )
1,29	-0,04830 ± 0,01750	-
1,09	-0,09990 ± 0,02310	-
0,90	-0,04740 ± 0,00976	-0,05330 ± 0,01730
0,45	-0,00145 ± 0,00039	-0,00401 ± 0,00110
0,25	-0,00191 ± 0,00032	-0,00167 ± 0,00036
0,06	-0,00067 ± 0,00033	-0,00199 ± 0,00072

**Nota:** erro experimental fornecido pelo equipamento Zetasizer Nano (Malvern, Inglaterra) e calculado pelo método dos mínimos quadrados.

### APÊNDICE 3

Neste Apêndice são apresentados os dados utilizados para a determinação dos ajustes dos parâmetros de cada correlação teórica estudada.

#### A.3.1 Correlação entre o segundo coeficiente virial osmótico e a solubilidade de proteínas

**Tabela A.3.1** – Dados de solubilidade e  $B_{22}$  utilizados para a estimativa do parâmetro ajustável (A) do modelo teórico de Haas *et al.* (1999).

INSULINA SUÍNA				
Carbamato de amônio (mol/kg)	Solubilidade calculada (mg/mL)	$B_{22}$ calc 15 °C (mL.mol/g <sup>2</sup> )	Solubilidade calculada (mg/mL)	$B_{22}$ calc 25 °C (mL.mol/g <sup>2</sup> )
0,90	1,2388	-0,01668	0,4402	-0,01643
0,69	142,6889	-0,01136	178,1406	-0,01134
0,45	164,0083	-0,00560	1478,2014	-0,00573
0,25	142,6889	-0,00565	2149,1265	-0,00558
0,06	45,0589	-0,00520	1944,6509	-0,00512

LISOZIMA				
Carbamato de amônio (mol/kg)	Solubilidade calculada (mg/mL)	$B_{22}$ calc 15 °C (mL.mol/g <sup>2</sup> )	Solubilidade calculada (mg/mL)	$B_{22}$ calc 25 °C (mL.mol/g <sup>2</sup> )
1,29	0,28284	-0,01603	0,8417	-0,001157
0,69	3,38324	-0,01433	5,5196	-0,000793
0,45	15,62648	-0,01381	13,0791	-0,000832
0,25	34,50152	-0,01558	4,6179	-0,000901
0,06	116,45566	-0,01266	6,1905	-0,000543

Tabela A.3.1 – Continuação.

INSULINA BOVINA				
Carbamato de amônio (mol/kg)	Solubilidade calculada (mg/mL)	$B_{22 \text{ calc } 15^\circ\text{C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )	Solubilidade calculada (mg/mL)	$B_{22 \text{ calc } 25^\circ\text{C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )
1,29	0,2717	-0,0381	1,6398	-0,076963
1,09	2,5517	-0,0270	0,1011	-0,064934
0,90	-	-	1,7602	-0,055585
0,45	1725,8623	-0,0158	29872,4148	-0,025805
0,25	11409,3524	-0,0103	20090,8952	-0,015135
0,06	8308,1747	-0,0098	65041,7857	-0,014006

Tabela A.3.2 – Dados de solubilidade e  $B_{22}$  utilizados para a estimativa dos parâmetros ajustáveis (Ac e K) do modelo teórico de Ruppert *et al.* (2001).

INSULINA SUÍNA				
Carbamato de amônio (mol/kg)	Solubilidade calculada (mg/mL)	$B_{22 \text{ calc } 15^\circ\text{C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )	Solubilidade calculada (mg/mL)	$B_{22 \text{ calc } 25^\circ\text{C}}$ (mL.mol/g <sup>2</sup> )
0,90	16,058	-0,15755	6,166	-0,08131
0,69	65,081	-0,03929	29,266	-0,01851
0,45	68,211	-0,00370	60,049	-0,00147
0,25	65,081	-0,00379	70,091	-0,00135
0,06	44,928	-0,00296	67,170	-0,00103

Tabela A.3.2 – Continuação.

<b>LISOZIMA</b>				
<b>Carbamato de amônio (mol/kg)</b>	<b>Solubilidade calculada (mg/mL)</b>	<b><math>B_{22}</math> calc<sup>15 °C</sup> (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>	<b>Solubilidade calculada (mg/mL)</b>	<b><math>B_{22}</math> calc<sup>25 °C</sup> (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>
1,29	0,540	-0,01054	1,686	-0,001452
1,09	1,617	-0,00815	3,913	-0,001109
0,90	3,188	-0,00750	3,128	-0,000860
0,69	4,557	-0,00988	4,600	-0,000731
0,45	8,044	-0,00615	8,277	-0,000795
0,25	9,496	-0,00474	4,135	-0,000916
0,06	5,423	-0,00477	4,933	-0,000398

<b>INSULINA BOVINA</b>				
<b>Carbamato de amônio (mol/kg)</b>	<b>Solubilidade calculada (mg/mL)</b>	<b><math>B_{22}</math> calc<sup>15 °C</sup> (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>	<b>Solubilidade calculada (mg/mL)</b>	<b><math>B_{22}</math> calc<sup>25 °C</sup> (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>
1,29	-	-	1,632	-0,32579
1,09	-	-	0,832	-0,16161
0,90	3,951	-0,26449	1,661	-0,08533
0,69	6,547	-0,06023	-	-
0,45	34,571	-0,00608	43,764	-0,00397
0,25	71,112	-0,00105	33,357	-0,00063
0,06	61,522	-0,00085	99,291	-0,00051

**Tabela A.3.3** – Dados de concentração de sal ( $m_{sal}$ ) e  $B_{22}$  utilizados para a estimativa dos parâmetros ajustáveis ( $B^*$  e  $m^*$ ) do modelo teórico de Franco e Pessôa (2013).

<b>INSULINA SUÍNA</b>				
<b>Carbamato de amônio (mol/kg)</b>	<b><math>m_{sal}^{calc}</math> 15 °C (mol/kg)</b>	<b><math>B_{22}^{calc}</math> 15 °C (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>	<b><math>m_{sal}^{calc}</math> 25 °C (mol/kg)</b>	<b><math>B_{22}^{calc}</math> 25 °C (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>
0,90	0,6202	-0,053694	0,9643	-0,01985
0,69	0,2556	-0,024327	0,4847	-0,00934
0,45	0,2436	-0,009843	0,2676	-0,00395
0,25	0,2556	-0,004631	0,2219	-0,00192
0,06	0,3511	-0,002263	0,2314	-0,00097
<b>LISOZIMA</b>				
<b>Carbamato de amônio (mol/kg)</b>	<b><math>m_{sal}^{calc}</math> 15 °C (mol/kg)</b>	<b><math>B_{22}^{calc}</math> 15 °C (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>	<b><math>m_{sal}^{calc}</math> 25 °C (mol/kg)</b>	<b><math>B_{22}^{calc}</math> 25 °C (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>
1,29	2,4179	-0,011965	1,1989	-0,002362
1,09	1,2448	-0,009660	0,6152	-0,001712
0,90	0,5076	-0,007883	0,7684	-0,001261
0,69	0,1168	-0,006297	0,5055	-0,000899
0,45	-0,5066	-0,004871	0,1215	-0,000611
0,25	-0,6888	-0,003932	0,5774	-0,000443
0,06	-0,0741	-0,003209	0,4582	-0,000326

Tabela A.3.3 – Continuação.

<b>INSULINA BOVINA</b>				
<b>Carbamato de amônio (mol/kg)</b>	<b><math>m_{sal}^{calc}</math> 15 °C (mol/kg)</b>	<b><math>B_{22}^{calc}</math> 15 °C (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>	<b><math>m_{sal}^{calc}</math> 25 °C (mol/kg)</b>	<b><math>B_{22}^{calc}</math> 25 °C (mL.mol/g<sup>2</sup>)</b>
1,29	-	-	1,0891	-0,097760
1,09	-	-	1,2962	-0,048449
0,90	1,0493	-0,033256	1,0838	-0,024869
0,69	0,8621	-0,017127	-	-
0,45	0,2306	-0,008022	0,0903	-0,005125
0,25	-0,0467	-0,004264	0,1688	-0,002540
0,06	0,0088	-0,002339	-0,1297	-0,001304