

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento
de Processos Biotecnológicos

**CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS: MONITORAMENTO *IN SITU* DE
SUPERSATURAÇÃO ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIAS
ATR-FTIR E RAMAN**

Doutoranda: Eng. Rosana Emi Tamagawa, M.S.

Orientador: Prof. Everson Alves Miranda, Ph.D.

Co-orientador: Prof. Kris Arvid Berglund, Ph.D.

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

Campinas - São Paulo
Julho de 2003

UNIDADE:	BE
Nº CHAMADA:	T15c
V:	EX
TOMBO BCI:	55746
PROC.:	16.124103
C:	<input type="checkbox"/>
D:	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO:	R\$ 1.100
DATA:	17/09/03
Nº CPD:	

CM00189070-9
bib id 300918

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

T15c Tamagawa, Rosana Emi
Cristalização de proteínas: monitoramento *in situ* de supersaturação através de espectroscopias ATR-FTIR e Raman / Rosana Emi Tamagawa. --Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadores: Everson Alves Miranda e Kris Arvid Berglund

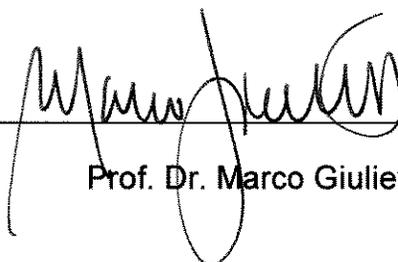
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cristalização. 2. Espectroscopia de infravermelho. 3. Raman, Espectroscopia de. 4. Proteínas - Separação. I. Miranda, Everson Alves. II. Berglund, Kris Arvid. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Tese de Doutorado defendida por Rosana Emi Tamagawa e aprovada em 30 de Junho de 2003 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



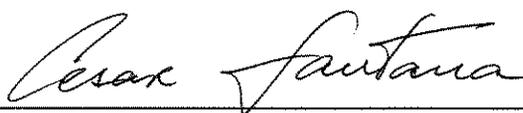
Prof. Dr. Everson Alves Miranda (Orientador)



Prof. Dr. Marco Giuliatti



Prof. Dr. Roberto Guardani



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana



Dr. Adriano Rodrigues Azzoni

200330173

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Rosana Emi Tamagawa em 30 de junho de 2003.



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda pela orientação neste trabalho, sempre com muito profissionalismo e motivação. Obrigada também pela amizade e por todas as oportunidades que proporcionou para o meu amadurecimento como pesquisadora. Suas críticas e elogios foram sempre grandes fontes de inspiração.

Ao Prof. Dr. Kris Arvid Berglund que, com todo seu conhecimento em processos de cristalização e espectroscopia, me proporcionou o privilégio de ter sua co-orientação e a oportunidade de trabalhar em seu laboratório na MSU (“Michigan, State University”).

Ao Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana que, muito gentilmente, permitiu a utilização do espectrofotômetro infravermelho na realização deste trabalho.

Às Prof. Dra. Ângela Maria Moraes e Prof. Dra. Sônia Maria Alves Bueno por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios, onde o preparo de amostras e análises rotineiras foram realizados.

Aos demais professores e funcionários da FEQ-UNICAMP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudos e apoio financeiro na aquisição de materiais e serviços durante realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior –CAPES, pela bolsa de estudos durante meu estágio em Michigan (doutorado sanduíche).

À Kaiser Optical Systems, EUA, pelo empréstimo do espectrofotômetro Raman.

Aos amigos, mais que simples colegas de laboratório: Adriano, Cristiane, Érika, Geórgia, Antenor, Paula, Ana Paula, Oselys, Gisele, Isa, Romi, Luciana, Mariana, Ivanildo e Vinícius. Muito obrigada pelas demonstrações de amizade, companheirismo e profissionalismo que sempre fizeram do laboratório um ótimo ambiente de trabalho.

Aos membros do laboratório do Prof. Berglund: Charles, Dilun, Carina, Lili, Sry, Parminder, Hassan, Javier e Deirde. Obrigada por todo o suporte na realização dos estudos durante meu estágio na MSU e obrigada também pela amizade e apoio que, sem dúvida, tornaram mais fáceis os meses que estive em um país distante.

Aos amigos da BCA, pelos momentos de descontração em East Lansing e, principalmente, por compartilhar as saudades do nosso Brasil. À Laurie, por me acomodar em seu aconchegante lar durante minha estadia em Michigan, além de estar sempre pronta para me ajudar.

Aos meus pais Osvaldo e Rosa e toda minha família a quem devo gratidão sempre.

Ao meu esposo Helder, pelo amor, dedicação e pelos sacrifícios que fez ao me acompanhar durante a jornada deste doutorado. Obrigada pelo seu conforto nas horas difíceis e até mesmo pelas críticas quando necessárias.

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
NOMENCLATURA.....	xiv
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ESCOPO.....	1
1.2 COLOCAÇÃO DO PROBLEMA.....	3
1.3 OBJETIVO E PLANO GERAL DO TRABALHO.....	4
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 PRINCÍPIOS DA CRISTALIZAÇÃO.....	7
2.2 CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	12
2.2.1 Breve histórico e relevância.....	12
2.2.2 Particularidades de cristais de proteínas.....	15
2.2.3 Agentes redutores de solubilidade na cristalização de proteínas.....	17
2.3 MONITORAMENTO DE SUPERSATURAÇÃO.....	19
2.4 ESPECTROSCOPIAS VIBRACIONAIS INFRAVERMELHO E RAMAN.....	22
2.4.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	24
2.4.2 Espectroscopia de infravermelho com refletância total atenuada - ATR ("Attenuated Total Reflectance").....	27
2.4.3 Espectroscopia Raman.....	30
2.5 QUIMIOMETRIA APLICADA À ESPECTROSCOPIA.....	34
2.6 APROTININA: PROPRIEDADES GERAIS E CRISTALIZAÇÃO.....	38
2.7 LISOZIMA: PROPRIEDADES GERAIS E CRISTALIZAÇÃO.....	39

CAPÍTULO 3 - MONITORAMENTO DE SUPERSATURAÇÃO ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR.....	42
3.1 METODOLOGIA.....	43
3.1.1 Materiais e equipamentos.....	43
3.1.2 Determinação da solubilidade de lisozima.....	44
3.1.3 Desenvolvimento de sistema para cristalização por difusão de vapor com monitoramento por ATR-FTIR.....	45
3.1.4 Obtenção e calibração dos espectros a partir da célula de Ge	46
3.1.5 Obtenção e calibração dos espectros a partir da sonda de imersão Dipper 210	48
3.2 RESULTADOS.....	50
3.2.1 Determinação de solubilidade de lisozima.....	50
3.2.2 Calibração dos espectros FTIR de lisozima obtidos através do elemento ATR de Ge.....	53
3.2.3 Concentração de soluções de lisozima através de difusão de vapor aplicando a célula ATR de cristalização	59
3.2.4 Monitoramento <i>in situ</i> de soluções supersaturadas na presença de cristais através de FTIR utilizando elemento ATR de Ge	61
3.2.5 Calibração dos espectros de lisozima obtidos através da sonda Dipper 210.....	69
3.2.6 Ensaio de monitoramento de soluções de lisozima através da sonda Dipper 210	75
3.3 CONCLUSÕES	79
 CAPÍTULO 4 - MONITORAMENTO DE SUPERSATURAÇÃO DE APROTININA ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	 81
4.1 METODOLOGIA.....	82
4.1.1 Materiais e Equipamentos	82
4.1.2 Cristalização de aprotinina pelo método da gota suspensa.....	83
4.1.3 Certificação da composição dos cristais de aprotinina	85
4.1.4 Obtenção dos espectros Raman a partir da gota suspensa	85

4.1.5	Calibração dos espectros Raman	87
4.1.6	Determinação de solubilidade de aprotinina	88
4.1.7	Monitoramento da cristalização de aprotinina em gota suspensa	89
4.2	RESULTADOS	90
4.2.1	Obtenção e análise dos espectros Raman de soluções de aprotinina e (NH ₄) ₂ SO ₄	90
4.2.2	Calibração dos espectros Raman de soluções de aprotinina e (NH ₄) ₂ SO ₄	93
4.2.3	Determinação de solubilidade de aprotinina a partir de cristalização em gota suspensa.....	97
4.2.4	Certificação da composição dos cristais de proteína.....	98
4.2.5	Monitoramento <i>in situ</i> da cristalização em gota suspensa de aprotinina por espectroscopia Raman na presença de (NH ₄) ₂ SO ₄	99
4.2.6	Co-cristalização de aprotinina e (NH ₄) ₂ SO ₄	102
4.2.7	Efeito da taxa de evaporação na cristalização de aprotinina e sua aplicação no controle da supersaturação	106
4.3	CONCLUSÕES	113
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES GERAIS		115
CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS		117
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		119

RESUMO

Neste trabalho as espectroscopias ATR-FTIR (“Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Radiation”) e Raman foram utilizadas no monitoramento e controle de supersaturação de proteínas. Nos estudos utilizando ATR-FTIR foi desenvolvida uma célula para cristalização por difusão de vapor adaptada a um elemento de reflectância interna ATR de germânio (Ge), possibilitando assim o monitoramento *in situ* nesse sistema. O monitoramento da concentração de soluções de lisozima no interior dessa célula se baseou em um modelo de calibração PLS (“Partial Least Squares”) construído a partir de espectros de soluções com concentrações conhecidas dessa proteína. Esse aparato foi aplicado com sucesso na concentração lenta e gradual de soluções de lisozima e o monitoramento da concentração protéica ao longo do tempo se mostrou bastante preciso. Na presença de cristais, entretanto, houve influência dos mesmos sobre o monitoramento da solução, causado pela decantação e suposta interação dos cristais com a superfície do elemento de Ge. Embora não tenha ocorrido adsorção protéica a partir da solução no elemento ATR, a disposição das moléculas no hábito cristalino parece favorecer a adsorção dos cristais de proteína no Ge. Além desse sistema, foi avaliada uma sonda ATR de seleneto de zinco (ZnSe) que apresentou a vantagem de não sofrer influência significativa da temperatura na predição de concentrações de lisozima, gerando a possibilidade de ser aplicada no controle da supersaturação por temperatura. Essa sonda, entretanto, apresentou deficiência no monitoramento ao longo do tempo, de soluções de lisozima e tripsina, devido à provável adsorção protéica no elemento ATR. A espectroscopia AT-FTIR foi assim inadequada para o monitoramento de supersaturação nas condições estudadas.

A espectroscopia Raman, apesar de não ser tradicionalmente utilizada para quantificações, permitiu o monitoramento *in situ* da supersaturação com relativa precisão. Um modelo de calibração PLS desenvolvido a partir de soluções padrão

de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ possibilitou medidas simultâneas de suas concentrações durante cristalizações em gota suspensa (“hanging-drop”). Através dessa possibilidade determinou-se a solubilidade de aprotinina na presença de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de gotas de 10 μl de solução e demonstrou-se o controle da supersaturação propiciando aumento do tamanho dos cristais de aprotinina em cerca de três vezes em relação à cristalização sem controle de supersaturação. O monitoramento simultâneo da concentração de proteína e sal, trouxe evidências da co-cristalização de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, isto é, de que ambas as moléculas participaram na formação dos cristais. Dessa forma, apesar do potencial da espectroscopia infravermelho, verificou-se a superioridade da metodologia de monitoramento baseado na espectroscopia Raman. Uma das principais vantagens desse segundo método foi a aplicação da sonda de fibra óptica que permitiu medidas remotas e de modo não invasivo, tendo em vista que a interação de proteínas com diferentes materiais pode ser um problema crítico no monitoramento *in situ* de suas soluções.

ABSTRACT

In this study, Raman and ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Radiation) spectroscopies were employed for the *in situ* monitoring and control of protein supersaturation. A germanium (Ge) ATR accessory adapted to a vapour diffusion crystallization cell allowed the *in situ* monitoring of solutions inside this cell. The monitoring of lysozyme concentrations was based on a PLS (Partial Least Squares) calibration of spectra from solutions with known concentrations of this protein. This apparatus was successfully applied for the gradual increasing of lysozyme concentration, which was monitored over time with good accuracy. However, when this system was used to monitor the liquid phase in the presence of crystals, the prediction was affected by a hypothetical interaction between lysozyme crystals and Ge surface. Although any interaction of protein from liquid phase and the ATR element was observed, it seems that some features of the crystal surface favoured its adsorption onto the Ge element. Besides the Ge based system, a zinc selenide (ZnSe) immersion probe was also evaluated for the monitoring purpose. Lysozyme concentrations measured with this probe were demonstrated to not being significantly affected by temperature, meaning that it could be applied for the supersaturation control by temperature. This probe, however, was not adequate for the monitoring of lysozyme and trypsin solutions over time, due to the protein adsorption onto the ATR element. Therefore, the ATR-FTIR methods were not suitable for the measuring of supersaturation in the studied conditions.

In spite of not being traditionally applied as a reliable quantification technique, Raman spectroscopy allowed the *in situ* measurement of aprotinin and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations with reasonable precision. A PLS calibration model, based on spectra of aprotinin and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solutions with known concentrations allowed the simultaneous monitoring of these species during hanging drop crystallizations. This calibration model was employed in the determination of

aprotinin solubility in the presence of NaCl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ carried out in the hanging drop mode using 10 μl drops. Monitoring of the drop compositional change over time allowed the control of supersaturation, accomplished by vapour-diffusion control, leading to an increase of crystal size three fold when compared to crystals obtained without supersaturation control. The observed decrease of protein and salt concentrations during the growth process was an indicative of the co-crystallization of aprotinin and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: both molecules were taken into the crystal structure. Therefore, despite the potential of ATR-FTIR spectroscopy, Raman technique was considered superior for the present purpose. Certainly the non-invasive nature of Raman data collection should be pointed out as its main advantage over ATR-FTIR technique, considering that the sticky nature of proteins can be a critical problem for immersion probes.

NOMENCLATURA

A: área superficial de um núcleo;

Abs_{λ} : intensidade de absorção de luz em determinado comprimento de onda;

a_i : atividade de uma dada espécie química i em solução;

A_{pico} : área de determinado pico de um espectro;

ATR: "Attenuated Total Reflectance";

B: taxa de nucleação;

BPTI: "Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor";

C^* : concentração do soluto no equilíbrio entre as fases sólida e líquida (mg/ml);

c : velocidade da luz ($3,3 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$);

C : concentração do soluto (mg/ml);

CCD: "Charge-Coupled Device";

C_i : concentração de uma dada espécie química i em solução;

CIRCLE cell: "Cylindrical Internal Reflectance for Liquid Evaluation cell";

CLPCs: "Cross Linked Protein Crystals";

CSD: "Crystal Size Distribution";

d : distância do caminho ótico;

DLS: "Dynamic Light Scattering";

d_p : profundidade de penetração da onda evanescente;

E: energia da luz de determinado comprimento de onda;

EDTA: ácido etileno-diamino-tetraacético;

FTIR: "Fourier Transformed Infrared Radiation";

g : aceleração da gravidade ($9,8 \text{ m/s}^2$);

g : ordem da taxa de crescimento;

G: taxa de crescimento dos cristais;

h : constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$);

I: intensidade de luz incidente;

I_0 : intensidade de luz transmitida;

IMAC: "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography";

k_B : constante de Boltzman ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K);
 K_g : constante da taxa de crescimento;
 K_n : constante de nucleação;
 L_{pico} : altura de determinado pico de um espectro;
MPD: Metilpentanodiol;
 n : ordem aparente da taxa de nucleação;
Nd:YAG: "Neodymium doped Yttrium-Aluminum Garnet";
 P : momento dipolar de uma molécula quando submetido a um campo elétrico;
PCA: "Principal Component Analysis";
PEG: polietilenoglicol;
PLS: "Partial Least Squares";
PRESS: "Predicted Residual Error of Sum of Squares";
QELS: "Quasi Elastic Light Scattering";
 r^* : raio crítico para que um núcleo se desenvolva;
 r : raio de um núcleo;
 r_i : raio iônico expresso em Å;
RPB: Recuperação e Purificação de Bioprodutos;
 S : supersaturação ($C-C^*$);
SAXS: "Small Angle X-Ray Scattering";
 T (%): transmitância;
 T : temperatura absoluta (K);
 V : volume de um núcleo;
 z_i : carga ou valência da espécie iônica;
 α : polarizabilidade da molécula;
 β : supersaturação (C/C^*);
 ϵ : coeficiente de absorção molecular;
 γ : energia livre interfacial entre a solução e os núcleos;
 γ_i : coeficiente de atividade de uma dada espécie química;
 η_{amostra} : índice de refração da amostra;
 η_{ATR} : índice de refração do elemento ATR;

λ : comprimento de onda característico;
 λ_c : comprimento de onda da radiação absorvida pela amostra;
 μ : força iônica da solução;
 ν : frequência de luz em unidades de Hz;
 ν_m : frequência de vibração de uma molécula;
 ν_0 : frequência de luz incidente;
 $\bar{\nu}$: frequência de luz expressa em unidades de cm^{-1} ;
 θ : ângulo de incidência de uma radiação em uma amostra;
 σ : supersaturação relativa $(C-C^*)/C^*$;
 ΔC_{max} : largura da zona metaestável ;
 ΔG : energia de ativação requerida na formação de um núcleo;
 ΔG^* : energia crítica de ativação requerida na formação de um núcleo;
 $\Delta\mu$: gradiente de potencial químico;
 Ω : volume de uma molécula no cristal.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Este trabalho encontra-se dividido em capítulos onde são apresentados uma introdução, uma revisão da literatura sobre os assuntos envolvidos nos estudos realizados e as atividades desenvolvidas, assim como os resultados e as conclusões obtidas.

A revisão bibliográfica apresentada inicia com princípios de cristalização e um breve histórico e particularidades da cristalização de proteínas. São ainda apresentados alguns dos principais métodos de monitoramento de supersaturação e o porquê da utilização das espectroscopias infravermelho e Raman neste estudo. Os mecanismos de funcionamento de ambas as técnicas são discutidos brevemente, sendo seguidos de um tópico sobre quimiometria, uma vez que a interpretação dos dados espectroscópicos envolveram a utilização de ferramentas quimiométricas, especificamente modelos de calibração multivariada. Por fim, são apresentados tópicos sobre as duas principais moléculas utilizadas neste trabalho: a aprotinina, molécula farmacêutica, de alto valor agregado e a lisozima, principal proteína em estudos de cristalização.

As atividades realizadas assim como os resultados obtidos são discutidos em dois capítulos, sendo eles os estudos de monitoramento realizados através de espectroscopia Raman e os estudos de monitoramento realizados através da espectroscopia infravermelho.

1.1 ESCOPO

Este trabalho insere-se no campo da Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB) também conhecida como "Downstream Processing", que é normalmente uma das etapas de maior custo em um bioprocessamento. Em alguns

casos, como exemplo na produção de fármacos onde altos níveis de pureza são exigidos, o custo da RPB pode atingir até 80% do processo de produção (Scopes, 1994). Com os recentes avanços da biotecnologia, o mercado tem se tornado mais competitivo, implicando na exigência por maior qualidade e economia do processo e, conseqüentemente, na necessidade de tecnologias de purificação mais eficientes.

Dentre os métodos de purificação, a cristalização tem-se destacado por ser um processo eficiente com relativo baixo custo e simplicidade de operação. Adiciona-se ainda o fato da cristalização ser um processo de separação altamente seletivo, dispensando em casos ideais o uso de etapas adicionais de purificação.

A preferência por produtos em forma de cristais se dá por três principais razões: 1) elevada pureza, 2) uniformidade de forma e tamanho das partículas e 3) maior estabilidade, com maior resistência à desnaturação no caso de proteínas (Drenth e Haas, 1992). A cristalização pode ainda atribuir propriedades especiais, tais como, morfologia específica, solubilidade em determinados solventes e estabilidade térmica. A obtenção de cristais com morfologia específica é importante alvo na produção de moléculas diversas, principalmente na indústria farmacêutica, sendo a morfologia responsável por importantes propriedades físico-químicas do produto.

Além da obtenção de sólidos com diferentes formas, a cristalização tem sido recentemente explorada na separação de compostos quirais. Mais da metade das drogas comercializadas são compostos quirais, sendo que a cristalização é considerada a técnica mais simples e econômica para a separação de enantiômeros, quando aplicada isoladamente (Profir *et al.*, 2002 e Shekunov e York, 2000). A cristalização pode ser aplicada isoladamente, ou em combinação com leito móvel simulado para sistemas que formam compostos racêmicos. Neste caso, a cristalização tem se mostrado essencial no aumento da produtividade do processo (Lorenz *et al.*, 2001).

Ainda na indústria farmacêutica, a forma cristalina tem sido aplicada na liberação controlada de drogas, proporcionando uma maior eficácia destes, e em alguns casos, dispensando o uso de carreadores (Shekunov e York, 2000). A

cristalização e a precipitação são responsáveis por cerca de 70% dos materiais sólidos produzidos atualmente (Giulietti, 2001), e mais de 90% dos produtos farmacêuticos, como tabletes, aerosóis, cápsulas, suspensões e supositórios contêm drogas em forma de particulado geralmente cristalino (Shekunov e York, 2000).

Entretanto, apesar da sua grande aplicabilidade a cristalização é, muitas vezes, empregada sem um devido controle, em decorrência dos fenômenos envolvidos nas etapas de formação e crescimento dos cristais serem complexos e pouco esclarecidos até o momento. Dificuldades adicionais ocorrem quando se trata de moléculas biológicas, como proteínas, sendo poucos os trabalhos na literatura envolvendo a cristalização dessas espécies.

Este projeto faz parte da linha de pesquisa em cristalização coordenada pelo prof. Dr. Everson Alves Miranda, desenvolvida no LEBp - Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, FEQ – UNICAMP, em colaboração com o prof. Dr. Kris Arvid Berglund, professor e pesquisador na MSU – “Michigan State University” nos Estados Unidos e na “Technology University of Lulea” na Suécia. O Dr. Kris Berglund vem coordenando pesquisas envolvendo processos de cristalização há mais de uma década, sendo, atualmente uma referência internacional no assunto.

1.2 COLOCAÇÃO DO PROBLEMA

A cristalização é aplicada na purificação de moléculas convencionais, como sais inorgânicos e compostos orgânicos, em quantidades superiores a cem milhões de toneladas por ano. No caso de proteínas, entretanto, há ainda grandes dificuldades no desenvolvimento de tais processos, principalmente em nível industrial (McPherson, 1999). Essa dificuldade deve-se à falta de conhecimentos suficientes sobre parâmetros cinéticos e termodinâmicos dos processos de formação e crescimento dos cristais e também ao fato de moléculas biológicas apresentarem um nível maior de complexidade em relação a moléculas pequenas ou íons. Apesar dos esforços para o melhor entendimento da cristalização destas moléculas, ela tem sido conduzida ao longo de décadas baseada principalmente

em métodos empíricos, e sendo assim, ela é dita como sendo mais uma arte que uma ciência (Littlechild, 1991).

Em geral, estudos de cristalização visam estabelecer condições para obtenção de cristais com características específicas incluindo tamanho, morfologia, distribuição dos tamanhos (CSD - "Crystal Size Distribution"), pureza, entre outras. Sabe-se que essas condições dependem fortemente da supersaturação, pois esta é um fator determinante na formação dos núcleos (primeiras unidades cristalinas), na taxa de nucleação, na formação de agregados, na taxa de crescimento, no tempo de indução, entre outras características do processo (Mullin, 1993; Myerson, 1993; Nývlt, 2001).

Sendo assim, para tornar a cristalização um processo possível de controle e otimização, faz-se necessário sobretudo, o desenvolvimento de métodos eficientes para o monitoramento e controle da supersaturação. Métodos estes que permitam medidas precisas, rápidas e em tempo real, permitindo controlar a supersaturação de acordo com eventos observados no processo. Um dos problemas na obtenção de medidas em tempo real é a necessidade de separação da fase sólida, quando esta influencia as medidas de concentração da fase líquida, o que negligencia os fenômenos ocorrentes durante amostragem e medida (Dunuwila e Berglund, 1997). Assim, o desenvolvimento de métodos de medida *in situ* que permitam a avaliação quantitativa da fase líquida em um meio de cristalização sem necessidade de separação das fases tem se tornado cada vez mais importante para o monitoramento e controle da supersaturação.

1.3 OBJETIVO E PLANO GERAL DO TRABALHO

O objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de metodologias para o monitoramento *in situ* e controle de supersaturação de soluções de proteínas, utilizando as espectroscopias vibracionais, ATR-FTIR e Raman que têm sido aplicadas com sucesso em estudos de cristalização de moléculas orgânicas (Dunuwila e Berglund, 1997; Lewiner *et al.*, 2001; Feng e Berglund, 2002; Profir *et al.*, 2002) e de proteínas (Schwartz e Berglund, 1999b e 2000). Essas

metodologias consistiram em medir em tempo real a concentração e a supersaturação de soluções protéicas ao longo do processo, permitindo que essas fossem alteradas de acordo com eventos observados: por exemplo, estabilizando a supersaturação para suprimir a nucleação excessiva durante crescimento dos cristais. O plano geral de trabalho apresentou duas etapas principais, consistindo de estudos utilizando cada uma das duas espectroscopias, Raman e ATR-FTIR.

Nos estudos baseados na espectroscopia ATR-FTIR, desenvolveu-se um sistema para cristalização por difusão de vapor adaptado a um elemento ATR de Ge horizontal de modo a permitir o monitoramento *in situ* neste sistema com capacidade da ordem de 1,0 ml de solução. O baixo consumo de amostra é essencial tratando-se de moléculas de alto custo, tal como proteínas. Para o monitoramento da cristalização em volumes da ordem de 1,0 litro onde seria permitida a avaliação de efeito de temperatura e agitação, foi avaliada uma sonda com elemento ATR cônico de ZnSe. Nesses estudos, a lisozima foi selecionada como modelo devido ao relativo baixo custo, além de ser considerada molécula padrão em estudos de cristalização, uma vez que é fácil de ser cristalizada, e da farta existência de dados na literatura sobre sua cristalização (Durbin e Feher, 1986; Ataka e Tanaka, 1986; Boistelle e Astier, 1988; Wilson e Pusey, 1992; Riès-Kautt e Ducruix, 1992; Rosenberger *et al.*, 1996; Grimbergen *et al.*, 1999; Judge *et al.*, 1999 e Price *et al.*, 2001).

Na segunda parte do trabalho, baseado na espectroscopia Raman, desenvolveu-se metodologia de monitoramento e controle da cristalização de aprotinina em gota suspensa que, embora seja reduzida à escala laboratorial, serviria de base no desenvolvimento de processos em maior escala. Esse tipo de cristalização é o método de cristalização mais utilizado na cristalografia de proteínas e apresenta a vantagem de permitir a avaliação de uma grande variedade de condições de cristalização com baixo consumo de amostras, da ordem de alguns microlitros. Esses estudos basearam-se na utilização de um espectrofotômetro Raman acoplado a uma sonda de fibra óptica que, permitindo a obtenção de medidas em modo remoto e não-invasivo, era ideal para o monitoramento da cristalização em gota suspensa. A seleção da aprotinina como modelo neste estudo, se baseou na possibilidade de futura aplicação de sua

cristalização como etapa complementar em processos de purificação de aprotinina por métodos cromatográficos nos estudos realizados no LEBp (Azzoni e Miranda, 1999; Tamagawa *et al.*, 1999; Azzoni *et al.*, 2002; Genaro *et al.*, 2002) A relevância dessa molécula é discutida adiante em um tópico específico.

Para ambas as técnicas, infravermelho e Raman, foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada, PLS (“Partial Least –Squares”) construídos a partir de soluções padrão com concentrações conhecidas da molécula a ser monitorada: lisozima, no caso de ATR-FTIR, e aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no caso de Raman. O monitoramento e controle da supersaturação baseou-se em curvas de solubilidade que foram determinadas para cada uma das proteínas nos respectivos meios de cristalização. A estratégia de controle de supersaturação foi basicamente o controle da evaporação através de difusão de vapor: para aumento da supersaturação submetia-se a solução a uma taxa elevada de evaporação e para estabilizar a supersaturação, interrompia-se a evaporação.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRINCÍPIOS DA CRISTALIZAÇÃO

A cristalização, formação de uma fase sólida ordenada, é governada por fenômenos termodinâmicos e cinéticos na interface da fase líquida e da fase sólida em crescimento. Ela procede inicialmente pela formação de núcleos, isto é, primeiras unidades cristalinas, seguida do crescimento destes gerando os cristais. O esclarecimento preciso dos fenômenos envolvidos nessas duas etapas principais da cristalização é extremamente complexo, sendo alvo de diversos estudos (Mullin, 1993, Myerson, 1993 Nyvt *et al.*, 2001). Nesta seção são discutidos apenas fundamentos gerais da cristalização e principais equações envolvendo variáveis desses processos para nas seções seguintes se fazer uma revisão da literatura sobre a cristalização de proteínas com aspectos mais específicos desse trabalho.

A solubilidade de um soluto em determinado solvente depende de propriedades do meio, tais como concentração, pH, força iônica, temperatura, entre outras, podendo assim ser expressa através de curvas de solubilidade em função dessas variáveis. Em tais curvas de solubilidade, nos referimos à região inferior à curva como região de subsaturação e à região acima da curva como a região de supersaturação. A supersaturação, condição necessária para a formação e o crescimento de cristais a partir de uma solução é definida como o estado em que a solução apresenta concentração maior que o limite de solubilidade, possuindo, portanto, uma tendência natural de reestabelecer o equilíbrio. Tendência esta, referida como a força motriz da cristalização, caracterizada pela diferença de potencial químico de uma dada espécie na solução supersaturada e na fase sólida. A Equação 2.1, equação de definição relaciona o gradiente de potencial químico, $\Delta\mu$, e a supersaturação, β :

$$\Delta\mu = k_B T \ln(\beta) \quad (2.1)$$

onde k_B é a constante de Boltzman e T , a temperatura absoluta.

A supersaturação é geralmente definida como a razão entre a concentração, C e a solubilidade C^* (Equação 2.2), podendo ainda ser expressa através da diferença entre a concentração e a solubilidade (Equação 2.3) ou ainda através da razão dessa diferença e a solubilidade (Equação 2.4).

$$\beta = \frac{C}{C^*} \quad (2.2)$$

$$S = C - C^* \quad (2.3)$$

$$\sigma = \frac{C - C^*}{C^*} \quad (2.4)$$

É importante lembrar que nas Equações 2.2 a 2.4 se assume uma solução ideal, com um coeficiente de atividade igual a 1 (Myerson, 1993). Em estudos de cristalização é comum expressar a supersaturação em termos de concentração sem considerar os coeficientes de atividade, entretanto, para uma soluções muito distantes da idealidade os coeficientes de atividade devem ser considerados. Para uma dada espécie química "i", a atividade e a concentração são relacionadas através da Equação 2.5, onde γ_i é o coeficiente de atividade cuja definição é dada pela Equação de Debye-Hückel (2.6)

$$a_i = \gamma_i C_i \quad (2.5)$$

$$-\log \gamma_i = \frac{Az_i^2 \mu^{1/2}}{(1 + Br_i \mu^{1/2})} \quad (2.6)$$

onde A e B são constantes dependentes da temperatura; r_i , o raio da espécie química expresso em Å; C_i e z_i são, respectivamente, a concentração e a carga da

espécie "i" em solução e μ , a força iônica da solução. No caso de proteínas a teoria de Debye-Hückel poderia ser aplicada considerando que sua molécula contém grupos polares carregados que assumem a forma de um grande íon polivalente com carga centralizada. Entretanto, é conhecido que essa teoria não explica completamente a solubilidade de proteínas pois essas tem padrões de carga que não estão relacionados com sua carga líquida (Pan, 1995).

Uma vez que a solução esteja supersaturada, a cristalização pode iniciar por duas formas, através da nucleação homogênea ou heterogênea (Mullin, 1993, Myerson, 1993). A nucleação heterogênea, com maior probabilidade de ocorrência, é a formação de cristais induzida pela presença de corpos estranhos presentes no meio, como exemplo partículas de impurezas ou ainda a própria superfície do recipiente. A nucleação homogênea, por outro lado, é a formação de cristais sem interferência de superfícies ou partículas que, no entanto, requer um maior potencial químico e ocorre com menor probabilidade. Ambos os tipos de nucleação são ditas como nucleação primária por iniciarem espontaneamente sem a pré-existência de cristais em solução. Quando a formação de novos núcleos é induzida pelos cristais pré-existentes, dizemos que ocorreu uma nucleação secundária. A nucleação secundária requer menor supersaturação que a nucleação primária.

De acordo com a teoria de energia de ativação, um determinado grau de supersaturação é necessário para que a nucleação se inicie, isto é, deve-se vencer uma barreira energética como em simples reações químicas. Desse modo, para a formação de núcleos, a supersaturação deve ser superior a uma determinada faixa acima do limite de solubilidade, conhecida como zona metaestável, ou região de metaestabilidade. Nessa região, o potencial químico permite o crescimento de cristais já existentes mas é insuficiente para a formação de novos núcleos.

Embora não haja uma simples teoria para predizer a taxa de nucleação, várias correlações, como a da Equação 2.7, têm sido utilizadas para representar dados experimentais:

$$B = k_N \cdot \sigma^n \quad (2.7)$$

onde B é a taxa de nucleação primária, σ é a supersaturação, k_N é a constante de nucleação e n é a ordem aparente da taxa de nucleação.

Uma vez formados os núcleos, para estes continuarem crescendo é necessário que tenham um tamanho mínimo referido como dimensão crítica (Boistelle e Astier, 1988), a partir do qual o crescimento prevalece sobre a dissolução. A energia de ativação requerida para a formação de um núcleo de um determinado tamanho é descrita pela Equação 2.8:

$$\Delta G = -\frac{V}{\Omega} k_B T \ln S + A\gamma \quad (2.8)$$

onde V e A são, respectivamente, o volume e a área do núcleo; Ω é o volume da molécula no cristal; k_B , a constante de Boltzman; T a temperatura absoluta e γ a energia livre interfacial entre a solução e os núcleos.

Se considerarmos um núcleo esférico, a equação acima pode ser reescrita gerando a Equação 2.9 onde o primeiro termo envolve o número de moléculas dentro do núcleo, e o segundo termo representa a energia requerida para a formação da superfície:

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3\Omega} k_B T \ln S + 4\pi r^2 \gamma \quad (2.9)$$

Devido a competição entre o termo volumétrico com valor negativo, e, o termo de superfície com valor positivo, a energia de ativação passa por um máximo a um certo valor de r, referido como o raio crítico, r^* , descrito na Equação 2.10. A correspondente energia crítica de ativação para a nucleação é então dada pela Equação 2.11, onde verifica-se que a energia de ativação diminui com o aumento da supersaturação e com a diminuição da energia livre interfacial. Em outras palavras, uma maior taxa de nucleação é esperada em maiores supersaturações:

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{k_B T \ln S} \quad (2.10)$$

$$\Delta G^* = \frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(k_B T \ln S)^2} \quad (2.11)$$

Intuitivamente podemos imaginar que quanto maior a supersaturação e a taxa de nucleação maiores seriam os núcleos. Esta pressuposição, no entanto é incorreta pois, quanto maior a supersaturação, mais rápida a formação dos agregados e menores os cristais resultantes. Uma supersaturação demasiadamente alta pode ainda resultar na formação de sólidos amorfos, de estrutura desordenada. Esse processo, onde os sólidos obtidos não apresentam estrutura cristalina, é preferencialmente referido como precipitação, embora, às vezes, em ambiente industrial não haja muita diferença entre os termos precipitação e cristalização. Em alguns casos, a precipitação é ainda referida como uma cristalização provocada pela adição de um agente químico.

Uma vez que os núcleos tenham tamanho crítico, estes crescem originando cristais. Na presença de núcleos estáveis a taxa de crescimento dos cristais é função da supersaturação, Equação 2.12:

$$G = K_g S^g \quad (2.12)$$

Essa expressão considera a velocidade de crescimento linear, sendo G a taxa de crescimento, S a supersaturação, K_g a constante da taxa de crescimento e o expoente g a ordem da taxa de crescimento. Na maioria dos sistemas, a ordem de crescimento dos cristais é menor que a ordem de nucleação e assim uma supersaturação alta favorece a nucleação. Para que se favoreça o crescimento é necessária uma supersaturação baixa, onde se evite a formação de novos núcleos.

2.2 CRISTALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

2.2.1 Breve histórico e relevância

O conhecimento de que proteínas cristalizam data de 1840, quando Hünefeld observou a cristalização de hemoglobina a partir da evaporação do sangue depositado sobre uma lamínula de vidro (McPherson, 1991; Kam *et al.* 1978). Essa observação impulsionou a cristalização de outras proteínas, no entanto, sem finalidades específicas além do caráter exploratório destes experimentos.

No final da década de 30, pesquisadores como Astbury, Bernal, Crowfoot, Fankuchen, Kendrew e Perutz demonstraram que era possível determinar a estrutura molecular de proteínas através da difração de raios-X a partir dos seus cristais (McPherson, 1999). Kendrew e Perutz receberam o prêmio nobel em química em 1962 pelos seus estudos sobre a estrutura de proteínas globulares. Essa foi uma das maiores descobertas da biotecnologia possibilitando o desenvolvimento racional de drogas e atualmente, atua como importante ferramenta da engenharia genética. Conseqüentemente, surgiram esforços contínuos para a cristalização e determinação de estruturas macromoleculares e para isso foram desenvolvidos vários métodos sistematizados para cristalização dessas espécies, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e fragmentos virais.

No entanto, nesses esforços, a cristalização teve papel secundário e serviu como mera ferramenta analítica, pois o objetivo era a caracterização estrutural. A obtenção dos cristais baseou-se principalmente em métodos de tentativas e erros sem a existência de um controle ou maior compreensão do fenômeno. Desse modo, mesmo nos dias de hoje, apesar da elevada soma de estruturas de moléculas biológicas determinadas através da cristalografia e documentadas em bases de dados como o "Protein Data Bank", com mais de 20.000 estruturas depositadas (Berman *et al.*, 2000), não existe ainda um entendimento profundo do mecanismo de obtenção dos cristais dessas macromoléculas. Atualmente, o campo da cristalografia dispõe de tecnologias

altamente desenvolvidas baseadas em modernas fontes de raios-X e métodos computacionais de alta capacidade que tem agilizado a determinação estrutural de macromoléculas. Entretanto, a cristalografia depende sobretudo da cristalização destas macromoléculas que passou a ser um fator limitante na obtenção de novas estruturas, uma vez que ela se baseia em métodos de tentativas e erros que envolvem consumo indeterminado de material e tempo (Ansari *et al.*, 1996).

No setor industrial, o interesse pela cristalização de macromoléculas biológicas tornou-se expressivo somente a partir da década de 70, devido à acelerada expansão da biotecnologia e consequente demanda por processos de purificação mais eficientes (DeMattei e Feigelson, 1992). Além de purificação, na indústria farmacêutica, a cristalização é extremamente importante, estando a forma cristalina relacionada com características específicas, tais como a solubilidade em determinado solvente, estabilidade térmica, ponto de fusão, formas enantioméricas e atividade biológica, no caso de biomoléculas (Drenth e Hass, 1992).

As formulações cristalinas tem possibilitado ainda a liberação controlada e prolongada de drogas, assim como um significativo aumento na sua eficácia, sendo a insulina um exemplo típico (McPherson, 1999). A liberação prolongada, alvo de estudos no desenvolvimento de várias drogas, é realizada tradicionalmente através de incorporação do princípio ativo em veículos carreadores, como exemplo microesferas poliméricas, que controlam a liberação do mesmo. Recentes tecnologias visam moléculas cristalizadas combinadas ou não com carreadores, sendo que a forma cristalina pode prolongar o tempo de liberação em horas ou dias, além de minimizar os volumes das doses a serem administradas. Entretanto, os processos de cristalização não são bem estabelecidos. Shekunov e York (2000) observam que os avanços tecnológicos na síntese permitem identificação e obtenção de drogas com grande eficácia, sendo que o controle das características cristalinas é, entretanto, pouco compreendido.

Além do setor de fármacos, outra área na indústria com grande aplicação de proteínas cristalizadas, é a de biocatalisadores, que constituem uma das

classes de proteínas com maior demanda comercial. As enzimas, com alto potencial de catálise, são atualmente indispensáveis em processos de produção de insumos químicos, produtos farmacêuticos, detergentes, cosméticos, entre outros. Uma inovação na produção de biocatalisadores resistentes foi a tecnologia CLPCs -“Cross Linked Protein Crystals” (Govardhan, 1999). Esta tecnologia consiste na cristalização de proteínas, as quais são subsequenteiramente modificadas quimicamente através da ação de agentes bifuncionais como o glutaraldeído. O material resultante possui morfologia ordenada com poros de tamanhos controlados e estabilidade elevada, com manutenção da atividade em extremos de pH e temperatura, assim como na presença de proteases ou solventes orgânicos.

Visto as diferentes aplicações de materiais cristalinos, é importante ter em mente que diferentes características dos cristais podem ser exigidas de acordo com as finalidades. Cristais inapropriados para caracterização estrutural podem ser perfeitamente adequados como produto final de uma etapa de purificação. Na cristalografia, além de apresentarem pureza, os cristais precisam difratar a uma alta resolução (Przybycien, 1998).

Assim, a condução dos processos de cristalização também pode diferir consideravelmente para cada caso. No caso de cristais usados em formulações farmacêuticas, onde na maioria dos casos um nível de próximo a 100% de pureza é exigido, normalmente existe a necessidade de etapas de recristalização. Por outro lado, para a separação a partir de um meio de fermentação, níveis de pureza inferiores podem satisfazer a finalidade do produto, e uma única etapa de cristalização pode ser o suficiente. Nesse caso, entretanto, a produtividade é fundamental e os volumes a se tratar são certamente maiores que na produção de fármacos com características especiais. De acordo com os volumes de solução envolvidos em processos industriais, a utilização de métodos, tais como a difusão de vapor, utilizada para a obtenção de cristais na cristalografia, é inviável de aplicação industrial. Além disso, há limitações quanto as condições usadas na cristalização, sendo que alguns sais e tampões específicos de alto custo ficam fora de questão, pois tornariam o processo em larga escala economicamente inviável.

Dentre as poucas publicações que relatam aplicações da cristalização de proteínas para purificação em massa, estão os trabalhos de Tsujisaka *et al.* (1973), Buckel *et al.* (1981), Yoshimoto *et al.* (1993), Kitazono *et al.* (1992), Pitts *et al.* (1993), Mack *et al.* (1994); Jacobsen *et al.* (1998), Judge *et al.* (1995) e Lee *et al.* (2000). Na maioria destes trabalhos as cristalizações foram conduzidas em condições pré-estabelecidas e não houve propósitos de monitoramento ou controle da supersaturação. Os trabalhos que apresentaram certa atenção no estudo das características do processo foram os estudos realizados por Jacobsen *et al.* (1998) e Judge *et al.* (1995) que, respectivamente, caracterizaram o processo baseando-se nas taxas de nucleação e crescimento e descreveram a taxa de crescimento dos cristais em função de variáveis como grau de supersaturação, agente cristalizante utilizado e pH.

2.2.2 Particularidades de cristais de proteínas

Embora cristais de macromoléculas biológicas sejam visualmente similares aos cristais de espécies menores, como moléculas orgânicas e inorgânicas, há muitas diferenças entre suas propriedades físicas e mecânicas, como também cinéticas de crescimento, condições para nucleação e crescimento e tipos de interações nas estruturas internas das redes cristalinas que formam o hábito cristalino (Bennema, 1992).

Uma conseqüência da maior complexidade morfológica das unidades de crescimento na cristalização de proteínas é que esta rende cristais de dimensões menores em relação às moléculas inorgânicas ou orgânicas (Littlechild, 1991; DeMattei e Feigelson, 1992). Em relação a aspectos cinéticos, proteínas geralmente cristalizam lentamente em decorrência de sua difusão e velocidades de colisão e rotação serem muito baixas devido às massas moleculares elevadas, da ordem de 10 a 250 kDa. Cristais de proteínas podem levar de algumas horas ou mesmo várias semanas para atingirem o tamanho máximo de 1 mm, ao passo que cristais de algumas moléculas inorgânicas são capazes de atingir dimensões da ordem de 1 cm em intervalos de menos de 1 h. Rosenberger (1986) e Bennema (1992) esclarecem que existem similaridades entre o crescimento de

cristais de proteína e o de moléculas inorgânicas, mas que, entretanto, os conceitos de transporte e cinética envolvidos no processo de cristalização de proteínas são extremamente complexos de serem descritos.

Outra característica particular de cristais de proteínas é que estes são quebradiços, uma vez que apresentam de 25 a 90% de água (McPherson, 1994). A incorporação de moléculas de água na estrutura do cristal de proteínas é favorecida pela elevada massa e forma irregular de moléculas protéicas. O número e intensidade de interações intermoleculares no hábito cristalino, em proporção à massa molecular, são inferiores e mais fracos que para o caso de moléculas menores, contribuindo também para a fragilidade dos cristais de proteínas.

Moléculas biológicas apresentam potencial para ocorrência de diferentes tipos de interações durante a cristalização, uma vez que esta apresenta estrutura dinâmica, isto é, sua estrutura molecular adquire diferentes conformações de acordo com as condições do meio (McPherson, 1999). Normalmente essa mobilidade estrutural ocorre ao custo de pequenas diferenças de energia, podendo ocorrer mesmo com uma mínima perturbação do meio, sendo assim de difícil controle. Conseqüentemente, há probabilidade de ocorrência de diferentes rearranjos das moléculas durante cristalização gerando substancial variação no grau de polimorfismo.

No desenvolvimento de um processo de cristalização de uma proteína, além dos parâmetros diversos como a taxa de crescimento, transporte de massa e energia, estabilidade interfacial e efeitos de morfologia, é ainda necessária uma investigação sistemática do comportamento destas moléculas não só na etapa de crescimento dos cristais, como também no estágio de pré-nucleação com a formação dos primeiros agregados (Veesler *et al.*, 1996; DeMattei e Feigelson, 1992, Bernardo, 2002). Além da variedade de interações durante auto-associação, uma macromolécula apresenta alta disponibilidade de ligação com espécies diversas, incluindo moléculas de água, íons e moléculas pequenas, sendo assim, a incorporação de impurezas em um cristal de uma molécula biológica maior que em cristais de moléculas pequenas.

A incorporação de impurezas é favorecida ainda devido às moléculas biológicas apresentarem-se naturalmente em meios complexos. Ao passo que moléculas de sais inorgânicos cristalizam a partir de solução aquosa contendo exclusivamente a molécula de interesse, proteínas requerem a presença de agentes precipitantes para induzir sua cristalização, além de agentes tamponantes para manutenção do pH adequado. Tanto tampões como agentes precipitantes são candidatos à interação com a proteína durante a cristalização, além de poderem influenciar interações com outras espécies. Em casos específicos, outras espécies podem estar presentes, tais como agentes redutores para evitar oxidação de determinados aminoácidos na superfície da molécula ou íons metálicos para manutenção da atividade de certas enzimas. No caso de íons metálicos, estes podem ainda ser favoráveis ou até mesmo essenciais para a cristalização de proteínas, como exemplo, a insulina cuja cristalização é estimulada na presença de íons Zn^{2+} (McPherson, 1999).

2.2.3 Agentes redutores de solubilidade na cristalização de proteínas

A supersaturação de proteínas é obtida através de métodos de variação de parâmetros como concentração, pH, força iônica ou temperatura, podendo estes métodos serem utilizados isoladamente ou através da combinação dos mesmos (Bergfords, 1998, McPherson, 1999). Dentre estes parâmetros, o pH e a força iônica geralmente exercem maior efeito sobre a solubilidade, sendo a variação de força iônica realizada através de adição de um sal em um determinado pH um dos métodos mais utilizados. Mas além de sais, outros agentes redutores de solubilidade são aplicados na cristalização de proteínas. Como estes são na grande maioria empregados também na precipitação de proteínas, é comum a utilização do termo “agente precipitante”.

Os agentes redutores de solubilidade tipicamente utilizados para proteínas se classificam em quatro categorias principais: 1) sais, 2) solventes orgânicos, 3) polímeros de cadeias longas e 4) polímeros de massa molecular baixa e compostos orgânicos não voláteis.

De modo geral, há duas categorias de sais: aqueles que interagem preferencialmente com a água, conhecidos como sais não-caotrópicos e aqueles que interagem preferencialmente com grupos eletrostáticos de proteínas, conhecidos como sais caotrópicos. Na cristalização de proteínas, dá-se preferência pelos sais não-caotrópicos, pois estes ajudam a diminuir a solubilidade da proteína, através do fenômeno de "salting out". Um dos sais mais utilizados na cristalização de proteínas é o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Na segunda categoria, a dos solventes orgânicos, deve-se ter um cuidado especial em relação à alguns solventes que podem causar a desnaturação de proteínas. Por esta razão, processos de cristalização de proteínas raramente se baseiam na utilização exclusiva de solventes orgânicos: a cristalização de proteínas com solventes orgânicos é geralmente realizada em combinação com sais. A propriedade de solventes orgânicos em reduzir a solubilidade de proteínas deve-se ao fato que estes diminuem o potencial dielétrico da solução aquosa, aumentando a probabilidade de interações intermoleculares entre as proteínas presentes no meio. Nesta categoria, o etanol é um dos mais utilizados.

Na categoria dos polímeros, os exemplos de aplicação restringem-se basicamente ao PEG (McPherson, 1999; Ducruix, 1992), que consiste de um polímero produzido em cadeias de vários tamanhos contendo de algumas à várias unidades de monômero. Na cristalização de proteínas, a massa molecular do PEG utilizado varia de 0,4 a 20 kDa. Os polímeros apresentam algumas propriedades similares aos sais, competindo pelas moléculas de água e produzindo a desidratação da molécula de proteína, e também aos solventes orgânicos, reduzindo a constante dielétrica do meio. O PEG apresenta a vantagem de ser efetivo em concentrações baixas (4 a 18%) e não penetrar no interior dos cristais (MacPherson, 1999). Um cuidado especial na utilização de PEG é a necessidade de adição de azida de sódio (cerca de 0,1%) de modo a evitar contaminação por bactérias.

Na classe dos compostos orgânicos não voláteis, as propriedades responsáveis pela redução de solubilidade são semelhantes à dos polímeros. O MPD (Metilpentanodiol) é o composto mais utilizado nessa classe e age como

reduzidor de solubilidade através da combinação de atividade de competição por moléculas de água e diminuição do potencial dielétrico da solução.

2.3 MONITORAMENTO DE SUPERSATURAÇÃO

No caso de proteínas, a possibilidade de prever a cristalização a partir de determinada solução é de grande importância, uma vez que algumas espécies levam semanas para formar cristais visíveis macroscopicamente. Nesse sentido, medidas de espalhamento de luz foram muito utilizadas. Técnicas como QELS (“Quasi Elastic Light Scattering”), DLS (“Dynamic Light Scattering”) foram utilizadas por Kam *et al.* (1978), Kadima *et al.* (1991) e Zulauf (1992) para prever a tendência das soluções de lisozima formar cristais a partir da presença de agregados em soluções diluídas. Boyer e Jullien (1996) também utilizaram medidas de espalhamento de luz para relacionar as intensidades de agregação na solução inicial com os tamanhos dos cristais.

Ducruix *et al.* (1996) utilizaram SAXS (“Small Angle X-Ray Scattering”) para caracterizar a influência de vários sais na interação entre moléculas de lisozima em condições próximas à supersaturação e Bonneté *et al.* (1996) utilizaram a mesma técnica para monitorar a evolução da cristalização de lisozima. As técnicas de espalhamento de luz apresentaram assim importante papel em estudos de cristalização de proteínas. Estas técnicas entretanto, servem para a detecção e caracterização da fase sólida em formação e não para o monitoramento de supersaturação.

Para medidas de supersaturação, características da solução como densidade, viscosidade ou condutividade elétrica, entre outras propriedades físicas relacionadas à concentração são normalmente consideradas, podendo se dizer que esses métodos são medidas diretas ou indiretas da concentração (Loffelmann e Mersmann, 2002). A escolha do método adequado para o monitoramento de supersaturação depende das características do meio de cristalização. Medidas de densidade por exemplo, podem não apresentar precisão desejada em casos industriais, onde impurezas estão envolvidas. A condutividade

eletrolítica é limitada a sistemas inorgânicos, visto que moléculas orgânicas ou biológicas apresentam pouca ou virtualmente nenhuma condutividade (Lewiner *et al.*, 2001). Além disso, medidas de condutividade são sensíveis à variação de temperatura sendo inapropriadas para processos politérmicos.

Além das particularidades de cada método, adiciona-se o fato de que os métodos convencionais raramente permitem o monitoramento *in situ* das soluções e, dessa forma, impossibilitam o monitoramento em tempo real, essencial para obtenção de dados cinéticos realísticos. A impossibilidade do monitoramento *in situ* da solução em processos de cristalização ocorre por duas principais razões: 1) a indisponibilidade de tecnologias, tais como sondas e sensores, que permitam medidas em modo remoto e 2) a interferência de sólidos em suspensão sobre as medidas obtidas a partir da fase líquida. Assim, muitos métodos usados no monitoramento de processos de cristalização requerem a etapa adicional de separação das fases durante a realização de medidas.

Muitos estudos tem sido recentemente realizados com objetivo de obter meios mais eficazes de monitoramento de supersaturação. Dentre essas metodologias, as espectroscopias vibracionais ATR-FTIR e Raman tem-se destacado, uma vez que permitem medidas *in situ* em processos de cristalização, sem interferência da fase sólida. A espectroscopia ATR-FTIR apresenta vantagem de ser uma técnica tradicionalmente utilizada na análise de processos químicos, inclusive em ambiente industrial.

A espectroscopia ATR-FTIR foi utilizada por Dunuwila e Berglund (1997) para medida de supersaturação *in situ* na presença de cristais em cristalização de ácido maléico. Os autores mostraram que a técnica era eficiente na determinação *in situ* da concentração de ácido maléico, sendo a sensibilidade da técnica suficiente para avaliar pequenas variações na supersaturação. A principal vantagem do método foi a possibilidade de medidas a partir da solução sem interferências da fase sólida. Trabalhos posteriores como os de Lewiner *et al.* (2001); Feng *et al.* (2002); Fevotte (2002); Lewiner *et al.* (2002) e Grön *et al.* (2003) tem confirmado a adequabilidade da técnica para outros sistemas soluto-solvente. Fevotte (2002) classifica a técnica como base de novas perspectivas

para processos de cristalização de produtos farmacêuticos. Além de monitoramento de supersaturação, avaliações de características mais específicas como transformações polimórficas foram demonstrados por Salari e Young (1999); Skrdla *et al.* (2001) e Lewiner *et al.* (2001). Profir *et al.* (2002) aplicaram a espectroscopia ATR-FTIR no monitoramento da cristalização a partir de mistura racêmica.

Os estudos utilizando Raman são em menor número, entretanto, indicam um potencial deste método, semelhante ao apresentado por ATR-FTIR. O menor número de estudos utilizando Raman deve-se, possivelmente, ao fato deste tipo de espectroscopia não ser uma técnica tradicionalmente utilizada em processos químicos industriais como a espectroscopia de infravermelho.

A técnica Raman, pelo que se conhece da literatura, foi inicialmente utilizada no monitoramento de supersaturação por McMahon *et al.* (1986), sendo que, até então, tinha sido utilizada apenas para soluções concentradas, mas não supersaturadas. Também utilizando Raman, Elankovam e Berglund (1986) relataram sua aplicação no monitoramento *in situ* de soluções supersaturadas de dextrose visando descrição do seu mecanismo de nucleação secundária. Mais tarde, a adequação de espectroscopia Raman na análise de soluções de proteínas levaram Schwartz e Berglund (1999a) a utilizar esta técnica espectroscópica no monitoramento *in situ* da cristalização em gota suspensa de lisozima.

A adequabilidade da espectroscopia Raman na análise de soluções protéicas deve-se principalmente ao fraco espectro da água, solvente universal de materiais biológicos, tal como proteínas. Nos estudos de Schwartz e Berglund foi utilizada uma sonda de fibra ótica equipada com uma objetiva que permitia focalizar a radiação sobre alvos de pequenas dimensões, tal como uma gota de amostra, e obter espectros sem contato com os mesmos. Através desse estudo, determinou-se a solubilidade de lisozima a partir de gotas de alguns microlitros e monitorou-se a concentração de proteína ao longo de todo o processo de cristalização na gota (Schwartz e Berglund, 1999b). Com o sucesso do monitoramento da supersaturação de lisozima, os autores sugeriram a possibilidade de controle da supersaturação durante cristalização em gota suspensa através de

modificações nas taxas de difusão de vapor. Ao que se conhece, este foi o primeiro trabalho a reportar medidas de supersaturação de proteínas através de espectroscopia Raman e o primeiro estudo em que as medidas e controle da supersaturação na gota foi realizado de modo não-invasivo.

Assim, ambas as técnicas, ATR-FTIR e Raman têm-se mostrado bastante eficazes no monitoramento *in situ* de supersaturação com a vantagens de se obter medidas a partir da fase líquida sem interferência da presença de sólidos. Os fundamentos de ambas as espectroscopias são apresentados a seguir.

2.4 ESPECTROSCOPIAS VIBRACIONAIS INFRAVERMELHO E RAMAN

A espectroscopia é tradicionalmente referida como o estudo das interações da luz com a matéria. A luz é constituída de dois campos, elétrico e magnético, mutuamente perpendiculares entre si que se propagam pelo espaço. A energia da onda é descrita na Equação 2.13:

$$E = h c / \lambda \quad (2.13)$$

onde h é a constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js), c , a velocidade da luz ($3,3 \cdot 10^8$ ms⁻¹) e λ o comprimento de onda característico.

As interações entre a luz e determinada amostra podem fornecer informações a respeito da natureza de suas moléculas de acordo com os fenômenos ocorrentes tais como absorção, fluorescência, fosforescência ou espalhamento em várias direções. A ocorrência desses fenômenos dependem do comprimento de onda da luz incidente assim como das características da amostra, estando relacionada com transições energéticas na molécula, entre seus níveis eletrônicos, vibracionais, rotacionais ou nucleares. A espectroscopia se classifica em diferentes técnicas, de acordo com o fenômeno ocorrido e com a faixa de comprimentos de onda do espectro. A Figura 2.1 apresenta as faixas de comprimentos de onda úteis em algumas técnicas de espectroscopia.

Os fenômenos de interação ocorrentes nas espectroscopias infravermelho e Raman, utilizadas neste trabalho, são absorção e espalhamento,

respectivamente. Entretanto, apesar de se basearem em fenômenos diferentes, os espectros obtidos apresentam mesma faixa de comprimento de onda e essas duas técnicas são, assim, classificadas em uma mesma categoria referida como espectroscopia vibracional: os espectros produzidos servem para identificar movimentos vibracionais das moléculas (Ferraro e Nakamoto, 1994; Schrader, 1995).

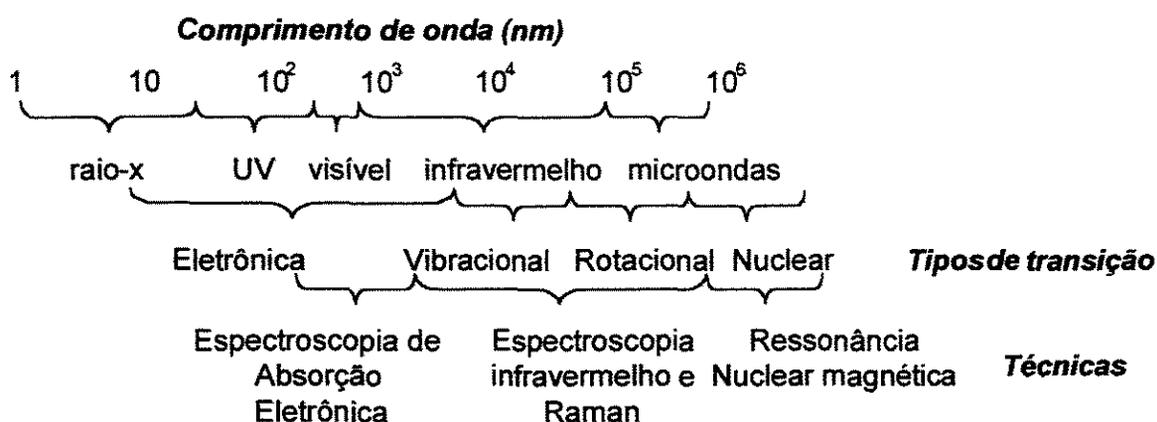


Figura 2.1 - Regiões de comprimentos de onda do espectro eletromagnético e algumas técnicas relacionadas (Freifelder, 1982).

Algumas moléculas são ativas em ambos os métodos, mas existem algumas que são ativas apenas em infravermelho e outras apenas em Raman, e assim, essas duas técnicas são ditas complementares entre si. De acordo com a mecânica quântica uma vibração é ativa no espectro de absorção no infravermelho quando durante a vibração ocorre uma mudança no momento dipolar da molécula, e é ativa no espectro Raman quando durante a vibração ocorre uma mudança na polarizabilidade da molécula (Schrader, 1995). A polarizabilidade é a susceptibilidade da molécula sofrer distorção quando submetida a um campo elétrico, de modo que os núcleos são atraídos pelo pólo negativo e os elétrons são atraídos pelo pólo positivo. Essa distorção causa um momento dipolo P , dada pela relação:

$$P = \alpha E \quad (2.14)$$

sendo α a polarizabilidade da molécula e E o campo elétrico.

2.4.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho

Quando a luz de determinado comprimento de onda incide sobre uma molécula e é absorvida pela mesma, a molécula passa a se apresentar no estado excitado, isto é, alguns de seus elétrons passam a ocupar um nível mais elevado de energia. Os principais níveis de energia de uma molécula são conhecidos como níveis eletrônicos, que representam transições eletrônicas, e são representados através de diagramas de níveis energéticos referidos como 1º nível energético E_1 , 2º nível energético E_2 , 3º nível energético E_3 , e assim por diante. Dentro de cada nível eletrônico há subdivisões que são conhecidos como níveis vibracionais que correspondem aos níveis de energia relacionados aos movimentos de vibração das moléculas decorrentes, por exemplo, dos movimentos de ligações covalentes. Além dos níveis vibracionais há subdivisões menores ainda conhecidos como níveis rotacionais, estes, no entanto são de pouca importância na espectroscopia de absorção (Freifelder, 1982; Chang, 1971).

A luz de um determinado comprimento de onda é passível de ser absorvida por uma molécula, quando a energia dessa radiação se iguala à diferença entre dois níveis energéticos da molécula.

Para grande parte das moléculas, os comprimentos de onda cuja energia corresponde às transições eletrônicas encontram-se na faixa da luz UV-visível e as transições entre estados vibracionais decorrem de absorção de luz na faixa do infravermelho (Brame e Grasseli, 1977; Freifelder, 1982).

O mecanismo da espectroscopia no infravermelho é fundamentalmente semelhante à espectroscopia no UV-visível por ambas basearem-se no mesmo fenômeno, a absorção de luz. Estas duas técnicas se distinguem entre si por estarem relacionadas à absorção de luz de diferentes frequências ou

comprimentos de onda e, conseqüentemente, possibilitam a identificação de diferentes grupos químicos. Independente do comprimento de onda e do tipo de transição envolvida, a intensidade de absorção é governada pela lei de Lambert-Beer dada pela Equação 2.15:

$$I = I_0 e^{-\epsilon C d} \quad (2.15)$$

onde I_0 e I são as intensidades da luz incidente e transmitida, respectivamente, ϵ o coeficiente de absorção molecular, e C e d , a concentração da amostra e a distância do caminho óptico, respectivamente. Na espectroscopia de infravermelho é usual expressarmos as intensidades de absorção em termos de porcentagem de transmitância T (%):

$$T (\%) = \frac{I}{I_0} 100 \quad (2.16)$$

Para análises quantitativas, a probabilidade de absorção, ou ainda absorbância (Equação 2.17) é preferencialmente utilizada:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon d C \quad (2.17)$$

O espectro infravermelho é caracterizado pela intensidade de absorção em função de números de onda $\bar{\nu}$ também conhecido por freqüência (inverso do comprimento de onda) expressa em unidades de cm^{-1} . A preferência por diferentes unidades de expressão está relacionada com o tipo de espectroscopia utilizada. Nas regiões visível e UV, por exemplo, utiliza-se comprimento de onda λ expressa em unidades de nm. Na região das microondas utiliza-se freqüência ν em unidades de Hertz.

Na espectroscopia infravermelho há ainda subclasses, de acordo com a faixa de freqüência do espectro. O termo genérico, espectro infravermelho, refere-se à região do infravermelho médio, "Mid-IR", que corresponde à faixa de 4000 cm^{-1} ($2,5 \mu\text{m}$) a 400 cm^{-1} ($25 \mu\text{m}$). Entretanto, são também parte do espectro infravermelho as regiões conhecidas como infravermelho próximo, "Near-IR" e

infravermelho distante, "Far-IR", que correspondem, respectivamente, às faixas de 15.000 cm^{-1} ($0,67\ \mu\text{m}$) a 3.000 cm^{-1} ($3,33\ \mu\text{m}$) e 600 cm^{-1} ($16,67\ \mu\text{m}$) a 10 cm^{-1} ($1000\ \mu\text{m}$) (Ewig, 1990).

A espectroscopia infravermelho é considerada atualmente uma das técnicas mais versáteis e flexíveis dentre as espectroscopias moleculares, podendo ser aplicada para uma diversidade de materiais orgânicos, inorgânicos e de origem biológica, permitindo ainda a análise de produtos nos estados sólido, líquido ou gasoso. Esta análise de materiais em diferentes estados é realizada através de acessórios desenvolvidos especificamente para diversos tipos de aplicação.

O desenvolvimento desses acessórios, a partir da década de 80, juntamente com a introdução dos espectrofotômetros baseados na transformada de Fourier (FT), na década de 70, foram responsáveis pelo ressurgimento da espectroscopia infravermelho como um instrumento de grande aplicabilidade e potencial.

Os espectrofotômetros FT se diferenciam dos antigos instrumentos dispersivos pelo fato do sistema óptico (espectrômetro) se basear em um interferômetro ao invés de um monocromador. O sistema óptico é o principal componente de um espectrofotômetro que é também constituído pela fonte de radiação, o detector, o compartimento de amostras, os componentes eletrônicos e o sistema de tratamento de dados.

O sistema óptico é responsável pela separação da radiação em comprimentos de onda distintos. Nos instrumentos dispersivos essa separação é realizada através de filtros ou grades conhecidos como monocromadores enquanto que nos instrumentos FT ela é feita através de um interferômetro.

O principal componente de um interferômetro é o modulador onde é gerado o interferograma, que é basicamente o sinal gerado durante a obtenção de um espectro. O interferograma contém toda a informação necessária na geração do espectro, e para isso ele é processado através de um tratamento matemático incluindo a transformada de Fourier. A grande vantagem do sistema óptico baseado no interferômetro é a velocidade de obtenção do espectros que permitem

por exemplo a obtenção de um espectro através de 100 varreduras em pouco mais de um minuto.

Outros fatores que contribuíram no melhor desempenho desses instrumentos é a maior capacidade computacional que permite a manipulação dos espectros através de tratamentos como a derivatização, normalização, alisamento dos espectros, alinhamento da linha base, subtração de espectros, entre outros. Em contraste com os antigos instrumentos, os sistemas ópticos atuais possuem um menor número de reflexões e menor caminho óptico, contribuindo para maior estabilidade do sistema e menor contato da radiação com o vapor d'água e CO₂ presentes no ar.

2.4.2 Espectroscopia de infravermelho com refletância total atenuada - ATR (“Attenuated Total Reflectance”)

Uma dificuldade da espectroscopia infravermelho tradicional era a limitação na análise de amostras em solução aquosa devido ao alto coeficiente de absorção de luz infravermelho pela água, impossibilitando visualização de bandas do soluto. Para amenizar o problema, uma prática tradicionalmente utilizada é o uso de soluções deuteradas que apresentam menor coeficiente de absorção (Freifelder, 1982; Chang, 1971) ou ainda a subtração digital dos espectros que permite diferenciar o espectro do solvente e do soluto. Essa subtração pode se qualitativamente satisfatória mas não é um método ideal para análises quantitativas.

Além desses métodos tradicionais, uma outra alternativa mais recente é a utilização da técnica de refletância total atenuada – ATR (“Attenuated Total Reflectance”). A obtenção de espectros através dessa técnica difere do modo de obtenção de espectros infravermelho convencionais pelo uso de um elemento de refletância interna ou elemento ATR posicionado entre a radiação e a amostra (Figura 2.2).

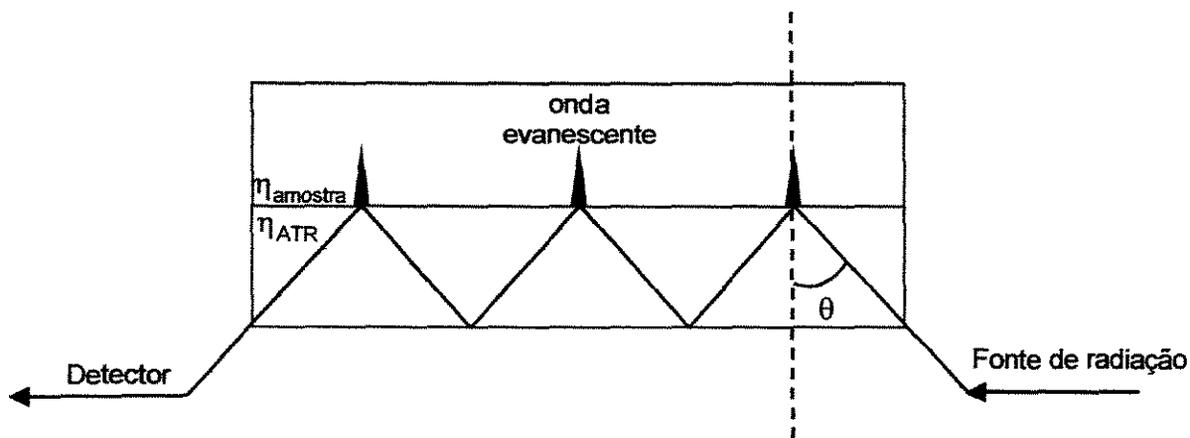


Figura 2.2. Diagrama esquemático da refletância total interna na técnica ATR-FTIR.

O elemento ATR é composto de um material com alto índice de refração, tal como seleneto de zinco, iodeto de talio-brometo, germânio, entre outros. A radiação é direcionada ao elemento ATR com determinado ângulo de incidência θ de modo a favorecer a refletância total da luz através do mesmo. Para que haja refletância interna, o índice de refração do elemento η_{ATR} deve ser maior que o da amostra $\eta_{amostra}$ e o ângulo de incidência θ deve ser maior que o ângulo crítico, que é definido como $\text{sen}^{-1} (\eta_{amostra} / \eta_{ATR})$.

A radiação é refletida através do elemento ATR atingindo a interface entre o elemento e a amostra em cada ponto de reflexão, sendo a seguir direcionado para o detector. O número de reflexões varia de acordo com as dimensões e formato do acessório. Apesar da suposta reflexão total na interface, a luz libera uma radiação em cada ponto de reflexão que penetra uma pequena distância na amostra.

Essa radiação é denominada onda evanescente e sua profundidade de penetração na amostra é da ordem de alguns micrometros. Um composto é capaz de absorver a radiação a partir da onda evanescente em determinados comprimentos de onda. Caso ocorra a absorção, a radiação direcionada ao detector é atenuada nos comprimentos de onda absorvidos gerando as bandas no espectro da amostra.

Como a profundidade de penetração nesta técnica é pequena minimiza-se a intensidade de absorção de fortes absorvedores como por exemplo a água. De acordo com a lei de Lambert-Beer, Equação 2.15, a absorbância é proporcional à concentração e ao caminho óptico, que na técnica ATR, é definido como o produto do número de pontos de reflexão, N, em contato com a amostra e a profundidade de penetração d_p calculado através da Equação 2.18:

$$d_p = \frac{\lambda_c}{2\pi\eta_{ATR} \left[\text{sen}^2\theta - \left(\frac{\eta_{amostra}}{\eta_{ATR}} \right)^2 \right]^{1/2}} \quad (2.18)$$

onde λ_c é o comprimento de onda da radiação, θ é o ângulo de incidência e $\eta_{amostra}$ e η_{ATR} são, respectivamente, os índices de refração da amostra e do elemento ATR.

O valor de d_p é geralmente muito pequeno e as diferenças apresentadas por diferentes amostras, em um mesmo comprimento de onda, é insignificante. Assim, o produto "N. d_p " pode ser considerado virtualmente constante para cada comprimento de onda, não afetando assim o caminho óptico efetivo. De maneira geral, o comprimento de onda é o fator determinante da profundidade de penetração para determinado elemento ATR. Por exemplo, para um elemento de Ge com ângulo de 45°, a profundidade de penetração pode variar de 0,2 μm a 1 μm variando-se o comprimento de onda de 3333 cm^{-1} a 833 cm^{-1} e, para um elemento de ZnSe com ângulo de incidência de 45°, pode variar de 0,5 μm a 4 μm , na mesma faixa de comprimento de onda (Coleman, 1993).

A configuração do elemento ATR é bastante variável, havendo atualmente a disponibilidade de diferentes acessórios como placas horizontais para análise de filmes poliméricos, células cilíndricas (CIRCLE cell – "Cylindrical Internal Reflectance for Liquid Evaluation cell") para análise de soluções, ou ainda sondas de imersão que permitem a análise de sólidos assim como líquidos. Os elementos em forma de placa horizontal e célula cilíndrica são normalmente posicionados no compartimento de amostras do espectrofotômetro. A sonda de imersão possui

elementos ópticos e sistema para direcionamento do feixe de luz do equipamento até a extremidade da sonda e desta para o detector.

2.4.3 Espectroscopia Raman

Quando um grupo de moléculas é iluminado por uma luz monocromática, cujo comprimento de onda não permite sua absorção, a maior parte da luz incidente é transmitida diretamente através da amostra e outra parte é espalhada. Maior parte deste espalhamento é elástico, isto é sem perda de energia sendo que a frequência da luz espalhada ν é a mesma da luz incidente ν_0 . Esse tipo de espalhamento é conhecido como espalhamento Rayleigh (Ferraro e Nakamoto, 1994).

Ainda que com uma menor ocorrência, outra parte do espalhamento é inelástico, sofrendo ganho ou perda de energia, sendo referido como espalhamento Raman. Nesse fenômeno, o ganho ou perda de energia pela luz incidente ocorre devido à transições vibracionais da molécula durante interação com a luz e, assim, a frequência da luz espalhada ν é sempre acrescida ou diminuída pela frequência vibracional da molécula, ν_m : $\nu = \nu_0 \pm \nu_m$.

Caso a luz sofra perda de energia, isto é, um fóton da luz incidente é transferido para a molécula, o espalhamento é do tipo Stokes. Caso ocorra o processo inverso, isto é, a molécula transfere energia vibracional para o fóton incidente, o espalhamento é do tipo anti-Stokes. Este processo inverso é muito pouco provável de ocorrer, e o sinal espectral resultante de um ganho de energia é tão fraco que não é usualmente detectado.

Assim, pode-se dizer que o espectro Raman é decorrente da diminuição na frequência da luz incidente, $\nu_0 - \nu_m$ (Freifelder, 1982).

Independente da frequência de luz incidente, a informação obtida na espectroscopia Raman se dá em termos de frequências vibracionais, como na espectroscopia por infravermelho, tornando-as complementares entre si (Brame e Grosseli, 1977). Em um espectro Raman as linhas espectrais são fornecidas em função de frequências denominadas "Raman shift" que são expressas em cm^{-1} .

A Figura 2.3 é uma representação esquemática ilustrando os mecanismos de interação da luz nas espectroscopias infravermelho e Raman. Na espectroscopia infravermelho, o feixe de luz I_0 de determinada frequência ν_0 é irradiada sobre a amostra, sendo parcialmente absorvida, de modo que a luz transmitida chega ao detector com uma intensidade I diferente da inicial, entretanto com mesma frequência ν_0 . Na espectroscopia Raman uma luz de frequência ν_0 é irradiada sobre uma amostra decorrendo em dois tipos de espalhamento: o espalhamento elástico (Rayleigh) onde a luz espalhada tem a mesma frequência ν_0 da luz incidente, e o espalhamento inelástico (Raman) onde a luz espalhada tem frequência igual à frequência da luz incidente ν_0 mais a frequência vibracional da molécula ν_m .

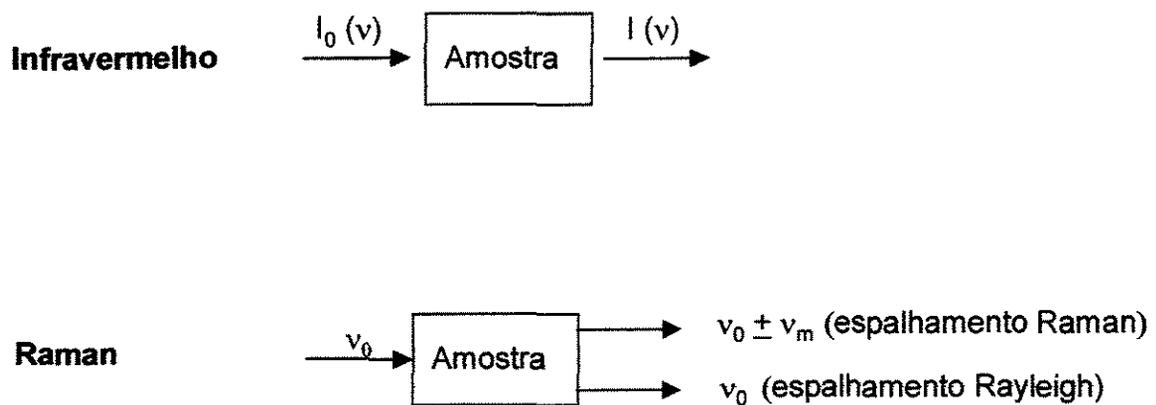


Figura 2.3. Mecanismos das espectroscopias Raman e infravermelho.

Apesar do potencial, a espectroscopia Raman não é tradicionalmente utilizada como a espectroscopia infravermelho pois, por muitos anos, foi considerada um método de baixa detecção. Do total de fótons incidentes, apenas 1 em 10^8 exibe espalhamento inelástico (Ewing,1990) e, conseqüentemente, as intensidades dos espectros são similarmente baixos havendo dificuldades na detecção. Para uma boa sensibilidade na detecção das linhas espectrais é

preciso uma fonte de iluminação bastante intensa como fontes de laser, que são atualmente utilizados.

Assim, o desenvolvimento da espectroscopia Raman foi impulsionada notavelmente com o advento das fontes de laser, na década de 60, e somente a partir de então, é que ela se estabeleceu como uma técnica de maior aplicabilidade em diversas áreas de estudo. As fontes de laser mais comuns tem sido Hélio-Neônio, Argônio, Kriptônio e, mais recentemente, fontes de Nd-YAG ("Neodymium doped Yttrium-Aluminum Garnet"). O laser He-Ne apresenta relativo baixo custo, e assim, é um dos mais utilizados, embora em alguns casos as fonte de Argônio e Kriptônio com maior potência sejam mais adequadas. A adequabilidade de um ou outro laser depende das características da amostra. Por exemplo, as fontes de Kriptônio e Nd-YAG com comprimento de onda na região do infravermelho, são preferíveis quando se quer evitar efeitos de fluorescência (Lserna, 1996). Muitos compostos fluorescem quando incididos por luz na faixa do visível e, devido a baixa ocorrência do espalhamento Raman, as bandas do seu espectro podem ser obscurecidas pela fluorescência. A aplicação de uma fonte na faixa do infravermelho diminui os limites de detecção, mas a perda é compensada pela diminuição da fluorescência.

Além da fonte de luz, o espectrofotômetro é composto basicamente por um monocromador, um detector, um conjunto de componentes eletrônicos e um sistema de tratamento dos sinais espectrais. Uma vez que a luz incide sobre a amostra, a luz espalhada é captada por uma lente sendo então focada e direcionada para o monocromador que, então, separa a luz em comprimentos de onda ou frequências distintas. Alguns equipamentos possuem monocromadores simples, embora os atuais instrumentos possuam um monocromador duplo ou triplo.

Quanto ao detector, este pode ser simples ou com multicanais. O detector do tipo simples é constituído por um tubo fotomultiplicador que apresenta a vantagem de ser bastante estável e robusto, com possibilidade de operar com sistemas que exibem alta fluorescência e também para medidas em baixas frequências (menor que 30 cm^{-1}). A desvantagem desse sistema é a estreita faixa

do sinal detectado em cada varredura (tipicamente de 1 cm^{-1}) fazendo com que a obtenção de toda a faixa do espectro seja lenta (cerca de 20 min). Dessa forma, o detector com multicanais é preferencialmente utilizado nos atuais instrumentos. Este tipo de detector é constituído por uma série de fotodiodos (tipicamente 512 ou 1024), cada um encarregado de detectar uma diferente faixa do espectro durante uma única varredura permitindo que o espectro seja obtido mais rapidamente (cerca de 2 min). Um cuidado adicional com este tipo de detector é que com o passar do tempo, os diferentes elementos podem apresentar diferentes respostas afetando a detecção do espectro (Ewig, 1990).

O tratamento dos dados é realizado de maneira similar aos espectros infravermelho e, em alguns casos, algumas operações como a normalização, derivatização, subtração e calibração dos espectros podem ser realizadas em programas computacionais interfaciados à espectrofotômetros de infravermelho.

Como na espectroscopia infravermelho, a análise de diferentes tipos de materiais é possível através da espectroscopia Raman que é possibilitada através do uso de diferentes acessórios. Uma das grandes vantagens da espectroscopia Raman é a possibilidade de se posicionar a amostra em recipientes de vidro, uma vez que estes são virtualmente transparentes à radiação na faixa do visível, ou apresentam sinais em uma região diferente daquelas regiões onde a maioria dos compostos de interesse apresentam suas bandas de espalhamento Raman. Outra grande vantagem é a possibilidade de se focar o laser sobre amostras de dimensões da ordem de até $1 \mu\text{m}$ através da utilização de lentes objetivas. Essa possibilidade tem permitido a aplicação da espectroscopia Raman no campo da microanálise, essencial em alguns setores, como exemplo os sistemas biológicos.

No entanto, a maior revolução da espectroscopia Raman foi, provavelmente, o desenvolvimento da sonda de fibra óptica que permite a aquisição de dados de modo remoto. A sonda de fibra óptica é constituída por um conjunto de fibras ópticas pelas quais o feixe de radiação é transportado a partir do equipamento até a amostra e desta para o detector. Nesse sistema o espalhamento é coletado a um ângulo de 180° , conhecido como "backscattering".

A distância da amostra e do equipamento é limitada pelo comprimento dos cabos de fibra óptica que podem ter comprimentos da ordem de até 1 Km (Ewig, 1990).

Considerando os recentes e contínuos avanços desta técnica, considera-se que há atualmente grandes vantagens em se utilizar simultaneamente ambas as técnicas, infravermelho e Raman, para caracterização e identificação de compostos.

2.5 QUIMIOMETRIA APLICADA À ESPECTROSCOPIA

A quimiometria é uma disciplina que usa métodos matemáticos para planejar procedimentos ótimos de medidas e experimentos e selecionar as variáveis que forneçam o máximo de informações relevantes quantitativa ou qualitativamente. Dentre as finalidades quantitativas da quimiometria se encontram os métodos de calibração multivariada. Tais métodos constituem um campo de estudo à parte, sendo que a espectroscopia foi uma das técnicas que mais se beneficiaram destes métodos (Geladi e Kolwaski, 1986; Thomas, 1994).

Neste texto é feita uma abordagem à calibração multivariada de forma superficial com o propósito de apenas situar o leitor quanto a sua aplicação nesse trabalho. Para maiores detalhes sobre a calibração multivariada, métodos diversos de regressão multivariada são discutidos em textos de quimiometria como os apresentados por Adams (1995); Massart (1988) e Kenneth (1998). Um tutorial simplificado é ainda apresentado por Ferreira *et al.* (1999) e discussões específicas sobre a calibração PLS, utilizada neste trabalho, são apresentados por Geladi e Kowaski, 1986 e Thomas (1994).

Na quantificação espectroscópica através de modelos de calibração convencionais relaciona-se a concentração de um determinado analito "C" com uma variável do espectro tal como "Abs_λ" (intensidade de absorção de luz num dado comprimento de onda), "L_{pico}" (altura de determinado pico do espectro) ou ainda "A_{pico}" (área de determinado pico do espectro). Por envolverem uma única variável do espectro, esses modelos podem ser precisos na quantificação de um componente em soluções puras em condições estáveis, entretanto podem ser

afetados na presença de interferentes tais como temperatura, impureza, entre outros, conhecidos por influenciarem a intensidade assim como a localização de determinadas bandas espectrais. Na calibração multivariada, a concentração de um ou mais analitos em uma mesma solução são relacionados com todo o conjunto de variáveis contidas nos espectros. Desse modo é possível a predição simultânea de dois ou mais solutos presentes em uma solução, assim como a identificação de interferentes e de problemas eventuais com a linha de base.

Dentre os principais métodos de calibração multivariada - como o MLS ("Multiple Linear Regression"), PCR ("Principal Component Regression") e PLS ("Partial Least Squares"), cada um baseando-se em diferentes tratamentos matemáticos - o modelo PLS, utilizado neste trabalho, tem sido preferido no campo da espectroscopia devido à sua maior simplicidade e também por ser mais robusto, com boa estabilidade dos parâmetros do modelo com a introdução de novas amostras.

Na calibração multivariada os espectros são organizados em uma matriz X ($n \times m$), de variáveis independentes,

$$X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \cdots & X_{1m} \\ X_{21} & X_{22} & \cdots & X_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \cdots & X_{nm} \end{bmatrix}$$

onde as linhas representam as amostras e as colunas representam as variáveis, no caso, os comprimentos de onda. Da mesma forma, o conjunto de dados contendo as concentrações das amostras é organizado em uma matriz Y , caso haja mais de um soluto, ou por um vetor y , caso haja apenas um soluto a ser monitorado.

Uma vez que os dados se encontram organizados, dá-se início ao processo de calibração no qual se faz inicialmente um tratamento ou pré-processamento dos dados tais como centralização ou autoescalamamento. Na centralização, calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de

onda, a qual é subtraída de cada intensidade no respectivo comprimento de onda. Dessa forma diz-se que os dados foram centralizados na média. No autoescalamamento, procedimento mais utilizado quando as variáveis apresentam diferentes unidades, os dados centralizados são divididos pelo respectivo desvio padrão. Dados espectroscópicos na grande maioria são centralizados na média. Esses processamentos são realizados através de programas computacionais como o MATLAB e, atualmente, são disponíveis em programas desenvolvidos especialmente para tratamento de dados espectroscópicos.

Após o pré-processamento dos dados, a matriz é manipulada através da Análise de Componentes Principais (PCA - "Principal Component Analysis"), que consiste de análise conjunta dos dados visando correlacionar o maior número possível de variáveis, resultando em um número reduzido de dados. Um novo sistema de eixos é gerado para representar as amostras, sendo esses eixos denominados de fatores, componentes principais ou variáveis latentes. A obtenção desses eixos é representada na Figura 2.4, onde através da covariância de dados originais em um plano tridimensional X,Y e Z são gerados dois eixos PC_1 e PC_2 ortogonais que passam a representar os dados em um plano bidimensional. Apresenta-se aqui um sistema tridimensional, mas em um caso real, digamos, em um conjunto de dados espectrais, o sistema apresentaria tantas dimensões quanto fossem os comprimentos de onda da faixa espectral.

O conjunto de eixos gerados, referidos como componentes principais, PC_1 , PC_2 , PC_3 e assim por diante, são apresentados em ordem de maior relevância no modelo, isto é, que descrevem a maior variação dos dados. Por exemplo, o PC_1 correlaciona as variáveis originais (comprimentos de onda), que melhor descrevem a variação das concentrações das amostras. As novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos das componentes principais, são denominadas de "scores". Cada componente principal é construído pela combinação linear das variáveis originais, sendo que os coeficientes dessa combinação linear são denominados de "loadings".

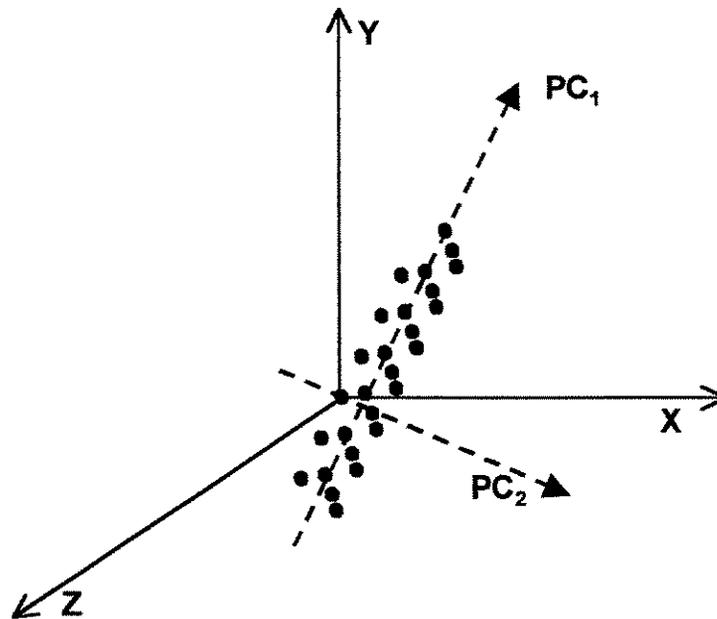


Figura 2.4. Representação gráfica da regressão de componentes principais gerando vetores de covariância.

Feita a análise de PCA, prossegue-se com o processo de calibração selecionando-se o número de fatores (número de componentes principais ou número de variáveis latentes) que serão empregados na construção do modelo. Para a determinação das componentes principais empregados na modelagem, existem diferentes métodos, sendo a validação cruzada um dos métodos mais utilizados devido sua praticidade.

A validação cruzada consiste em remover uma amostra do conjunto de calibração, construindo um novo modelo temporário sem essa amostra. A seguir, o novo modelo é aplicado para prever a concentração da amostra removida, calculando-se o erro de predição dessa amostra. O processo é repetido para cada amostra do conjunto de calibração, calculando-se no final o valor de PRESS ("Predicted Residual Error Sum of Squares") que é a soma dos quadrados dos erros de predição de cada amostra. Ao final, é obtido um gráfico onde são apresentados os valores de PRESS em função das componentes principais. Através desse gráfico, o número de fatores ou componentes principais será definido como o valor correspondente ao menor valor de PRESS ou o valor a partir do qual

um acréscimo no número de fatores não modifica o valor de PRESS. A seleção do número mínimo de fatores garante a eliminação de informações relacionadas à ruídos e interferências. A validação cruzada serve também para a avaliação do modelo gerado, através dos erros de predição calculados durante o procedimento.

2.6 APROTININA: PROPRIEDADES GERAIS E CRISTALIZAÇÃO

A aprotinina, ou “Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor” (BPTI) é uma proteína de 58 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 6,5 kDa e ponto isoelétrico de 10,5. Sua molécula é bastante compacta (29 x 19 x 19 Å) devido à existência de três ligações de dissulfeto que também propiciam estabilidade a extremos de pH (de 2 a 12) e temperatura (de 4 a 80 °C) (Kassel, 1970).

A aprotinina tem sido utilizada em estudos sobre interações proteína-proteína e na proteção de proteínas recombinantes da ação de proteases (Norris *et al.*, 1990; Tscheche *et al.*, 1987). Como fármaco, tem sido indicada no tratamento de choque hemorrágico-traumático em cirurgias cardíacas e de grande porte (Baufreton *et al.*, 1996 ; Carrera *et al.*, 1993; Quereshi *et al.*, 1992).

A aprotinina está presente no fígado, pulmão e pâncreas bovinos e é também expressa em sistemas recombinantes (Barthel e Kula, 1995; Zhong *et al.*, 1999; Azzoni *et al.*, 2002).

Na recuperação e purificação desta molécula, diferentes métodos têm sido explorados, entre eles, cromatografia de troca iônica e HPLC de fase reversa (Norris *et al.*, 1990; Zurek *et al.*, 1996), cromatografia de afinidade através da adsorção em enzimas imobilizadas (Kassel, 1970; Fiorucci, 1995; Barthel e Kula, 1995; Azzoni e Miranda, 1999) e cromatografia de adsorção em íons metálicos imobilizados (Genaro *et al.*, 2002; Tamagawa *et al.*, 1999).

A literatura não descreve processos de RPB de aprotinina baseados em cristalização. A cristalização de aprotinina é citada na literatura mas, em grande parte, como instrumento de estudos visando caracterização molecular e seu

comportamento em solução (Kunitz e Northrop,1935; Walter e Huber, 1983; Wlodawer *et al.*,1984; Wlodawer *et al.*, 1987; Berndt *et al.*,1992).

Alguns estudos sobre as condições de cristalização de aprotinina foram realizados por Lafont *et al.* (1994, 1997) e Veessler *et al.* (1996). Lafont *et al.* (1994) estudaram a solubilidade de aprotinina na presença de NaCl e verificaram que esta é menor quanto mais altas a temperatura e a força iônica, sendo o efeito da temperatura mais pronunciado em força iônica baixa. Lafont *et al.* (1997) estudaram a solubilidade de aprotinina em soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KSCN em diferentes temperaturas.

Em ambos os casos, a solubilidade de aprotinina foi baixa na presença de forças iônicas altas, comportamento este, semelhante ao observado nas soluções contendo NaCl. Em relação à temperatura, a solubilidade foi maior com o aumento de temperatura para as soluções contendo KSCN, comportamento este, oposto ao apresentado pelas soluções de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Veessler *et al.* (1996) determinaram velocidades de crescimento dos cristais hexagonais de aprotinina em soluções de NaCl que foram de 15,8 a 37,8 $\mu\text{m}/\text{dia}$.

2.7 LISOZIMA: PROPRIEDADES GERAIS E CRISTALIZAÇÃO

A lisozima é uma proteína com massa molecular de 14,4 kDa e ponto isoelétrico de 11,5, encontrada principalmente em ovos de aves e também presente na lágrima, secreção nasal, saliva, baço e leucócitos. A lisozima tem sido considerada por décadas a proteína modelo em estudos de cristalização de proteínas, sendo extensamente explorada em diversos estudos.

A facilidade de lisozima gerar cristais a partir de soluções é certamente a principal razão desta proteína ser mais explorada em estudos de cristalização. Além disso, atualmente, o maior volume de dados sobre a cristalização de lisozima em relação a outras proteínas estimula sua escolha como modelo contribuindo para que essa posição seja mantida. Entretanto, a representatividade de lisozima como modelo é atualmente questionada, visto que resultados obtidos com essa molécula não se aplicam à cristalização de outras

proteínas, sendo que estas, em grande parte apresentam maiores dificuldades (Chayen e Saridakis, 2001).

Apesar da lisozima ser utilizada como modelo, algumas observações sobre sua cristalização realizadas por diferentes autores tem sido contraditórias mostrando que apesar da relativa facilidade de cristalizar, os fenômenos envolvidos não são ainda bem compreendidos. Ao passo que alguns autores sugerem o crescimento do cristal a partir de unidades moleculares (Durbin e Feher, 1986; Rosenberger *et al.*, 1996), outros autores contestam essa informação alegando que as unidades de crescimento são agregados moleculares (Wilson e Pusey, 1992; Grimbergen *et al.*, 1999; Price *et al.*, 2001).

Ataka e Tanaka (1986) relataram que, na cristalização de lisozima, um aumento da supersaturação não necessariamente resulta no aumento da nucleação, como sugere a teoria da nucleação (Boistelle e Astier, 1988). Entretanto, Judge *et al.* (1999), assim como Riès-Kautt e Ducruix (1992), afirmam que quanto maiores a supersaturação e a temperatura, maior a nucleação de lisozima, como previsto pela teoria.

Fiddis *et al.* (1979); Kam *et al.* (1978); e Pusey e Naumann (1986) também se deparam com observações contraditórias. Fiddis *et al.* concluíram que a taxa de crescimento de cristais de lisozima é controlada pela nucleação na superfície, sendo limitada simplesmente pela cinética do fenômeno. Ao contrário, Kam *et al.* (1978) afirmam que, não somente a cinética mas também, os efeitos de transporte devem ser igualmente considerados. Pusey e Nauman concluíram que o crescimento de cristais de lisozima é governada pela cinética de superfície e depende do quadrado da supersaturação local.

O estudo da cristalização de lisozima baseando-se em modelos de crescimento cristalino estabelecidos para moléculas convencionais foi realizado por Durbin e Feher (1986). Entretanto, não foi possível estabelecer um modelo que conseguisse ser aplicado para diferentes condições, levando-o assim a questionar a aplicação de modelos convencionais à cristalização de proteínas.

A solubilidade de lisozima em função de temperatura, pH e da presença de diferentes sais, NaSCN, NaCl e NaNO₃, é apresentada por Howard *et al.*

(1988); Ataka e Asai (1988); Guilloteau *et al.* (1992) e Judge *et al.* (1999). Estes estudos mostraram que a solubilidade e a cristalização de lisozima era afetada pela temperatura, pH e pela presença de sais liotrópicos de acordo a série de Hofmeister. Maiores números de cristais foram obtidos em altas temperaturas e pH na faixa de 4,0 a 5,2.

CAPÍTULO 3 - MONITORAMENTO DE SUPERSATURAÇÃO ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR

No presente capítulo são apresentados os estudos realizados através da espectroscopia ATR-FTIR, visando o monitoramento e controle da supersaturação de lisozima. Estes estudos foram realizados utilizando-se dois diferentes acessórios: uma placa horizontal contendo elemento ATR de Ge e uma sonda de imersão contendo elemento ATR cônico de ZnSe.

A utilização de lisozima nesses estudos deu-se pelo fato de ser uma molécula de relativo baixo custo, além de ser uma das moléculas mais utilizadas em estudos de cristalização. As condições do meio de cristalização de lisozima basearam-se em dados encontrados na literatura (Howard *et al.*, 1988) e consistiram de soluções acetato de sódio 50 mM a pH 4,5, contendo NaCl como agente redutor de solubilidade. A solubilidade de lisozima no presente estudo foi determinada em tubos Eppendorf de 1,5 ml, sendo os sobrenadantes analisados por medidas de absorbância a 280 nm.

A utilização do acessório horizontal de Ge baseou-se em uma pequena célula de cristalização, com capacidade de 1,0 ml de solução, tendo como fundo a superfície do elemento horizontal de Ge. Desse modo, com o meio de cristalização depositado sobre o elemento ATR, o processo era monitorado *in situ*. A obtenção e controle da supersaturação nesse reservatório era baseada na evaporação induzida por diferença de força iônica do meio em relação a uma solução salina circulante.

Esse sistema apresentou sucesso na supersaturação da solução protéica por evaporação assim como no monitoramento do processo antecedendo a formação dos cristais. O monitoramento das soluções se baseou em um modelo de calibração PLS desenvolvido previamente, através do programa computacional

Quant-IR, Applied Systems, EUA. O problema no uso deste sistema foi que os cristais de lisozima interagiram com a superfície de Ge interferindo nas medidas, inviabilizando o seu uso para esse meio específico de cristalização. Atenta-se para o fato de que a proteína da fase líquida não apresentou adsorção no elemento ATR.

Além da célula de cristalização por difusão de vapor, com o problema de adsorção de cristais, foi avaliada a aplicabilidade da sonda de imersão no monitoramento de soluções protéicas. O modelo PLS desenvolvido apresentou boa precisão e aplicabilidade para diferentes temperaturas.

O problema encontrado na utilização desse sistema de monitoramento foi a adsorção protéica (tendo-se testado lisozima e insulina suína) sobre a superfície do elemento ATR na sonda, interferindo nas medidas obtidas.

3.1 METODOLOGIA

3.1.1 Materiais e equipamentos

Materiais: A lisozima de 99% de pureza, três vezes cristalizada, fornecida pela Sigma, EUA, foi utilizada nestes estudos sem tratamento adicional. Demais reagentes utilizados foram de pelo menos grau analítico. Para avaliação da adsorção protéica na sonda ATR utilizou-se tripsina suína fornecida pela Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil. Todas as soluções foram preparadas em água purificada em equipamento Mili-Q (Millipore, EUA) e filtradas em filtros de acetato de celulose com tamanho de poros de 0,45 μm , também da Millipore, EUA. As soluções foram filtradas em seringa de 3,0 ml acoplada a um suporte para filtros, com diâmetro de 25 mm.

Equipamentos e acessórios: Na obtenção dos espectros ATR-IR foram utilizados: um espectrofômetro infravermelho modelo Protégé 460 da Nicolet Instruments, EUA, uma sonda Dipper 210 contendo elemento ATR cônico de ZnSe da Axiom Analytical, EUA e um acessório contendo elemento ATR horizontal de

Ge da Spectra-Tech, EUA. Na determinação de solubilidade de lisozima utilizou-se espectrofotômetro Hitachi, EUA e um banho termostático da Quimis Aparelhos Científicos, Brasil (precisão $\pm 0,2$ °C). Para ajuste de pH utilizou-se pHmetro Corning, EUA.

3.1.2 Determinação da solubilidade de lisozima

Volumes de 1,5 ml de solução supersaturada de lisozima na presença de NaCl foram mantidos em repouso em tubos Eppendorf a 24°C, em banho termostático. As concentrações de proteína dessas soluções basearam-se nos dados de solubilidade de lisozima relatados por Howard *et al.* (1988): essas concentrações foram estabelecidas em valores significativamente maiores que as solubilidades, garantindo que as soluções estivessem supersaturadas. As concentrações de lisozima eram de 20 a 150 mg/ml e as concentrações de NaCl de 0,24 a 1,5 M.

As soluções do ensaio foram preparadas a partir de diluições de soluções concentradas de NaCl e de lisozima, ambas preparadas em tampão acetato de sódio a pH 4,5, sendo este pH ajustado através da adição de NaOH no caso da solução salina e com adição de HCl no caso da solução protéica. Previamente ao ajuste, as soluções com alta concentração protéica apresentavam um pH em alguns décimos de unidades acima de 4,5 e as soluções com alta concentração de sal apresentavam um pH com alguns décimos de unidades abaixo desse valor.

Para cada condição haviam vários tubos, que eram removidos do banho termostático ao longo do tempo, tendo o seu sobrenadante avaliado através de absorvância a 280 nm, aplicando o coeficiente de extinção $A_{280\text{nm}}$ de $2,32 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}$ previamente determinado. Para a realização das medidas de absorvância, as soluções eram centrifugadas (2000 g, 5 min) e devidamente diluídas. Esse procedimento era repetido para cada condição até que a concentração do sobrenadante fosse constante indicando o equilíbrio do processo na dada condição.

3.1.3 Desenvolvimento de sistema para cristalização por difusão de vapor com monitoramento por ATR-FTIR

Foi construído um sistema para cristalização adaptado a um acessório ATR, visando o monitoramento *in situ* de pequenos volumes, da ordem de 1,0 ml (Figura 3.1). O acessório ATR utilizado foi um elemento horizontal de germânio suportado em uma placa de alumínio (peça A). O sistema construído consistiu de duas peças em acrílico (peças B e C).

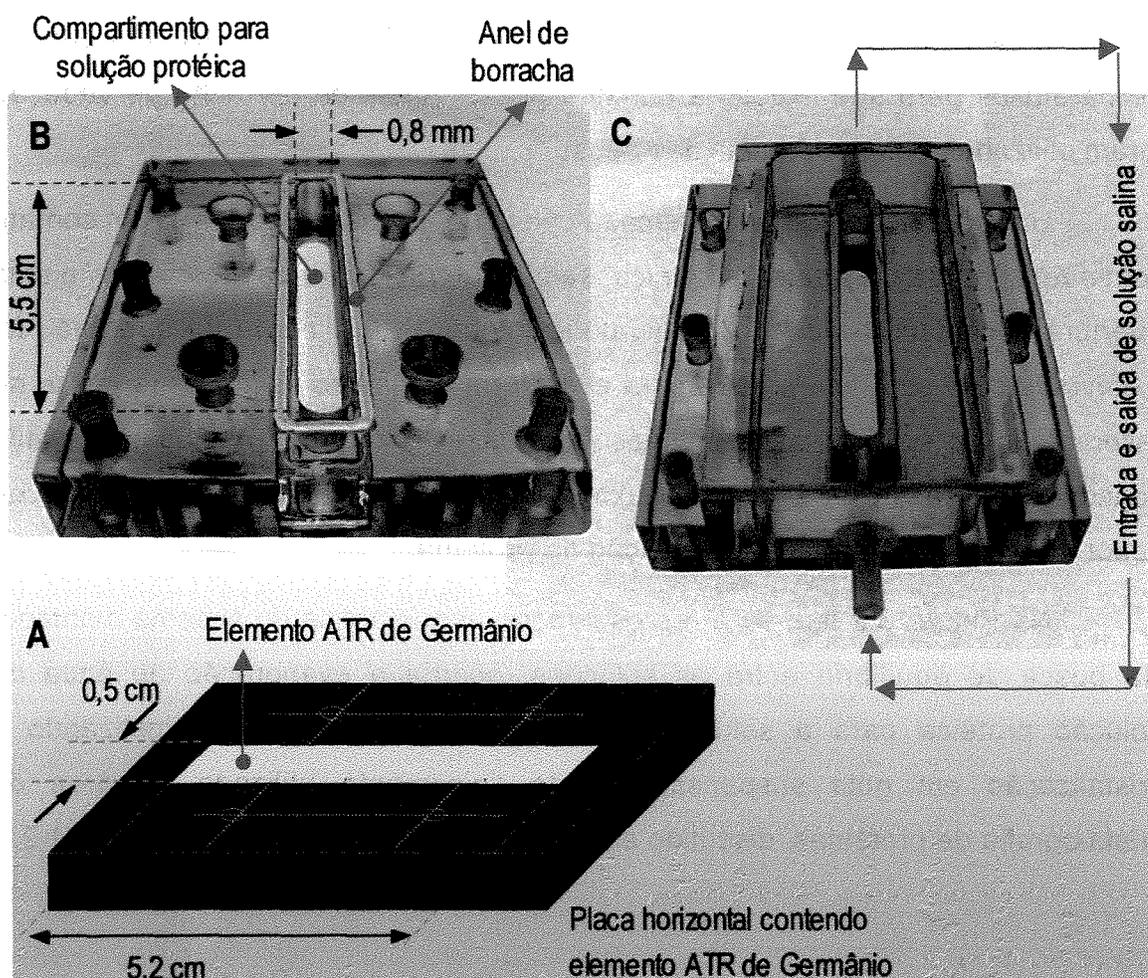


Figura 3.1. Elemento ATR composto por cristal de Ge (peça A) e célula de cristalização composto pelo compartimento para solução de proteína (peça B) e célula de fluxo de solução salina (peça C).

A peça B, uma placa horizontal com uma cavidade central vazada, era anexada ao acessório ATR através de quatro parafusos, criando-se assim um pequeno reservatório sobre o cristal de Ge. Desse modo, uma solução no interior desse reservatório poderia ser monitorada através da radiação proveniente do cristal de ATR quando o sistema era adaptado ao espectrofotômetro.

Uma vez que a solução de proteína a ser cristalizada era acomodada no reservatório sobre o elemento ATR, adaptava-se então a parte C que era uma célula de fluxo composta de canais de entrada e saída por onde era possível circular uma solução salina à uma vazão específica. A célula de fluxo era provida de parafusos para sua fixação à primeira peça. Anéis de borracha de vedação foram utilizados entre cada uma das peças.

Uma vez adaptada ao sistema, a célula de fluxo se encontrava em contato com o reservatório de solução protéica, sendo que no centro da mesma havia uma abertura conectando-a com o reservatório inferior. A borda da abertura foi delimitada com uma fina parede para evitar que a solução salina derramasse no reservatório de solução protéica. Assim, ao fazer circular uma solução com alta concentração salina na célula de fluxo, criava-se uma diferença de pressão de vapor entre a solução salina e a solução de proteína.

Na Figura 3.2 tem-se a representação esquemática do sistema montado. Na busca de equilíbrio entre as soluções, ocorria a evaporação de água da solução protéica para a solução salina através da abertura, mimetizando a cristalização em gota suspensa, método tipicamente utilizado na área de cristalografia de proteínas, discutido em detalhe no próximo capítulo - item 4.1.2.

3.1.4 Obtenção e calibração dos espectros a partir da célula de Ge

Os espectros ATR-FTIR de lisozima foram obtidos através de 72 varreduras e resolução de 8 cm^{-1} . No início do procedimento coletava-se o “background” que consistia do espectro a partir do elemento ATR, o qual era subtraído automaticamente dos espectros das soluções de interesse.

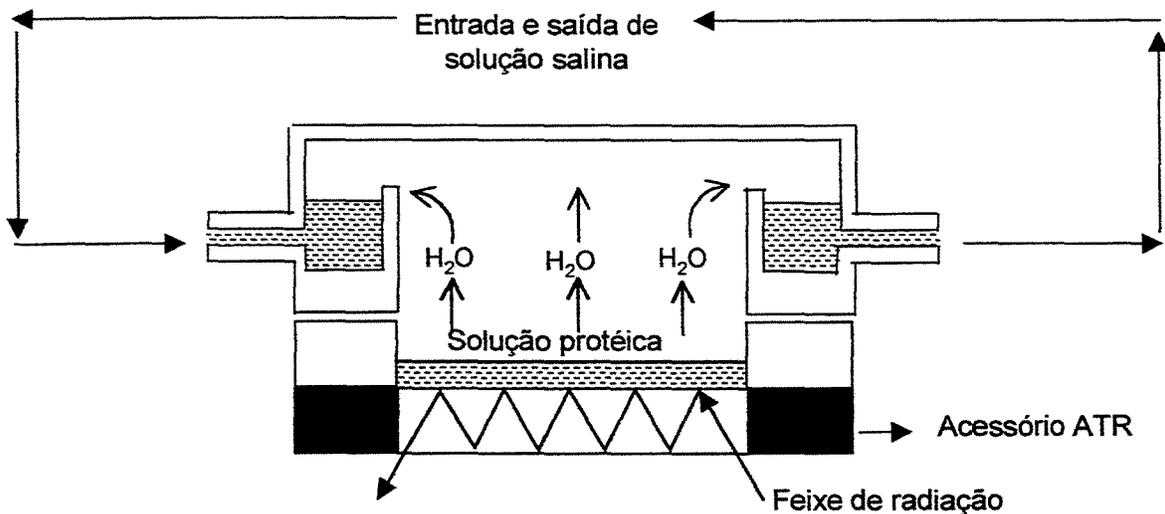


Figura 3.2. Desenho esquemático do modo de operação da célula ATR de cristalização por difusão de vapor.

Para a construção do modelo de calibração, preparou-se soluções padrão com concentrações 10 a 270 mg/ml de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5. Volumes de 1,0 ml de cada solução padrão eram depositados no reservatório sobre o elemento de Ge e com o sistema adaptado ao espectrofotômetro, eram obtidos os espectros das soluções. As soluções eram depositadas e removidas com o uso de uma pipeta automática. Este procedimento foi realizado à temperatura ambiente (cerca de 24°C).

Para obtenção dos espectros a partir dos padrões, não foi necessário acoplar a célula de fluxo para solução salina, e assim, utilizou-se apenas o reservatório sobre o elemento ATR (peças A e B). Para evitar evaporação a partir da solução durante coleta dos espectros, o reservatório era coberto com uma lamínula de vidro que era selada sobre o mesmo através de uma película de graxa de silicone (Figura 3.3). Coletados os espectros das soluções padrão, estes foram então calibrados através do modelo PLS utilizando o software Quant-IR da Applied Systems, EUA.

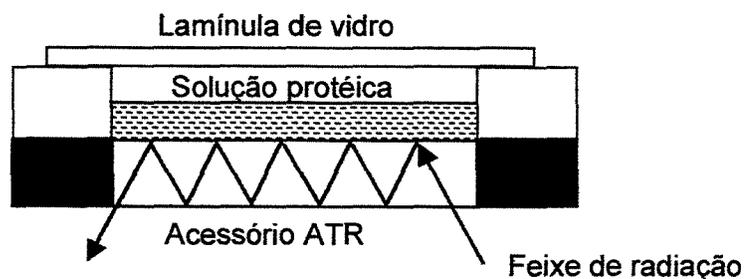


Figura 3.3. Representação esquemática do sistema de coleta de espectros ATR-FTIR de soluções padrão a partir do acessório ATR horizontal.

3.1.5 Obtenção e calibração dos espectros a partir da sonda de imersão Dipper 210

O procedimento inicial para a utilização desta sonda foi sua adaptação ao espectrofotômetro FTIR através da construção de uma plataforma visando alinhamento dos componentes ópticos da sonda em relação ao feixe de luz projetado pelo equipamento. Essa plataforma consistiu de uma placa metálica fixada à base do instrumento, sobre a qual era imobilizada a sonda. O sistema de fixação foi elaborado de forma a permitir um prévio ajuste do alinhamento do acessório em relação ao feixe de luz proveniente do instrumento. Na Figura 3.4 é apresentada uma foto da sonda assim como um desenho esquemático da sonda acoplada ao espectrofotômetro.

Para obtenção dos espectros, a sonda era instalada no instrumento e sua extremidade era imersa na solução a ser analisada. Os componentes ópticos na base da sonda captavam o feixe de radiação proveniente do equipamento e o conduzia até a extremidade da sonda através de uma fina tubulação metálica referida como extensor (Figura 3.5). O feixe de luz atingia então o elemento cônico ATR, sendo a seguir refletido na interface entre sonda e solução e conduzido de volta ao instrumento através de uma segunda tubulação, ou extensor. Ao refletir na interface entre sonda e solução, parte da luz era liberada em forma de onda evanescente que quando absorvida pela solução gerava o espectro.

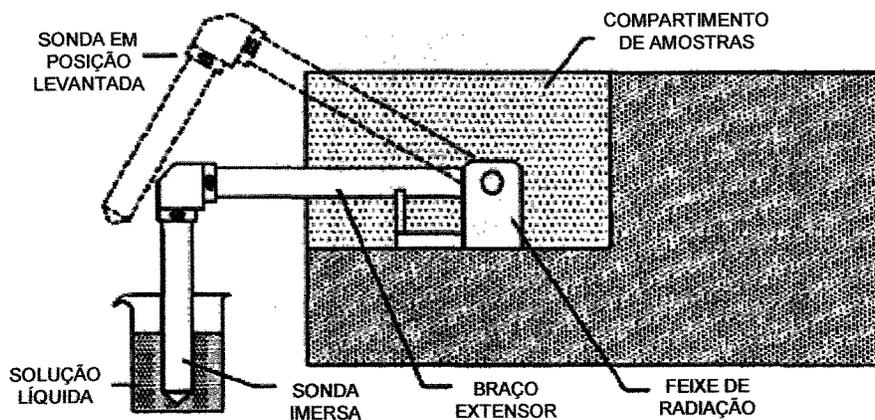
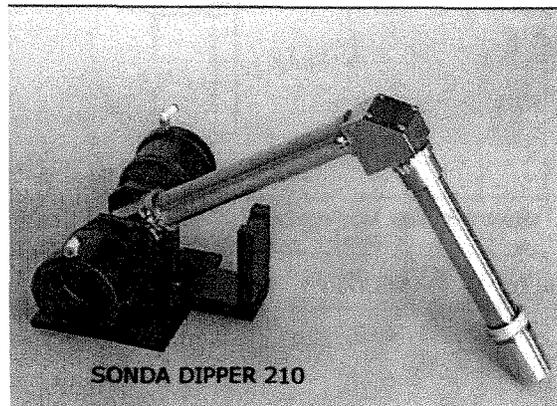


Figura 3.4. Foto da sonda Dipper 210 e representação esquemática da sonda instalada em um espectrofotômetro (Manual Axion Analytical, EUA).

Os espectros foram obtidos através de 72 varreduras e com resolução de 8 cm^{-1} . No início do procedimento, coletava-se o “background” que consistia do espectro a partir do elemento ATR, o qual era subtraído automaticamente dos espectros das soluções de interesse. Para a construção do modelo de calibração, preparou-se soluções padrão com concentrações de 0 a 100 mg/ml de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5. De acordo com as dimensões da sonda um mínimo de 20 ml de solução eram necessários para que o elemento ATR cônico permanecesse inteiramente imerso. Os espectros dos padrões foram então calibrados através do modelo PLS utilizando o software Quant-IR da Applied Systems, EUA.

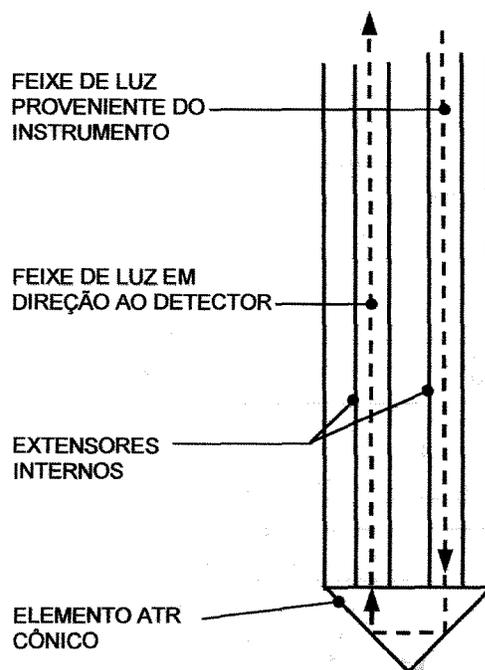


Figura 3.5. Corte transversal da sonda Dipper 210 - Mecanismo de reflexão do feixe de luz infravermelho. Diâmetro externo da sonda: 25 mm.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Determinação de solubilidade de lisozima

Volumes de 1,5 ml de solução supersaturada de lisozima contendo de 20 a 150 mg/ml de proteína e de 0,24 a 1,50 M de NaCl foram mantidos em repouso em tubos Eppendorf a 24°C, em banho termostático. Em intervalos de tempo diferentes, os tubos eram retirados do banho, e a concentração de proteína do sobrenadante era avaliada através de absorvância a 280 nm, aplicando o coeficiente de extinção $A_{280\text{nm}}$ de $2,32 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1}$ previamente determinado. Esse procedimento era repetido para cada condição até que o sobrenadante

apresentasse uma concentração constante ao longo do tempo, indicando o equilíbrio do processo na dada condição.

Na Tabela 3.1 são apresentadas as composições iniciais e finais das soluções que resultaram na formação de cristais, assim como os tempos aproximados para se atingir o equilíbrio.

A curva de solubilidade obtida é apresentada na Figura 3.6, em comparação com os dados fornecidos por Howard *et al.*(1988). Os valores de solubilidade aqui obtidos foram próximos dos valores da literatura, especialmente para as soluções com concentração de NaCl acima de 0,5 M.

Tabela 3.1. Solubilidade de lisozima a 24°C.

Concentração de NaCl (M)	Concentração inicial de proteína (mg/ml)	Concentração final de proteína (mg/ml)	Tempo (dias)
0,240	150,0	92	40
0,345	150,0	52	40
0,495	94,4	21	30
0,495	97,0	20	30
0,705	94,0	12	30
0,705	76,0	12	30
1,000	48,0	8,0	6
1,200	38,0	6,7	6
1,200	32,0	6,2	6
1,200	18,0	5,0	-
1,500	20,0	5,5	6

Os cristais obtidos no experimento apresentaram forma cúbica (Figura 3.7) e tamanhos variados, de centenas de micrômetros a pouco mais de 1,0 mm.

Howard *et al.* (1988) mencionaram o tempo de duas semanas para atingir o equilíbrio das soluções, entretanto, para os dados aqui apresentados, os tempos de equilíbrio aproximados foram de 6 dias para algumas condições e de até 40 dias para outras condições. A diferença deve-se provavelmente à variação entre os graus de supersaturação das soluções iniciais, sendo que esta influencia as cinéticas de nucleação e crescimento. Atenta-se ainda para o fato da deficiência da agitação na obtenção dos dados de solubilidade aqui apresentados. A agitação dos tubos de 1,5 ml era proveniente apenas do movimento de vibração da água gerado pela bomba do banho termostático.

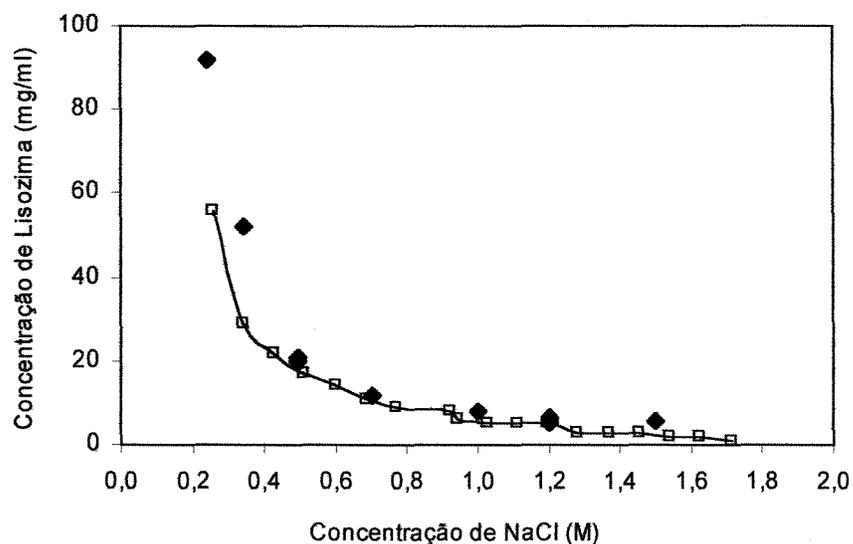


Figura 3.6. Solubilidade de lisozima a 24 °C em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5: (◆) dados experimentais, (□) dados de Howard *et al.* (1988).

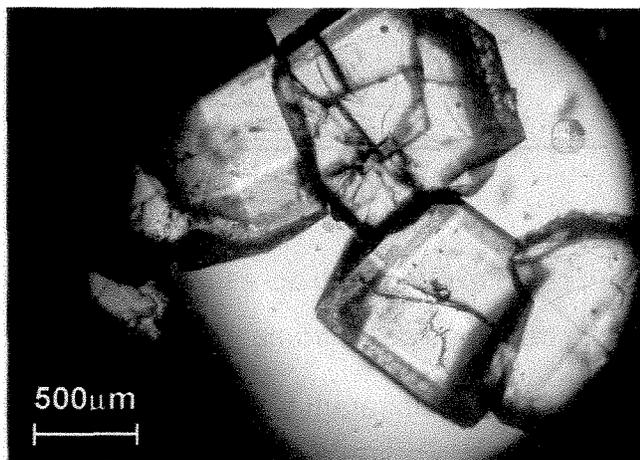


Figura 3.7. Fotomicrografia de cristais de lisozima obtidos a partir de solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 a 24 °C.

Na Figura 3.8 são apresentadas, junto à curva de solubilidade, as condições iniciais das soluções que originaram os valores de solubilidade e as condições iniciais de soluções onde não houve crescimento de cristais dentro do

período de 40 dias. Esse gráfico apresenta, a grosso modo, a faixa da zona metaestável: região situada entre as condições que geraram e as que não geraram cristais, considerando que o período de 40 dias é o suficiente para as soluções terem atingido o equilíbrio. Esses dados serviram de base na determinação das condições do meio a serem explorados durante estudos de monitoramento da cristalização utilizando espectroscopia infravermelho.

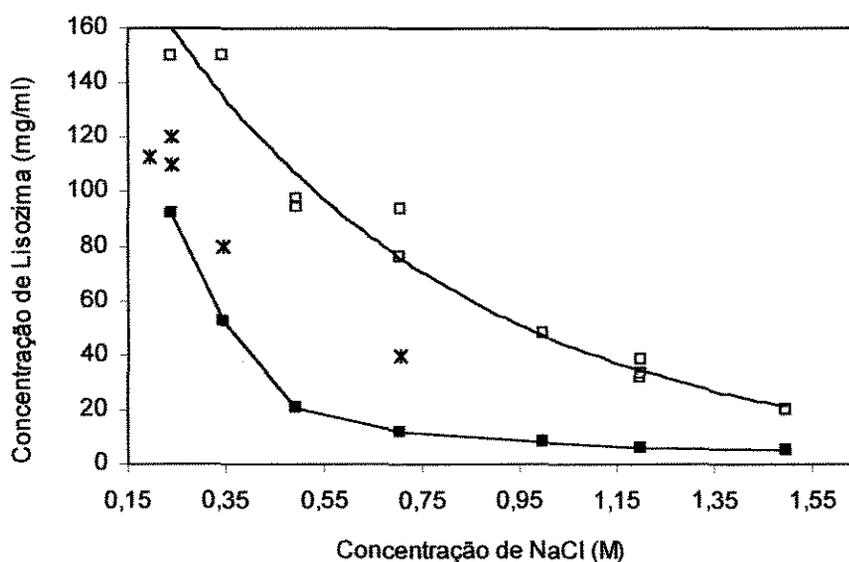


Figura 3.8. Solubilidade de lisozima a 24 °C em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5 na presença de NaCl (■). Condições iniciais de soluções que geraram cristais (□) e condições iniciais de soluções que não geraram cristais (*).

3.2.2 Calibração dos espectros FTIR de lisozima obtidos através do elemento ATR de Ge

Espectros a partir de volumes de 0,5 a 1,0 ml de soluções de lisozima foram coletados através do sistema apresentado na Figura 3.3. Para a construção do modelo de calibração, coletou-se os espectros de 14 padrões contendo de 10 a 270 mg/ml de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5. Na Figura 3.9 são apresentados os espectros dos padrões.

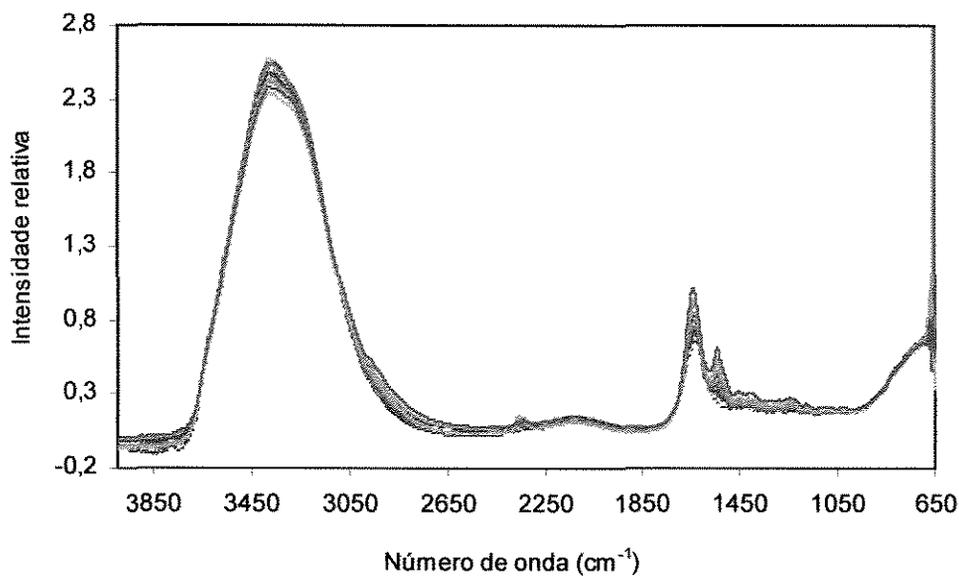


Figura 3.9. Espectros de solução de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5 obtidos por FTIR utilizando elemento ATR de Ge. Concentrações de lisozima de 10 a 270 mg/ml, total de 14 espectros.

Os espectros apresentaram bandas a 3500 cm^{-1} (característico das vibrações OH da água), a 1550 cm^{-1} (característico das vibrações de grupos amida de proteínas) e a 1650 cm^{-1} (característico de vibrações da água assim como da proteína). Os espectros foram calibrados através do modelo PLS (“Partial Least Square”) utilizando o software Quant IR da Applied Systems, EUA. No desenvolvimento do modelo, selecionou-se as regiões do espectro de 1486 a 1567 cm^{-1} , contendo uma banda de absorção pela proteína e de 1587 a 1728 cm^{-1} , contendo uma banda cuja intensidade é a soma da absorção pela proteína e pela água. Na Figura 3.10 é apresentada em escala ampliada a região dos espectros utilizada no modelo de calibração. As intensidades das bandas aumentaram proporcionalmente com o aumento da concentração das soluções. Na calibração PLS é necessário definir o número de fatores, isto é, o número de componentes principais. No modelo de calibração é aconselhável que se utilize um número mínimo de fatores, número este, sugerido pelo programa computacional através dos gráficos de PRESS (Figura 3.11).

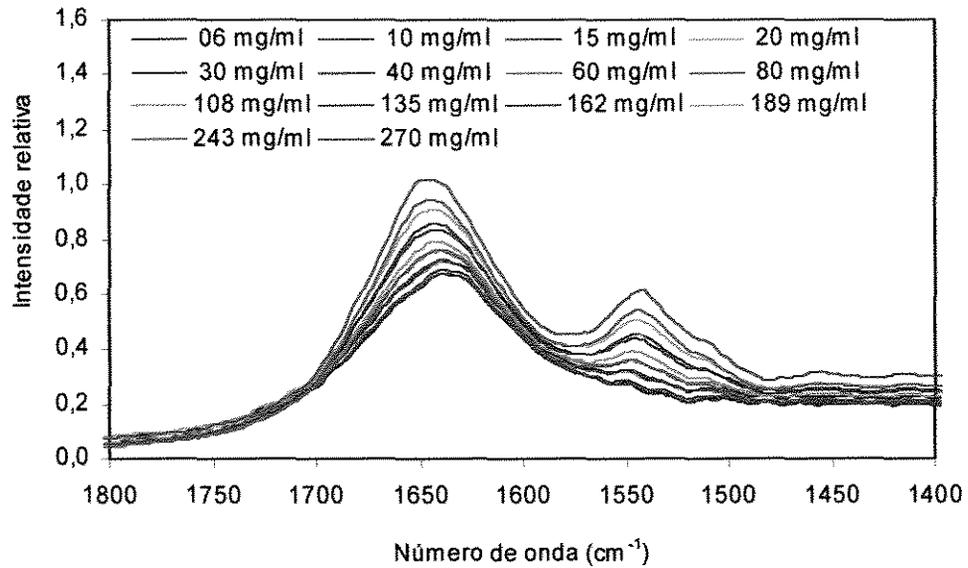


Figura 3.10. Bandas de proteína e água apresentadas pelos espectros de solução de lisozima de 10 a 270 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5 obtidos por FTIR utilizando elemento ATR de Ge.

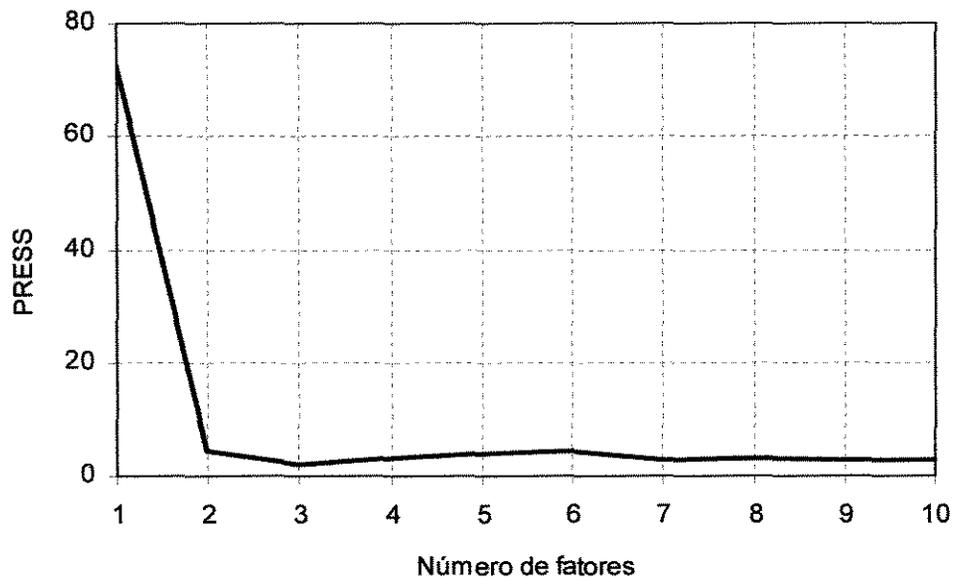


Figura 3.11. Gráfico de PRESS obtido no modelo de calibração PLS para a predição de lisozima em soluções tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 através de ATR-FTIR utilizando elemento de Ge.

O gráfico de PRESS é discutido anteriormente na seção de revisão da literatura. Lembrando que os fatores, ou componentes principais representam as variáveis comprimentos de onda, o gráfico é utilizado para indiretamente selecionar dentre estas variáveis, aquelas que tem melhor resposta em relação ao aumento da concentração. Neste caso, o gráfico indicou que 2 (dois) fatores é o número adequado para o modelo.

O modelo de calibração desenvolvido apresentou erro padrão médio de 3,5 mg/ml de lisozima determinado pelo método de validação cruzada "leave one out cross validation".

Neste método de validação o programa computacional remove o espectro de um padrão, desenvolve um modelo de calibração temporário considerando os demais espectros e utiliza tal modelo para predizer as concentrações dos componentes do padrão cujo espectro foi removido do modelo. O processo é então repetido para os demais espectros do conjunto de padrões. Ao final do processo, o programa fornece os erros absolutos ocorridos durante a predição de cada amostra removida.

A avaliação do modelo é então descrita pelo erro padrão médio, que consiste da média dos erros ocorridos para cada amostra. O programa fornece também o gráfico da validação (Figura 3.12) que auxilia principalmente na identificação de "outliers", isto é, de valores com desvio significativo em relação ao conjunto global de dados. Esses valores devem ser excluídos do conjunto de dados para um melhor desempenho do modelo de calibração. Neste caso não foi identificado nenhum "outlier".

Desenvolvido o modelo de calibração avaliou-se a consistência dos dados gerados pelo mesmo ao longo do tempo a partir de uma mesma solução. Essa avaliação foi realizada atentando-se para o fato de que instabilidades no instrumento, assim como a umidade do ar ou ainda a temperatura ambiente, podem gerar alterações nos espectros coletados ao longo do tempo e, conseqüentemente, influenciar a predição.

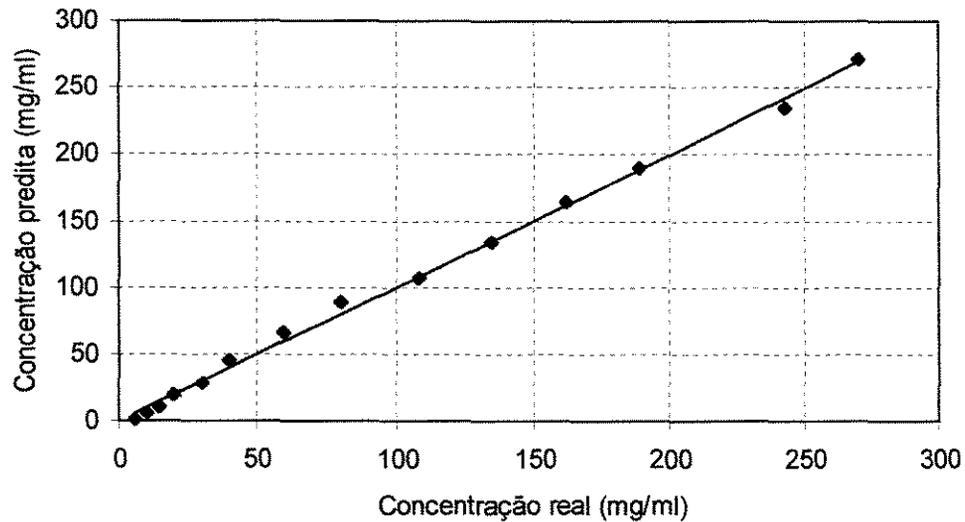


Figura 3.12. Validação cruzada “leave one out” na calibração de espectros ATR-FTIR de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 utilizando elemento de Ge.

Coletou-se, portanto, espectros em intervalos de tempo determinados a partir de uma mesma solução e, a seguir, aplicou-se o modelo de calibração sobre estes espectros, obtendo-se assim os valores de concentração preditos (Figura 3.13). A variância dos valores preditos foi de $13,7 \text{ mg}^2/\text{ml}^2$ sendo que os valores preditos eram maiores durante o dia, especialmente à tarde, e eram menores durante a noite e manhã. Registrando-se a temperatura ambiente no decorrer do dia, a qual era maior durante a tarde, e mais baixa durante manhã e noite, concluiu-se que a instabilidade da temperatura era a razão da variação dos valores preditos.

Visto a influência da temperatura sobre o monitoramento, foram tomadas medidas para atenuar a variação térmica no ambiente, e a seguir, coletou-se espectros a partir de novas amostras ao longo do tempo. O experimento foi repetido para amostras de diferentes concentrações. Os valores preditos passaram a ser mais estáveis, com variâncias de 2,5, 0,19 e $0,31 \text{ mg}^2/\text{ml}^2$ para as concentrações de 245, 150 e 30 mg/ml, respectivamente. (Figura 3.14).

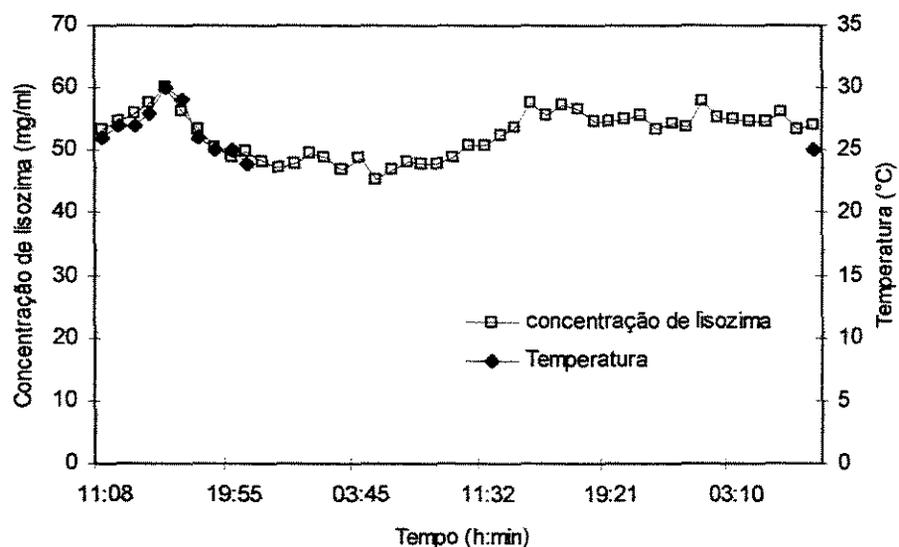


Figura 3.13. Valores de concentração de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 preditos ao longo do tempo através da aplicação de um modelo de calibração PLS de espectros ATR-FTIR. Valor de concentração esperado: 54 mg/ml. Variância dos valores preditos: $13,7 \text{ mg}^2/\text{ml}^2$.

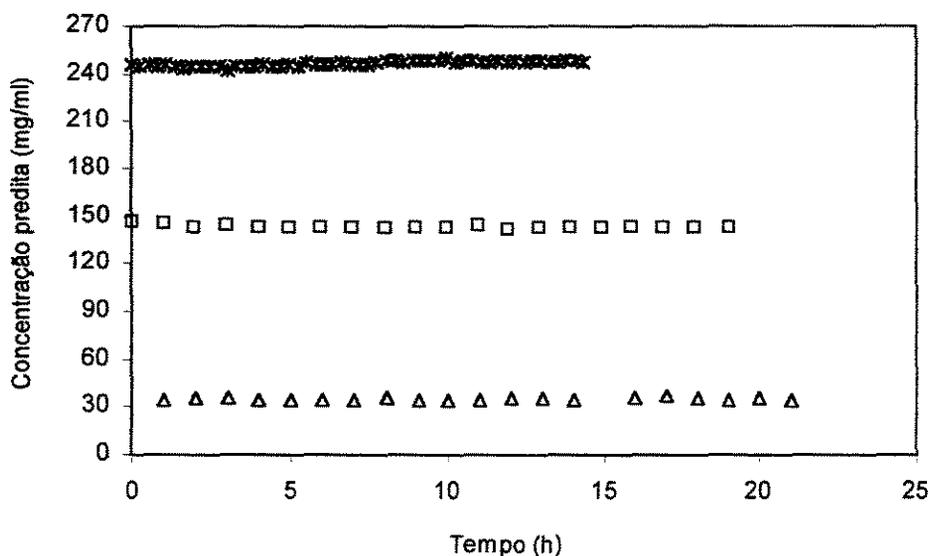


Figura 3.14. Valores de concentração de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 preditos ao longo do tempo através da aplicação de um modelo de calibração PLS de espectros ATR-FTIR. Valores esperados de concentração: 245, 150 e 30 mg/ml. Variâncias dos valores preditos: 2,5, 0,19 e $0,31 \text{ mg}^2/\text{ml}^2$.

Na ocasião em que os novos experimentos foram realizados a temperatura ambiente era de aproximadamente 24 com variação de ± 1 °C. Este fato indicou que o método de calibração é preciso, havendo no entanto a necessidade de controle da temperatura. Em processos politérmicos onde é prevista a necessidade de predição em diferentes temperaturas, existe a possibilidade de construção de modelos de calibração incluindo a temperatura como uma variável do sistema. Esse procedimento, entretanto envolve tempo e consumo adicional de amostras. Para a predição de concentrações na célula de cristalização desenvolvida, sem sistema de troca de calor e controle de temperatura, não se justificaria o desenvolvimento de tal modelo.

3.2.3 Concentração de soluções de lisozima através de difusão de vapor aplicando a célula ATR de cristalização

Uma vez demonstrada a consistência dos dados preditos pelo modelo de calibração, aplicou-se este modelo para o monitoramento do processo de supersaturação de soluções de lisozima através de evaporação induzida por difusão de vapor, realizada com a aplicação da célula ATR de cristalização (Figuras 3.1 e 3.2).

Um volume de 1,0 ml de solução protéica foi acomodado no reservatório sobre o elemento ATR em Ge, o qual foi a seguir acoplado à célula de circulação de solução salina, e devidamente posicionado no compartimento de amostras no espectrofotômetro. A solução protéica possuía 0,4 M de NaCl, ao passo que a solução circulante continha 3,0 M de NaCl e uma vazão de 25,0 ml/min. Ambas as soluções foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5.

A diferença de força iônica entre a solução protéica e a solução salina circulante criava uma diferença de pressão de vapor entre os dois reservatórios, provocando evaporação e concentração da solução protéica, mimetizando a cristalização em gota suspensa.

Espectros da solução protéica eram coletados ao longo do tempo e, assim, a concentração protéica era monitorada *in situ* e em tempo real. Através deste sistema, soluções contendo 33 e 72 mg/ml de lisozima foram concentradas a uma taxa linear (Figura 3.15), sendo esta taxa dependente da diferença de força iônica entre solução protéica e solução salina.

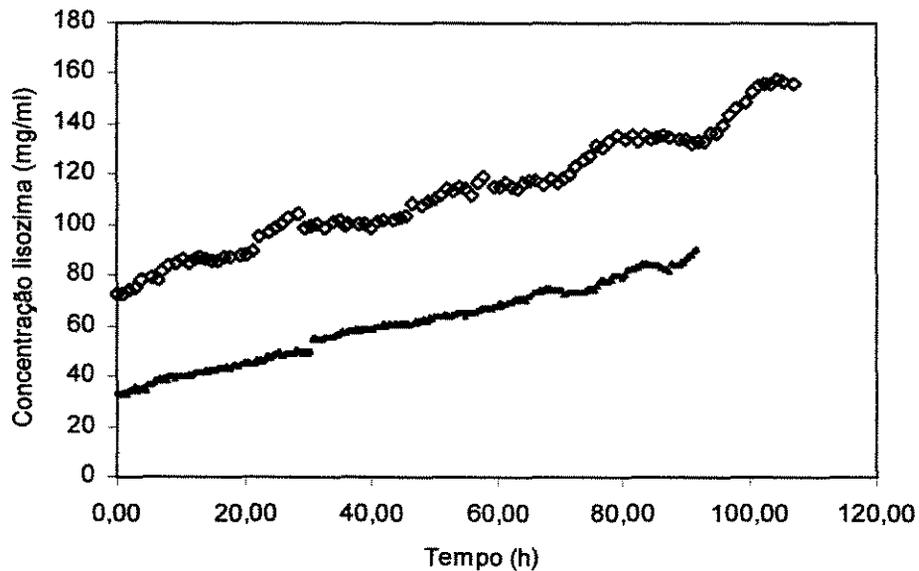


Figura 3.15. Monitoramento da concentração de soluções de lisozima no interior da célula de cristalização contendo elemento de Ge durante etapa de evaporação por difusão de vapor. Composição inicial das soluções protéicas: 33 e 72 mg/ml de lisozima e 0,4 M de NaCl em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. Solução circulante: 3,0 M de NaCl em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 com vazão de 25 ml/min.

A vantagem deste método é a simplicidade de controle da taxa de evaporação que consistia em diminuir a concentração de sal na solução circulante para diminuir a velocidade de evaporação da solução de lisozima e, ao contrário, aumentar a concentração de sal na solução circulante para evaporar e saturar a solução protéica mais rapidamente.

O sucesso do modelo de calibração, assim como o bom desempenho demonstrado pelo sistema de evaporação gerou boas expectativas para a

continuidade dos estudos, uma vez que estavam garantidas as possibilidades de monitoramento *in situ* da solução através de ATR-FTIR e de controle da supersaturação através da evaporação induzida. Esse controle consistiria em suprir a necessidade de supersaturação da proteína durante o processo de cristalização, evitando, entretanto, uma supersaturação demasiada e nucleação excessiva.

Dando então continuidade dos estudos, avaliou-se a seguir o desempenho do método de monitoramento das soluções durante o crescimento de cristais de lisozima.

3.2.4 Monitoramento *in situ* de soluções supersaturadas na presença de cristais através de FTIR utilizando elemento ATR de Ge

Como demonstrado por Dunuwila e Berglund (1997), a técnica ATR-FTIR pode ser aplicada com sucesso no monitoramento da fase líquida em processos de cristalização sem interferência dos sólidos. A adequação do método deve-se principalmente ao fato de a profundidade de penetração da radiação na amostra ser muito pequena, da ordem de alguns micrômetros, dificilmente atingindo as partículas presentes na solução. Mesmo que estas estejam muito próximas ao elemento ATR, existe sempre uma película de líquido separado-as da superfície do elemento.

No presente estudo, avaliou-se a possibilidade de monitoramento *in situ* de solução supersaturada na presença de cristais de lisozima através de ATR-FTIR utilizando a célula de cristalização desenvolvida a partir de um acessório ATR de Ge. Um volume de 1,0 ml de solução supersaturada de lisozima contendo 86 mg/ml de proteína e 0,7 M de NaCl foi adicionada ao reservatório do sistema de cristalização sobre o elemento ATR. De acordo com experimentos realizados anteriormente, era conhecido que, nestas condições a solução poderia gerar cristais dentro do período de algumas horas. O reservatório foi fechado com uma lamínula de vidro selada sobre a borda do mesmo através de uma fina camada de graxa de silicone. Espectros a partir da solução foram coletados ao longo do

tempo, visando obter o perfil de concentrações da mesma durante a formação dos cristais.

De acordo com o perfil de concentrações esperado, deveríamos observar um decréscimo da mesma ao longo do tempo enquanto estivesse ocorrendo a formação e crescimento dos cristais. No entanto, o perfil obtido (Figura 3.16) foi oposto ao esperado. A concentração predita aumentou ao longo do tempo atingindo um patamar após determinado período. Esse aumento de concentração é, entretanto, irreal, uma vez que não houve no processo acréscimo de soluto ou remoção de solvente. Uma possível causa desta superestimativa poderia ser a adsorção do soluto sobre o Ge ao longo do tempo gerando uma falsa idéia de um aumento local da concentração. Essa hipótese, entretanto, foi descartada visto que, em experimentos anteriores, utilizando o mesmo modelo de calibração, as concentrações preditas eram constantes ao longo do tempo por períodos de até 20 horas (Figura 3.14).

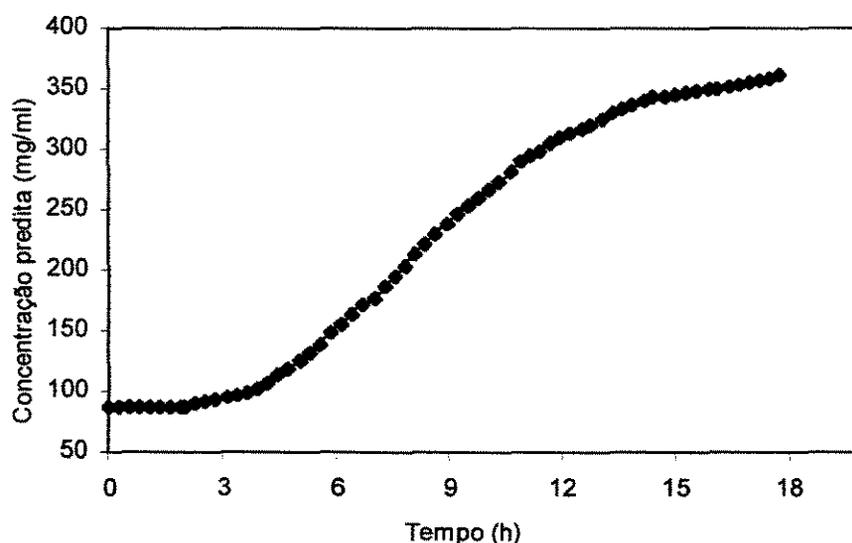


Figura 3.16. Monitoramento da concentração de lisozima no interior da célula de cristalização contendo o elemento de Ge durante etapa de cristalização. Concentração inicial da solução: 86 mg/ml de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM , pH 4,5 e NaCl 0,7 M.

Descartada a possibilidade de adsorção do soluto, restava a hipótese de ter havido interação dos cristais de proteína e o elemento ATR de Ge, ultrapassando assim a camada de líquido entre os mesmos. Apesar da molécula livre em solução não apresentar interação com o Ge, seu rearranjo estrutural no cristal poderia ter proporcionado uma distribuição de cargas favorável à sua interação com o Ge. Ao final do processo observou-se que os cristais de lisozima, que tinham dimensões de cerca de 0,5 mm, não haviam simplesmente decantados sobre o elemento ATR mas de certa forma aderidos ao mesmo. Uma vez existindo essa interação entre cristais de lisozima e Ge seria esperado que ocorresse uma superestimativa da concentração pois os picos do espectro do sólido, com maior número de moléculas por unidade de volume expostas à radiação, apresenta maiores intensidades que os picos do espectro a partir de moléculas solubilizadas no líquido.

Comparando-se os espectros da solução sem cristais e da solução contendo cristais (espectros esses, referentes ao primeiro e último pontos da Figura 3.16, respectivamente) observa-se uma diferença entre os mesmos (Figura 3.17). O espectro a partir da solução com cristais apresenta maiores intensidades dos picos a 1550 e 1650 cm^{-1} em relação à solução sem cristais, assim como a presença de pequenas bandas, localizadas em torno de 2950 cm^{-1} e abaixo de 1500 cm^{-1} , inexistentes no espectro de somente solução.

A presença dessas bandas torna o espectro obtido a partir da solução na presença de cristais semelhante ao espectro obtido a partir de filme seco de lisozima aderido ao Ge. Este último foi obtido depositando uma fina camada de solução concentrada de lisozima sobre o Ge e deixando o solvente evaporar para então coletar o espectro. Esse procedimento foi uma alternativa para se obter o espectro do sólido, sendo que através de simples deposição dos cristais de lisozima sobre o elemento de Ge não se obteve o contato necessário para se obter um espectro ATR.

A semelhança entre o espectro do filme seco de lisozima e o espectro da solução contendo cristais corroboram com a hipótese de que houve interação entre os cristais de proteína e o elemento ATR de Ge.

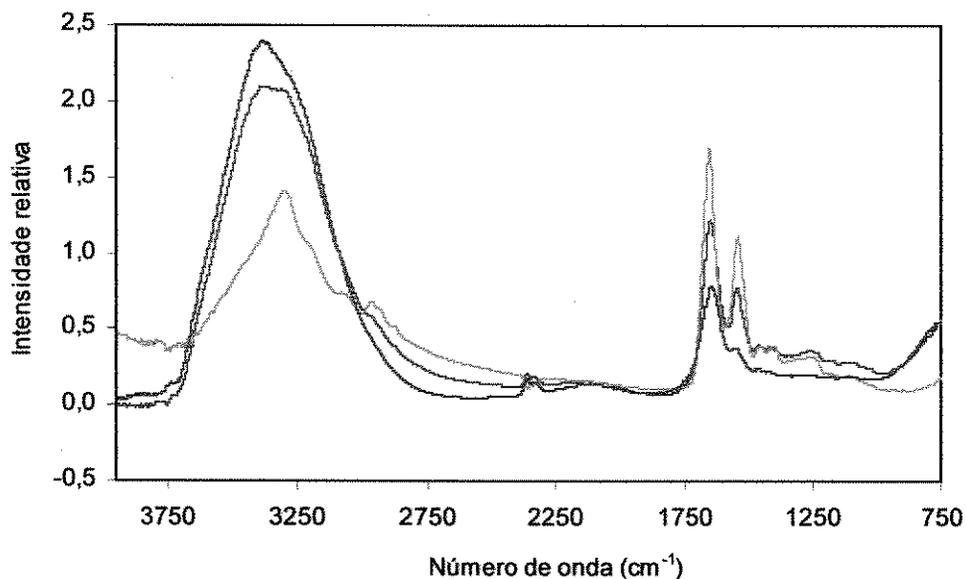


Figura 3.17. Espectros ATR-FTIR de lisozima a partir de (_) solução límpida de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5; (- -) solução contendo cristais em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 e (. .) película protéica seca aderida sobre o elemento ATR de Ge, obtida através de secagem do solvente.

Assim, ao contrário do esperado, o monitoramento da solução de lisozima foi influenciado pela presença dos cristais devido à interação destes e o elemento ATR. Entretanto, essa interação não contradiz as demonstrações feitas por Dunuwila e Berglund (1997). O que deve-se considerar é que as partículas não deveriam interferir no monitoramento da fase líquida, considerando que o feixe de luz raramente consegue atingir as partículas. No presente estudo, a interferência era inevitável, uma vez que, com a adsorção das partículas sobre o elemento de reflexão interna, não existia mais o filme de líquido intermediando as partículas e o elemento ATR. Uma das razões das constatações aqui apresentadas é que o presente estudo envolve moléculas de proteína conhecidamente aderentes em diferentes tipos de material.

Além da hipótese de adsorção dos cristais, uma outra suposição era de que o simples fato de os cristais terem decantado sobre o cristal ATR tenha favorecido a interação com a radiação. Ao contrário de Dunuwila e Berglund

(1997) que utilizaram uma sonda ATR de imersão em um cristalizador agitado com os cristais em suspensão, no presente trabalho, além de não haver agitação, a solução se encontrava por cima do elemento ATR permitindo que os cristais decantassem sobre o mesmo. A princípio acreditava-se que apesar dos cristais terem decantado sobre o elemento ATR, a onda evanescente não atingiria os mesmos uma vez que sua profundidade de penetração no elemento de Ge variava de 0,2 a 1,0 μm .

Para avaliar o efeito da decantação de cristais sobre o elemento ATR sobre as medidas dos espectros, realizou-se um experimento com decantação de cristais de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que, supostamente, não adsorveriam no elemento de Ge. Coletou-se inicialmente espectros de soluções com concentrações conhecidas do sal (Figura 3.18), e construiu-se um modelo de calibração a partir destes espectros. O modelo foi construído a partir de soluções com 0,2 a 4,0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os espectros foram coletados através de 72 varreduras e com resolução de 8 cm^{-1} . O número de fatores utilizado foi de 2 e as regiões do espectro consideradas na calibração foram de 1199,6 a $1000,9\text{ cm}^{-1}$ e 1510,1 a $1359,6\text{ cm}^{-1}$. O modelo desenvolvido apresentou erro padrão médio de 0,0157 M.

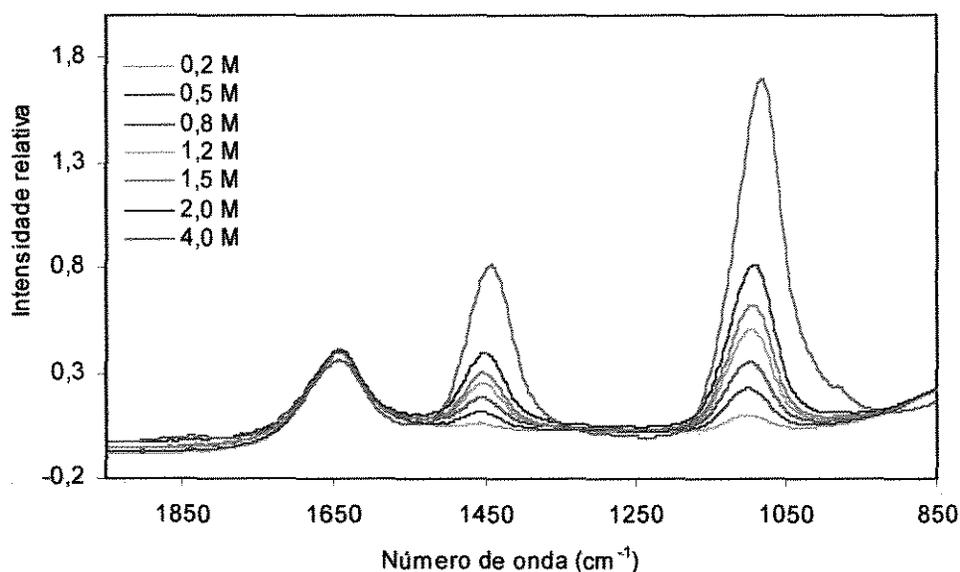


Figura 3.18. Espectros ATR-FTIR de soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ depositadas sobre elemento de Ge.

Desenvolvido um modelo de predição de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fez-se a verificação do efeito dos cristais na predição da concentração da solução.

Inicialmente coletou-se espectros ao longo do tempo a partir de solução saturada deste sal, na ausência de cristais. A seguir adicionou-se cristais do sal com cerca de 1 mm de dimensão à esta solução e coletou-se novos espectros. A quantidade de cristais de sal adicionada foi visualmente semelhante à quantidade de cristais presentes no experimento com lisozima.

A partir dos espectros coletados e do modelo de calibração previamente desenvolvido, obteve-se o perfil de concentrações da solução salina antes e após a adição dos cristais (Figura 3.19).

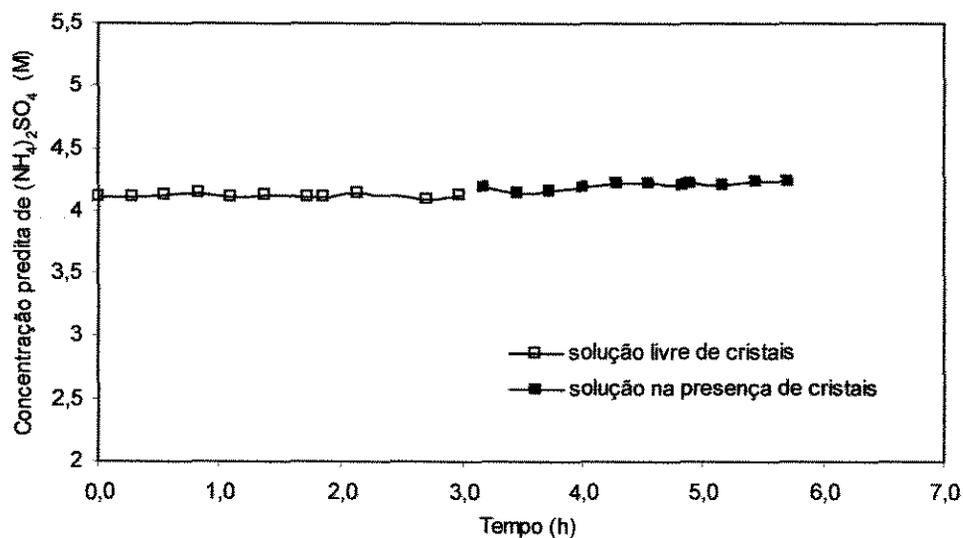


Figura 3.19. Verificação de efeito da presença de cristais na predição de concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na fase líquida através de ATR-FTIR utilizando célula de Ge.

A concentração predita da solução não foi afetada pela presença de cristais. Salienta-se que, caso a decantação dos cristais fosse o suficiente para que a onda evanescente atingisse os mesmos, essa possibilidade seria mais acentuada para o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do que para a lisozima, uma vez que os comprimentos de onda das bandas de absorção deste sal são maiores que os das bandas de proteína e, dessa forma, de acordo com a Equação 2.18, a profundidade de penetração em sua solução é maior do que na solução de proteína.

Por outro lado, observa-se que os cristais de proteína apresentaram dimensões menores que os cristais do sal; assim permitia-se que esses cristais de proteína tivessem um melhor contato com a superfície do elemento de Ge.

Na Figura 3.20 são apresentados espectros obtidos antes e após a adição dos cristais, nos quais não se observa variação significativa das intensidades dos espectros. O espectro da solução na presença de cristais refere-se ao último ponto do perfil de concentrações da Figura 3.19, assumindo que, nesse estágio, a decantação dos cristais já estivesse estabilizada.

Esta constatação corrobora com a hipótese de interação dos cristais de lisozima e o cristal de Ge, descartando-se também a possibilidade de monitoramento da cristalização desta proteína nas dadas condições. No entanto, não se descarta a possibilidade de utilização do sistema para outras moléculas, principalmente outras proteínas, pois, a interação ocorrida entre os cristais de lisozima e o elemento ATR de Ge pode ser decorrente de características específicas dos cristais de lisozima, assim como das condições do meio, incluindo pH, força iônica e temperatura. Como exemplo, podemos citar a adsorção de lisozima na sonda ATR de diamante, observado por Schwartz e Berglund (1999a), impossibilitando assim o seu monitoramento através dessa sonda. Entretanto, durante realização de experimentos exploratórios no presente estudo, utilizando aprotinina em cristalizações em gota suspensa, constatou-se que era possível o seu monitoramento através dessa sonda, sem interação da mesma com o elemento ATR.

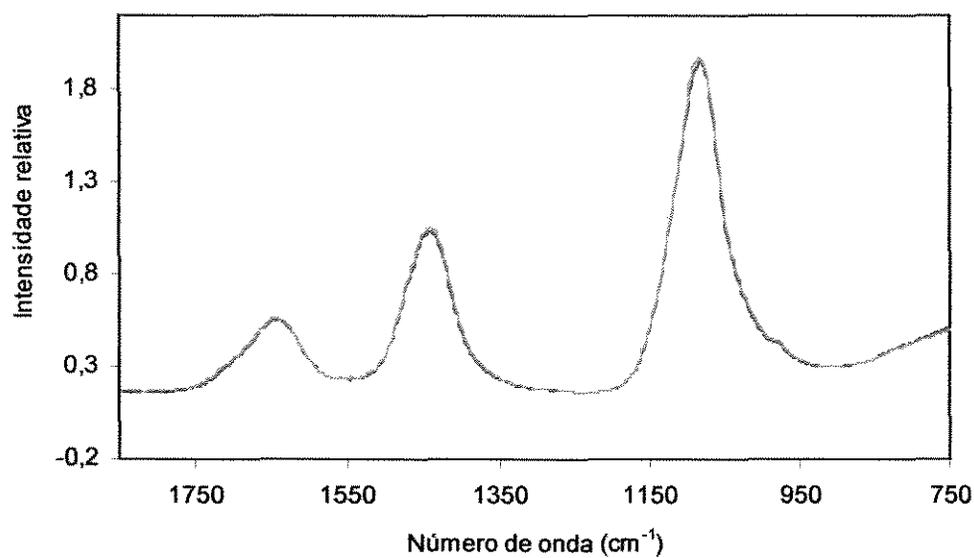


Figura 3.20. Espectros ATR-FTIR de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na (_) ausência de cristais e na (_) presença de cristais obtidos através de célula de Ge.

Os estudos de monitoramento utilizando esse sistema poderiam ser prosseguidos testando-se outras proteínas, assim como tentando variar as condições das soluções de lisozima buscando evitar a interação dos cristais. A variação dessas condições, poderia envolver mudança de pH, força iônica, ou tampão. Entretanto, isso seria uma tarefa de certo modo complexa, visto que a variação das condições podem interferir na cristalização da proteína.

Os estudos de monitoramento através desse sistema foram assim interrompidos, tendo-se optado por dar continuidade ao trabalho avaliando uma segunda metodologia com aplicação da sonda de imersão Dipper 210. Uma das expectativas na utilização desta sonda era de que o elemento ATR desta sonda, composto de outro material, o ZnSe, apresentasse comportamento distinto do ocorrido com o elemento de Ge. Além disso, uma vantagem desta sonda era o fato da mesma ser imersa na solução, com a superfície do elemento ATR voltada para baixo, não ocorrendo assim decantação dos cristais sobre a mesma.

3.2.5 Calibração dos espectros de lisozima obtidos através da sonda Dipper 210

Para a adaptação da sonda Dipper 210 ao espectrofotômetro Protégé 460 foi desenvolvido um sistema de fixação que foi elaborado de forma a permitir o deslizamento da sonda sobre o eixo perpendicular ao feixe de radiação permitindo um ajuste fino do seu alinhamento em relação à esse feixe de luz. O ajuste do alinhamento era realizado a cada vez em que a sonda era reinstalada ao equipamento.

Para obtenção dos espectros, a sonda era instalada no instrumento e sua extremidade era imersa na solução a ser analisada. Os espectros a partir desta sonda foram obtidos através de 72 varreduras e resolução de 8 cm^{-1} . No início do procedimento, coletava-se o "background" que consistia do sinal produzido a partir do elemento ATR a ser subtraído automaticamente dos espectros das soluções de interesse.

Para a construção do modelo de calibração para predição da concentração de lisozima a partir desta sonda, coletou-se espectros de soluções padrões dessa proteína com concentrações variando de 0 a 100 mg/ml. Essas soluções foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 e durante a coleta dos espectros elas eram acomodadas em reservatório encamisado permitindo o controle da temperatura, que foi mantida a 24°C através de circulação de água termoestabilizada.

Os espectros das soluções utilizadas na calibração são apresentados na Figura 3.21, onde se observa uma banda com intensidade máxima em cerca de 3400 cm^{-1} referente ao espectro da água, uma banda em cerca de 2350 cm^{-1} referente ao dióxido de carbono proveniente do ar e duas outras bandas em cerca de 1450 e 1650 cm^{-1} referentes à proteína com contribuição do espectro da água em 1650 cm^{-1} .

A intensidade da banda referente ao dióxido de carbono apresenta certa instabilidade, com valores negativos em alguns espectros, devido à variação de sua concentração no interior do compartimento de amostras. Essa instabilidade,

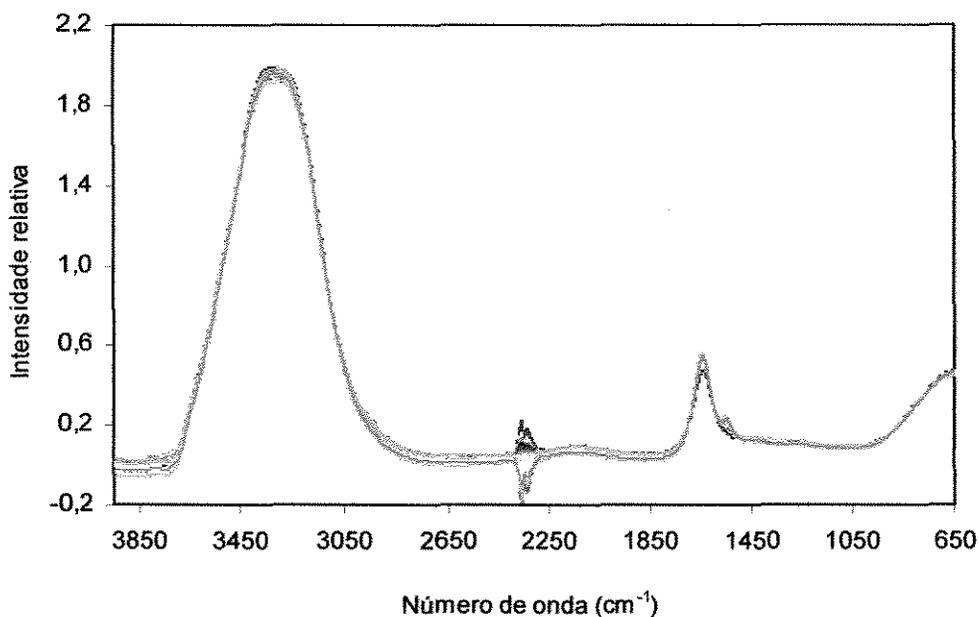


Figura 3.21. Espectros ATR-FTIR de soluções de lisozima de 0 a 100 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5 obtidos através de sonda de ZnSe. Total de 21 espectros, temperatura de 24°C.

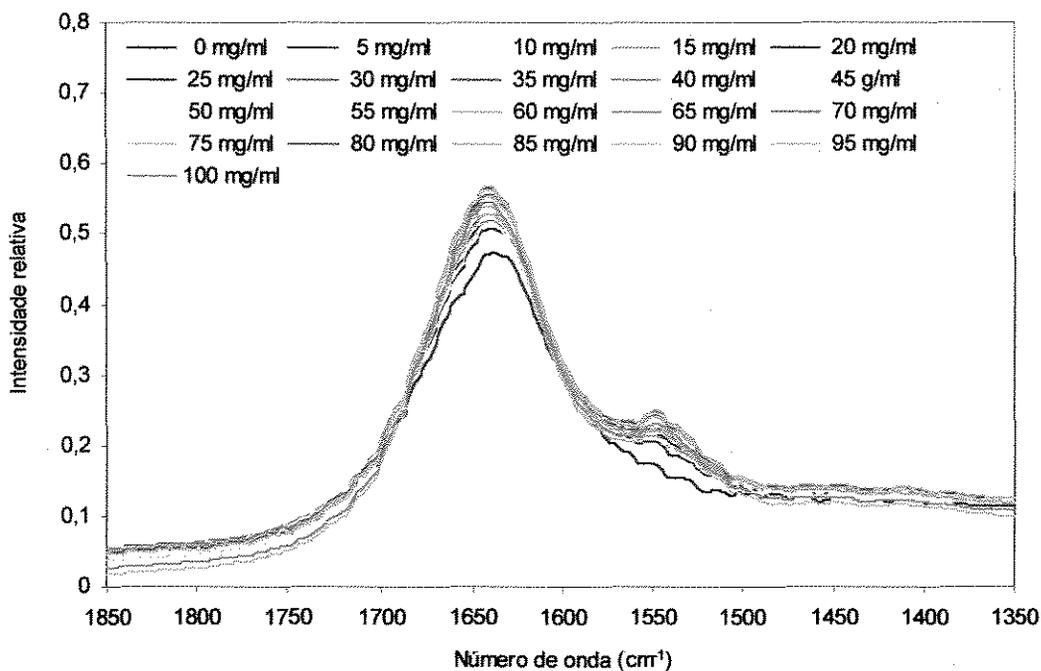


Figura 3.22. Bandas de proteína e água apresentadas pelos espectros ATR-FTIR de solução de lisozima de 0 a 100 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. Espectros obtidos a 24 °C através da sonda de ZnSe.

entretanto, não interferiu nos resultados aqui apresentados, uma vez que a respectiva região espectral não foi incluída no modelo de calibração.

Na construção do modelo selecionou-se a região espectral de 1770,4 a 1485,0 cm^{-1} contendo bandas provenientes da lisozima com contribuição do espectro da água em cerca de 1650 cm^{-1} (Figura 3.22).

Neste modelo estabeleceu-se o número de fatores de 4 e obteve-se um erro padrão médio de 2,4 mg/ml de lisozima determinado pelo método de validação cruzada “leave one out cross validation” (Figura 3.23).

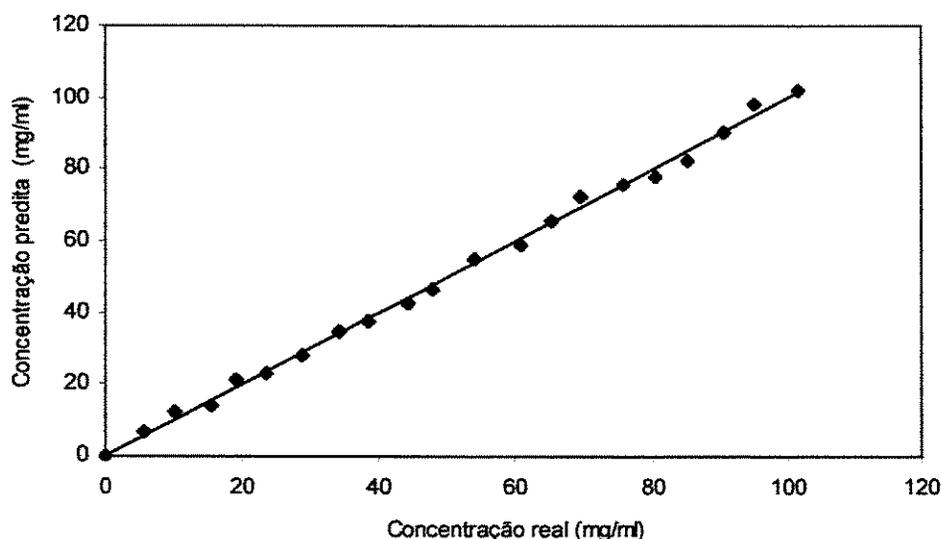


Figura 3.23. Validação cruzada “leave one out” do modelo de calibração de espectros ATR-FTIR de soluções de 0 a 100 mg/ml de lisozima em solução acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. Espectros coletados a 24 °C através de uma sonda ATR de ZnSe.

Desenvolvido o modelo de calibração, avaliou-se o efeito da temperatura sobre os dados gerados por esse modelo. Nessa avaliação registrou-se os valores de concentração preditos a partir de espectros coletados em diferentes

temperaturas e observou-se possível variação dos valores em função da temperatura. Foram avaliadas temperaturas de 12 a 35 °C e o teste foi realizado utilizando-se soluções com concentrações de 8,6 a 96,0 mg/ml de lisozima.

Para o controle da temperatura, a solução era mantida em um frasco encamisado onde se fazia a troca de calor utilizando circulação de água proveniente de um banho termostático. A temperatura foi monitorada através de um termômetro introduzido na solução. A solução no frasco era fracamente agitada através de uma barra magnética e o frasco era fechado, havendo orifícios na tampa para a introdução da sonda e do termômetro.

Para cada solução coletou-se espectros em diferentes temperaturas e, a partir de cada espectro obteve-se valores de concentração preditos nas respectivas temperaturas (Tabela 3.2). As concentrações preditas variaram em relação às concentrações esperadas (valores de concentração de acordo com o preparo das soluções). Na Tabela 3.3 tem-se os erros na predição das concentrações para cada solução e na Figura 3.24 tem-se o perfil desses erros em função da temperatura.

Tabela 3.2. Efeito da temperatura na predição de concentração de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, através da sonda ATR de ZnSe.

Concentrações esperadas (mg/ml)	Concentrações preditas em diferentes temperaturas (mg/ml)								
	12 °C	14 °C	17 °C	20 °C	23 °C	26 °C	29 °C	32 °C	35 °C
8,6	10,1	11,1	11,3	12,3	12,6	13,6	14,0	15,0	16,0
17,2	17,3	18,3	18,3	19,3	20,8	20,9	21,3	22,2	22,0
31,0	29,5	28,9	30,0	30,7	31,1	32,9	33,3	33,3	34,0
45,0	42,2	41,0	43,0	43,7	44,3	44,5	45,4	46,7	46,7
58,0	57,2	58,0	59,2	59,2	59,6	59,4	60,0	60,8	61,0
75,0	74,4	74,3	75,0	75,4	76,3	76,2	77,2	76,1	76,4
96,0	-	94,0	94,0	94,5	94,0	94,1	94,5	93,5	94,0

Tabela 3.3. Erros na predição de concentração de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 através da sonda ATR de ZnSe.

Concentrações esperadas (mg/ml)	Erros de predição: diferença entre as concentrações preditas e as concentrações esperadas (mg/ml)									
	12°C	14°C	17°C	20°C	23°C	26°C	29°C	32°C	35°C	Erro máximo (mg/ml)
8,6	1,5	2,5	2,7	3,7	4,0	5,0	5,4	6,4	7,4	7,4
17,2	0,1	1,1	1,1	2,1	3,6	3,7	4,1	5,0	4,8	5,0
31,0	-1,5	-2,1	-1,0	-0,3	0,1	1,9	2,3	2,3	3,0	3,0
45,0	-2,8	-4,0	-2,0	-1,3	-0,7	-0,5	0,4	1,7	1,7	4,0
58,0	-0,8	0,0	1,2	1,2	1,6	1,4	2,0	2,8	3,0	3,0
75,0	-0,6	-0,7	0,0	0,4	1,3	1,2	2,2	1,1	1,4	2,2
96,0		-2,0	-2,0	-1,5	-2,0	-1,9	-1,5	-2,5	-2,0	2,5

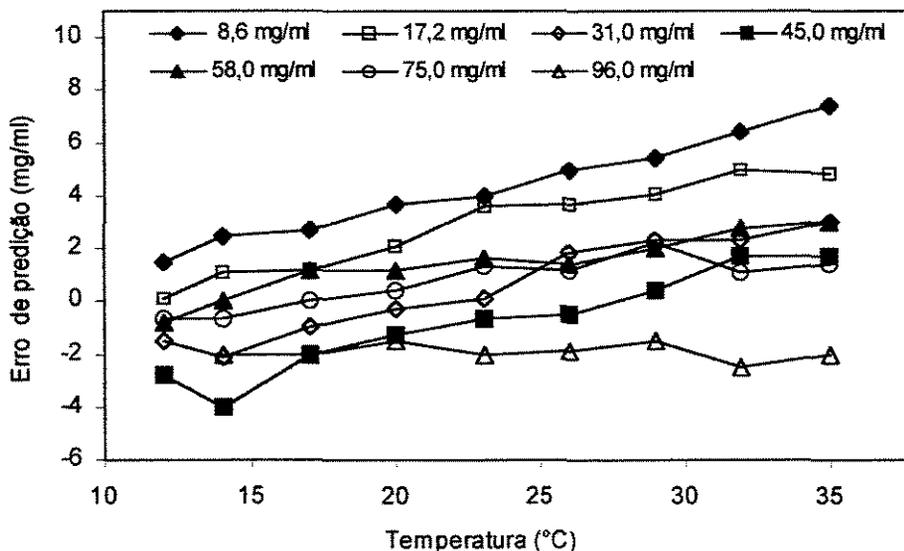


Figura 3.24. Erros obtidos na predição de concentrações de lisozima por ATR-FTIR em função da temperatura: diferença entre valores preditos e valores esperados. Concentrações preditas a partir de espectros ATR-FTIR coletados através da sonda de ZnSe. Soluções preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. Concentrações das soluções indicadas no gráfico.

Através da Figura 3.24 observa-se que com o aumento da temperatura ocorreu um aumento no erro na predição das concentrações, exceto para a solução de 96 mg/ml de lisozima. Entretanto, na Figura 3.25, onde se tem o perfil dos erros relativos das predições, se observa que os erros foram significativos (maior que 10%) apenas para as concentrações de 8,6 e 17,2 mg/ml com máximos em cerca de 86,0 e 27,0%, respectivamente, sendo que para a concentração de 31,0 mg/ml o erro máximo foi de cerca de 9,0% e para demais valores os erros ficaram abaixo de 5%. Verificou-se assim que o modelo de calibração é razoavelmente preciso para concentrações acima de 30,0 mg/ml. Para valores abaixo desta concentração, os erros de predição foram mais significativos, provavelmente, devido à menor sensibilidade do método para concentrações baixas.

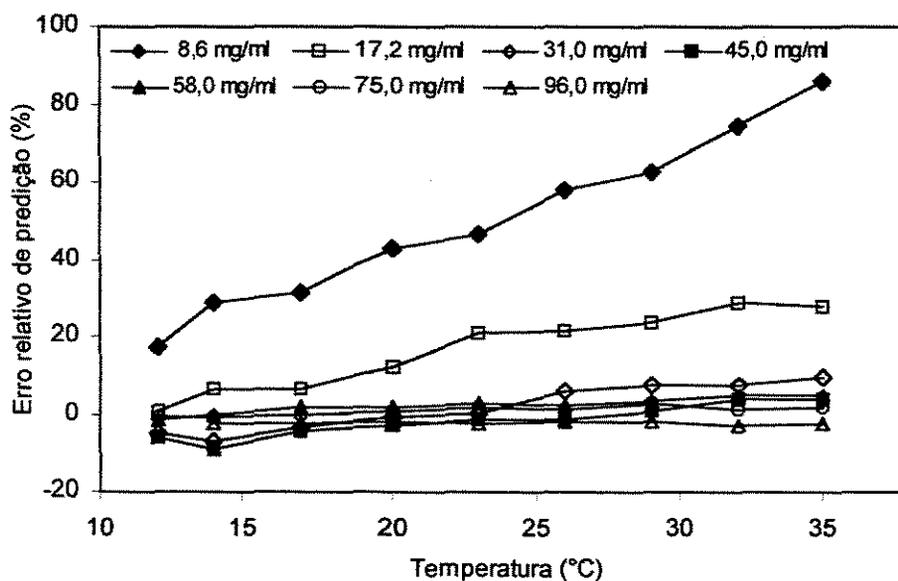


Figura 3.25. Erros relativos obtidos na predição das concentrações de lisozima em função da temperatura. Concentrações preditas a partir de espectros ATR-FTIR coletados através da sonda de ZnSe. Soluções preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. Concentrações das soluções indicadas no gráfico.

3.2.6 Ensaios de monitoramento de soluções de lisozima através da sonda Dipper 210

Avaliada a influência da temperatura no modelo de calibração, foi avaliado o monitoramento de uma solução ao longo do tempo de modo a observar possível efeito de interferências ou estabilidades do sistema. A sonda foi imersa em solução acetato de sódio 50 mM pH 4,5 contendo cerca de 30 mg/ml de lisozima. Espectros a partir dessa solução foram coletados em intervalos de 10 minutos e esses espectros foram interpretados em termos de concentração de lisozima a partir do modelo de calibração. Os valores preditos, ao contrário do que se esperava, aumentaram ao longo do tempo (Figura 3.26).

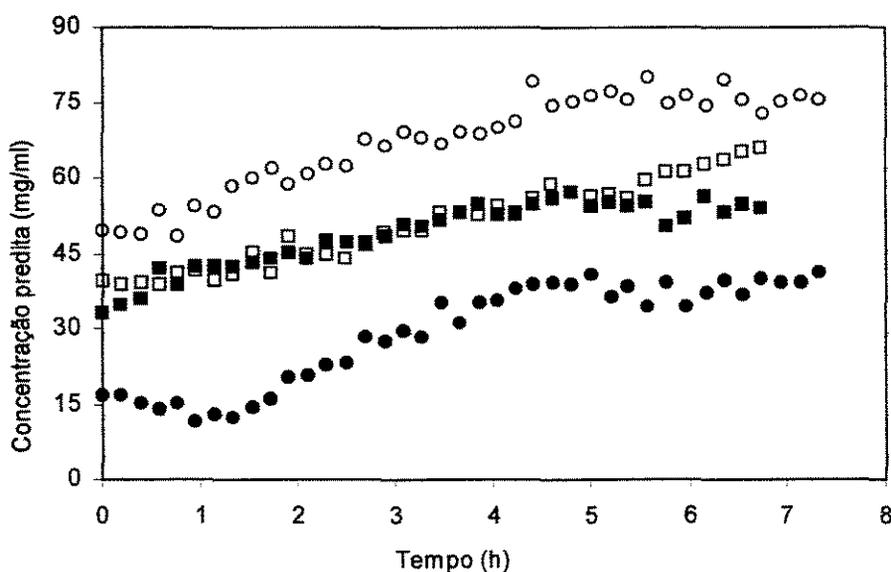


Figura 3.26. Ensaio de monitoramento de concentração protéica através de ATR-FTIR utilizando sonda de ZnSe ao longo do tempo em condição constante. (■) Lisozima a 30 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5; (○) lisozima a 47 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 e NaCl 1,0 M; (□) lisozima a 42 mg/ml em H₂O e (●) tripsina a 15 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5.

Essa observação levou à hipótese de ter ocorrido adsorção da lisozima sobre a superfície da sonda causando a idéia errônea de aumento da concentração. De modo a verificar a influência das condições do meio favorecendo essa adsorção, repetiu-se o experimento para soluções de lisozima em apenas água e no mesmo tampão na presença de NaCl. Tendo observado o mesmo comportamento de adsorção da lisozima na sonda, mesmo a partir de diferentes condições, testou-se outra proteína, a tripsina suína, sendo que esta também apresentou o mesmo comportamento (Figura 3.26).

Na Figura 3.27 são apresentados espectros de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 coletados antes e após observada a adsorção, assim como o espectro de um filme de lisozima aderida à sonda (este foi obtida através de deposição de solução concentrada de lisozima seguida de evaporação do solvente). Através da comparação dos espectros coletados no início e no final do processo, observa-se apenas uma pequena variação das intensidades das bandas características da proteína. O espectro de lisozima ao final do estágio de suposta adsorção se assemelha mais àquele obtido a partir da solução do que com o espectro a partir de lisozima seca.

Baseando na hipótese de o erro na predição das concentrações ter sido causado por instabilidades instrumentais, e não devido interação do soluto com a sonda, realizou-se teste semelhante utilizando solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Inicialmente coletou-se espectros a partir de soluções com concentrações conhecidas de sal.

Na Figura 3.28 são apresentados espectros obtidos a partir destas soluções, os quais foram utilizados para a construção de um modelo de calibração.

O número de fatores utilizado na calibração foi de 2 e as regiões do espectro utilizadas nesse modelo foram de 1199,6 a 1000,9 cm^{-1} e 1510,1 a 1359,6 cm^{-1} . O erro padrão médio determinado pela validação cruzada "leave one out" foi de 0,01 M.

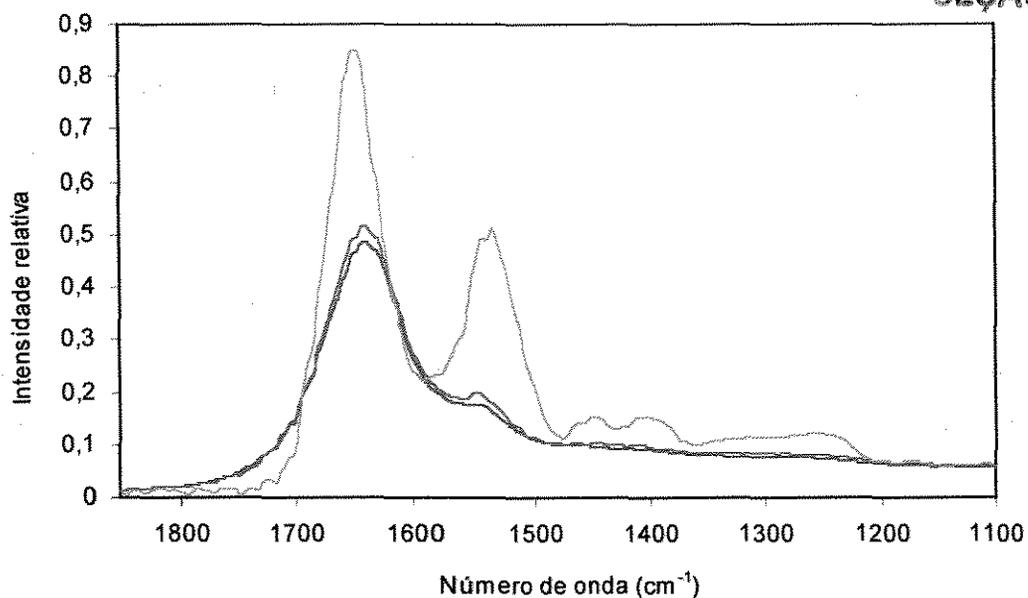


Figura 3.27. Espectros ATR-FTIR a partir de solução de lisozima em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 coletados (—) imediatamente após imersão da sonda, (---) 6 horas após a imersão da sonda e (····) a partir de filme seco de lisozima aderido sobre a elemento ATR da sonda.

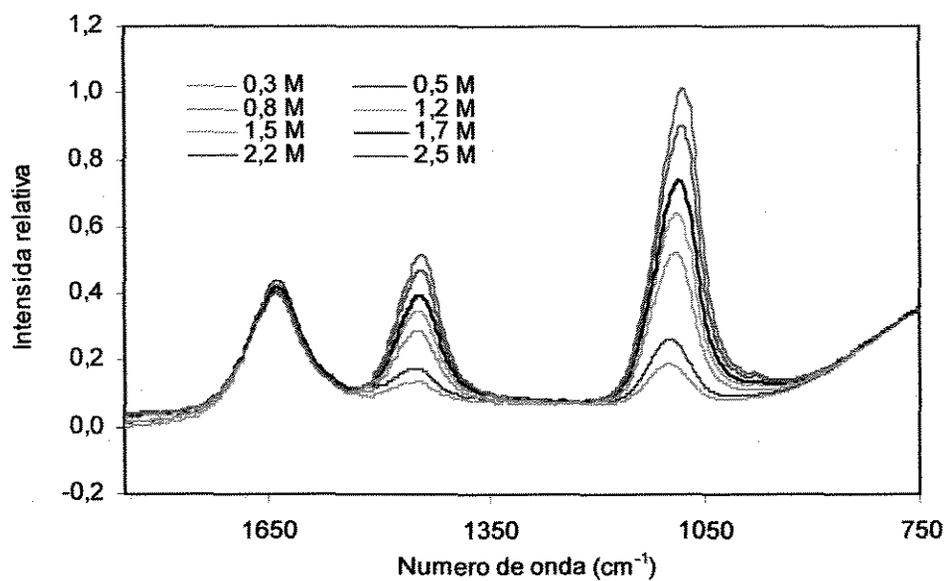


Figura 3.28. Espectros de soluções padrão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ empregados na construção do modelo de calibração.

A seguir, a sonda foi imersa em uma solução contendo cerca de 1,0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir do qual foram coletados espectros ao longo do tempo com intervalos de 10 minutos. Os espectros foram interpretados em termos de concentração do sal através do modelo de calibração previamente desenvolvido, gerando um perfil de concentrações ao longo do tempo (Figura 3.29). O valor predito era constante com o tempo corroborando com a suposição de que a adsorção protéica foi de fato a razão dos erros de predição das concentrações de lisozima e tripsina.

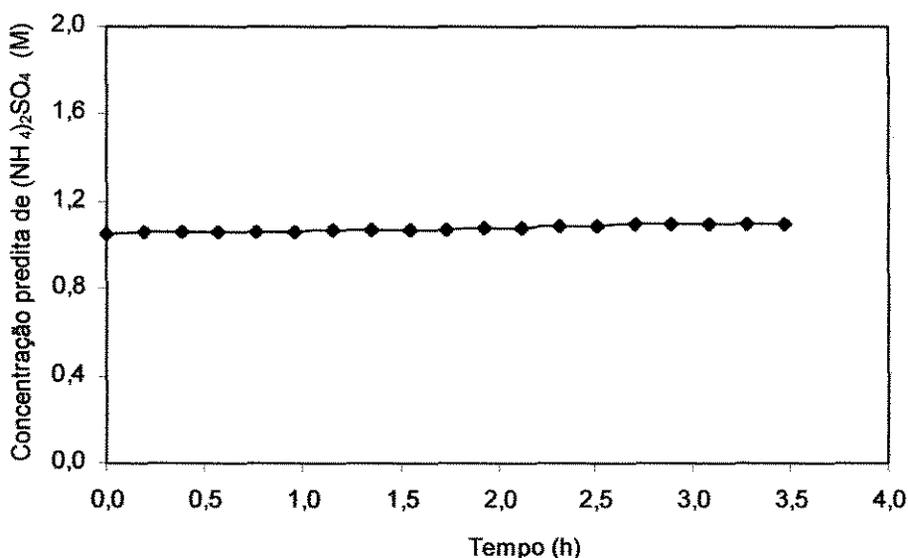


Figura 3.29. Verificação da estabilidade da predição de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao longo do tempo através de ATR-FTIR utilizando sonda de ZnSe.

Desse modo, esses estudos mostraram que, apesar da eficácia do modelo de calibração com pouca influência da temperatura mostrando o potencial da espectroscopia ATR-FTIR para o monitoramento de supersaturação, o sistema foi inadequado para o monitoramento da concentração de lisozima ao longo do tempo devido a adsorção protéica sobre a sonda.

Entretanto, como nos estudos de monitoramento pela célula de Ge, acredita-se que o experimento realizado com a sonda de ZnSe não invalida a aplicação do método para proteínas em geral, sendo que estas moléculas podem

apresentar características específicas na interação com diferentes materiais. Sugere-se assim, que estudos com outras proteínas ou com outros elementos ATR que não promovam adsorção protéica, possibilitariam o uso de ATR FTIR no monitoramento da supersaturação dessas moléculas.

Uma possibilidade da causa da adsorção protéica no elemento ATR de ZnSe seria através de ligação de coordenação com o Zn^{2+} de modo semelhante ao observado na cromatografia IMAC ("Immobilized Metal Ion Chromatography"), na qual proteínas são adsorvidas em uma matriz cromatográfica carregada com íons metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} (Porath, 1988; Sulkowski, 1985; Vijayalakhmi, 1989). Para a verificação dessa possibilidade sugere-se a adição de imidazol no meio de cristalização na tentativa de atenuar a adsorção protéica. Nesse caso, deve-se assegurar de que o imidazol não interfira na cristalização da proteína. Outra alternativa, além da adição do imidazol, seria o tratamento da superfície da sonda com solução de EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético), que, com alto poder quelatante, interagiria com o metal impedindo a adsorção protéica.

3.3 CONCLUSÕES

A célula de cristalização desenvolvida (reservatório e célula de fluxo adaptados a um elemento ATR de Ge) apresentou potencial para estudos de cristalização, obtendo sucesso na evaporação para criação de supersaturação, assim como no monitoramento *in situ* de soluções, com medidas ao longo do tempo bastante precisas, quando na ausência de cristais. Entretanto, na presença de cristais, o monitoramento da solução protéica foi inviabilizado devido à suposta interação dos cristais e a superfície de Ge. Embora não tenha ocorrido adsorção protéica a partir da solução, a distribuição das moléculas no cristal pode ter favorecido a adsorção na superfície do elemento ATR. Experimentos de monitoramento de soluções de $(NH_4)_2SO_4$ sem e com cristais deste sal indicaram que a simples decantação dos cristais não causa influência significativa sobre as medidas a partir da fase líquida. Assim, esses experimentos contribuíram para a

hipótese de adsorção dos cristais de lisozima sobre a superfície do cristal de Ge. Desse modo, conclui-se que o sistema desenvolvido, apesar do potencial demonstrado, não foi adequado para estudos da cristalização de lisozima nas condições empregadas nesse estudo.

Quanto à sonda ATR de ZnSe, esta apresentou vantagem de não sofrer influência significativa da temperatura sobre a predição das concentrações de lisozima acima de 30 mg/ml gerando possibilidade de o modelo de calibração ser aplicado no controle da supersaturação por temperatura. Essa sonda, entretanto, apresentou deficiência no monitoramento de soluções de lisozima e tripsina devido à provável adsorção protéica no elemento ATR. Dessa forma, apesar do potencial da espectroscopia infravermelho, verificou-se que a tendência de proteínas interagirem com diferentes materiais pode ser um problema crítico no monitoramento *in situ* de suas soluções com esta técnica.

CAPÍTULO 4 - MONITORAMENTO DE SUPERSATURAÇÃO DE APROTEININA ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA RAMAN

No presente capítulo são apresentados os estudos de aplicação da espectroscopia Raman no monitoramento e controle da supersaturação de aprotinina durante cristalização em gota suspensa (“hanging-drop”). A possibilidade de se monitorar e controlar processos em escalas reduzidas é essencial em estudos envolvendo materiais de alto custo, como proteínas, mesmo em estudos visando uma larga escala. Além de baixo consumo de amostra, uma outra justificativa deste trabalho ter sido conduzido através de experimentos de cristalização em gota suspensa, é o fato de poder servir de base para estudos no campo da cristalografia, onde maior parte dos cristais de proteínas são obtidos através deste método.

A escolha de aprotinina para este estudo, como dito anteriormente, se baseou na possibilidade de futura aplicação de sua cristalização como processo complementar em outros estudos de purificação de aprotinina realizados no LEBp-FEQ-UNICAMP. As condições do meio de cristalização de aprotinina basearam-se em dados de literatura (Lafont *et al.*, 1994 e 1997; Veessler *et al.*, 1996) e consistiram de soluções acetato de sódio 50 mM pH 4,5 contendo NaCl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como agente redutor de solubilidade.

As medidas de concentração através da espectroscopia Raman basearam-se em um modelo de calibração PLS, que possibilitava a predição simultânea das concentrações de aprotinina e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A calibração foi desenvolvida com base em um programa computacional quimiométrico, Quant-IR, da Applied Systems, EUA, específico para aplicações em espectroscopias. O monitoramento da solução em gotas de alguns microlitros foi possível através da utilização de uma sonda de fibra óptica, equipada com uma objetiva que permitia

focar o feixe de luz incidente sobre objetos de pequenas dimensões. Esta sonda, além de permitir medidas em modo remoto, apresentava vantagem de ser um sistema não-invasivo, isto é, sem contato entre instrumento e amostra.

Através destes estudos foi possível determinar a solubilidade de aprotinina na presença de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de gotas de 10 microlitros, assim como controlar a supersaturação de aprotinina nessas gotas otimizando o crescimento dos cristais. No caso de soluções contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, onde foi possível a predição simultânea de concentrações de sal e de proteína na fase líquida durante a cristalização, obteve-se indícios de co-cristalização de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Estes estudos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Kris Arvid Berglund, na "Michigan State University" (EUA), e geraram a publicação de dois artigos no periódico "Crystal Growth & Design", sendo eles: "*Raman spectroscopy monitoring and control of aprotinin supersaturation in hanging-drop crystallization* , v 2 , n 4, 263-267, 2002" e "*Simultaneous monitoring of protein and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations in aprotinin hanging-drop crystallization using Raman spectroscopy*, v 2, n 6, 511-514, 2002".

As atividades realizadas e os resultados obtidos nesses estudos são detalhados e discutidos a seguir.

4.1 METODOLOGIA

4.1.1 Materiais e Equipamentos

Materiais: Foram utilizados neste trabalho aprotinina da Sigma, EUA, lamínulas siliconizadas e corante IZIT, da Hampton Research, EUA e demais reagentes de, no mínimo, grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultra-pura, destilada e deionizada e foram filtradas em filtros de acetato de celulose, com tamanhos de poros 0,45 μm , da Milipore, EUA. A soluções foram

filtradas em seringas de 1,0 ml acoplado a um suporte para filtros com diâmetro de 25 mm.

Equipamentos e acessórios: Foram utilizados os espectrofotômetros Raman Hololab 1000 e Hololab 5000, ambos da Kaiser Optical Sytems, EUA, constituídos, respectivamente, por um laser de He-Ne de 30 mW a 632 nm e um laser de Nd:YAG de 100 mW a 785 nm. Estes sistemas eram equipados de uma camera CCD (“charge-coupled device”) e uma sonda de fibra ótica, onde o espalhamento era detectado a 180°, fenômeno conhecido como “backscattering”. A sonda era constituída por uma fibra ótica de excitação que conduzia a radiação incidente até a amostra, e por outras seis fibras óticas de coleta, responsáveis pela captação da luz espalhada pela amostra e pela condução desta luz até o detector. Uma objetiva na extremidade da sonda permitia que o feixe de luz incidente fosse focado sobre pequenos objetos, sem necessidade de imersão ou contato da sonda com o material analisado.

A utilização dessa sonda permitiu a obtenção de medidas de modo remoto, a partir de pequenas quantidades de material e de modo não-invasivo. Para visualização dos cristais utilizou-se um Microscópio óptico da Olympus, EUA.

4.1.2 Cristalização de aprotinina pelo método da gota suspensa

A cristalização de aprotinina pelo método da gota suspensa foi conduzida utilizando-se gotas de 10 μ l de solução que eram depositadas sobre reservatórios contendo 20 ml de solução de alta concentração salina. As soluções foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 e concentrações conhecidas de NaCl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Estas condições se basearam em dados de literatura (Lafont *et al.*, 1994 e 1997; Veessler *et al.*, 1996).

Gotas das soluções eram depositadas através de uma pipeta automática sobre lamínulas de vidro siliconizadas. O fato de as lamínulas de vidro serem siliconizadas, tornando-as hidrofóbicas, evitavam que a gota se espalhasse sobre a superfície da lamínula desfazendo a gota. As lamínulas contendo as gotas eram então invertidas e posicionadas sobre a extremidade de um reservatório contendo

10 ml de solução com alta concentração salina (Figura 4.1). A solução do reservatório consistia de uma solução tampão de concentração e pH idênticos aos da gota, diferindo, no entanto, pela ausência de proteína e pela maior concentração de sal. A lamínula contendo a gota era selada sobre o reservatório através de uma película de graxa de silicone aplicada na borda superior do reservatório, de modo a garantir ambiente hermeticamente fechado.

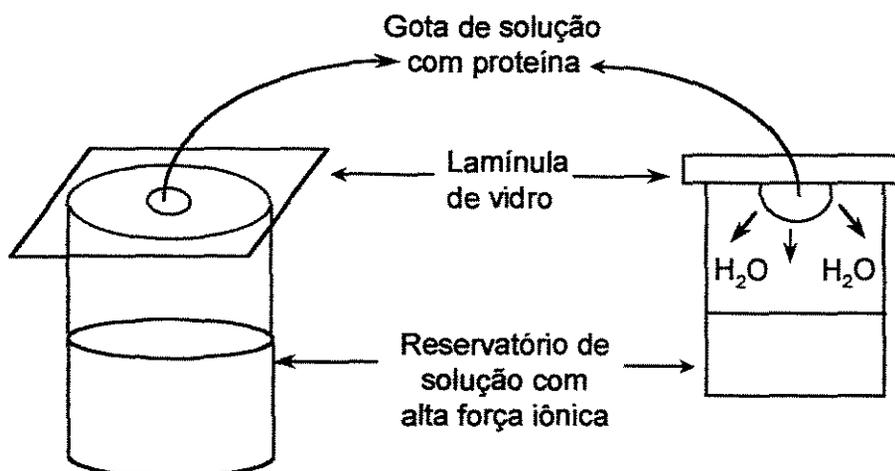


Figura 4.1. Esquema da metodologia de cristalização em gota suspensa.

Devido à maior concentração de sal no reservatório, isto é, uma maior força iônica, em relação à solução da gota, gerava-se uma diferença entre a pressão de vapor nas superfícies das mesmas. Para atingir o equilíbrio, ocorria então a evaporação gradual da água da gota para o reservatório levando a gota à supersaturação e eventual cristalização.

Quanto menor a diferença entre as forças iônicas na solução da gota e na solução do reservatório, menores eram a taxa de evaporação e supersaturação e, conseqüentemente, maior o tempo para o aparecimento de cristais. Portanto, para que a cristalização ocorresse mais rapidamente, aumentava-se a concentração do agente precipitante no reservatório, criando assim uma maior diferença de pressão de vapor e, conseqüentemente, uma maior taxa de

evaporação e supersaturação. Nesse caso, no entanto, havia o risco de gerar uma supersaturação demasiadamente alta causando a precipitação de sólidos amorfos ao invés de cristais de estrutura ordenada.

4.1.3 Certificação da composição dos cristais de aprotinina

Durante processos de cristalização de proteínas conduzidas em altas concentrações de sal é bastante provável ocorrer a cristalização de não somente proteína, mas também do sal. Para certificar que os cristais obtidos nos experimentos eram de fato cristais de proteína e não de sal, 1 μ l do reagente IZIT era adicionado à gota contendo o cristal. O reagente IZIT consiste de um corante específico para identificação de cristais de proteínas. Não se menciona aqui sua composição pois ela não é descrita pelo fabricante. A identificação dos cristais através da adição deste corante baseia-se no fato de cristais de proteína apresentarem alto conteúdo de solvente que se encontra distribuído através de canais microscópicos dentro de sua estrutura. Estes canais de solvente permitem que o corante permeie através da estrutura do cristal propiciando coloração azul ao mesmo. Os cristais de sal, ao contrário, por serem mais compactos não permitem a permeação do corante dentro de sua estrutura e, desse modo, não mudam de coloração.

4.1.4 Obtenção dos espectros Raman a partir da gota suspensa

Na obtenção dos espectros Raman a partir de soluções protéicas foram testados inicialmente dois diferentes equipamentos, HoloLab 1000 e HoloLab 5000, ambos fornecidos pela Kaiser Optical Systems (EUA) e com configuração muito semelhantes, exceto pela fonte de luz utilizada. Em ambos os casos, a obtenção dos espectros foi realizada através de uma sonda de fibra óptica adaptável à qualquer um dos sistemas. Tal sonda era conectada ao espectrofotômetro Raman de modo que radiação era direcionada à amostra em modo remoto, permitindo assim coletar espectros a partir da gota suspensa. Na Figura 4.2 tem-se um diagrama esquemático do sistema de monitoramento da

cristalização em gota suspensa através da aplicação da sonda Raman de fibra óptica. O reservatório contendo lamínula e gota era posicionado sob o foco do feixe de luz proveniente da sonda.

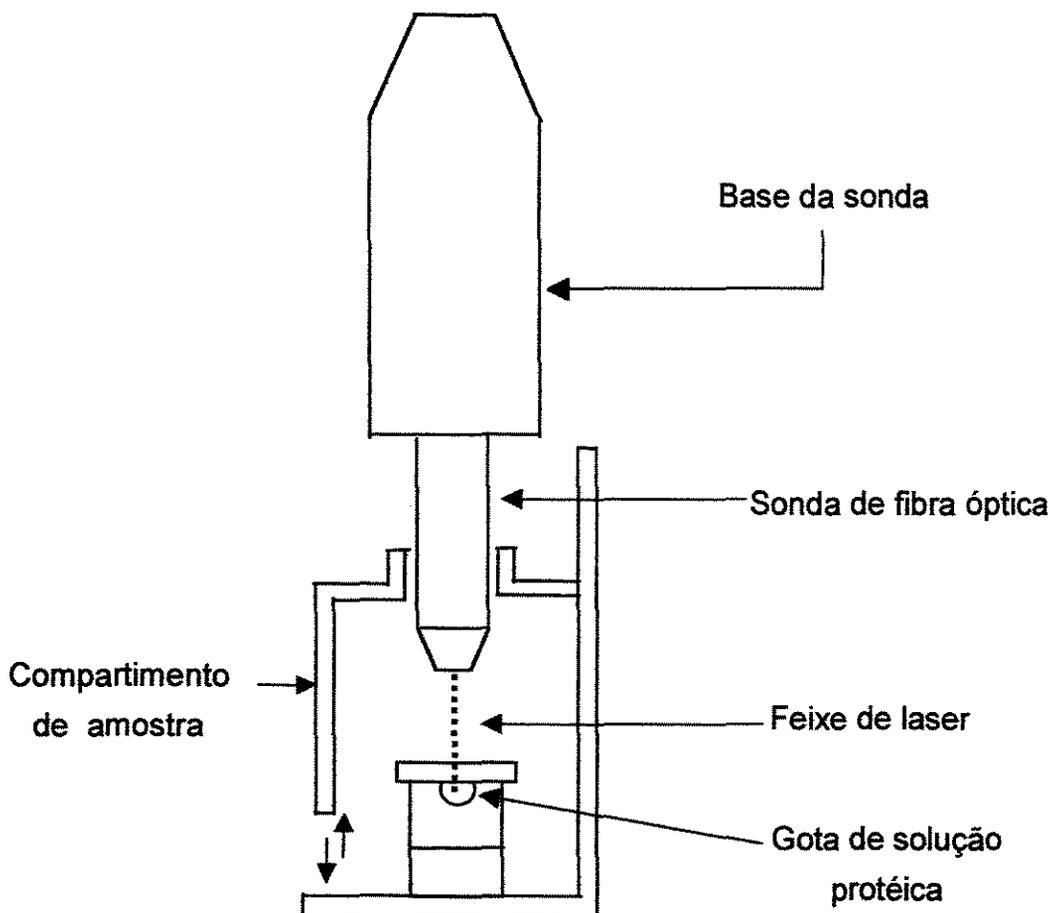


Figura 4.2. Diagrama esquemático do sistema de obtenção dos espectros Raman durante o monitoramento da cristalização pelo método da gota suspensa.

Como o espectro Raman é sensível à luz ambiente, a sonda era equipada com um compartimento de amostras que envolvia a amostra e a extremidade da sonda. Esse compartimento consistia de uma caixa de material opaco com uma parede deslizante, a qual permitia que o compartimento fosse aberto para introduzir e remover a amostra. O recipiente contendo lamínula e gota era introduzido no compartimento de amostras de modo que o feixe de laser incidisse no centro da gota. O compartimento era então fechado e, a seguir, através de

movimentação vertical da sonda, ajustava-se a distância entre a sonda e a gota de modo a obter o melhor foco e melhor sinal, isto é, maior intensidade dos picos no espectro gerado que era observado no monitor de um microcomputador conectado ao espectrofotômetro. Uma vez estabelecido o melhor posicionamento da sonda, esta era imobilizada até o término do experimento. O procedimento de ajuste do foco era fundamental para a reprodutibilidade dos espectros. Uma fotografia do sistema constituído pelo espectrofotômetro HoloLab 1000 e a sonda de fibra ótica é apresentada na Figura 4.3. Salienta-se que o sistema HoloLab 5000 é externamente idêntico a este, diferindo apenas internamente pelo fato de utilizarem diferentes fontes de iluminação.

4.1.5 Calibração dos espectros Raman

Para a construção do modelo de calibração, coletou-se espectros a partir de gotas de soluções padrão de aprotinina que eram depositadas uma a uma através de uma pipeta automática sobre lamínulas de vidro siliconizado. De modo a evitar evaporação a partir da gota durante o tempo de coleta do espectro, as lamínulas eram invertidas e seladas sobre um recipiente fechado contendo solução tampão nas mesmas condições da solução da gota.

A calibração utilizada no monitoramento da cristalização de aprotinina foi construída a partir de espectros de 20 padrões com concentrações variando de 0 a 100 mg/ml de aprotinina e de 0 a 2,0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (soluções tamponadas em acetato de sódio 50 mM pH 4,5). O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ um dos sais utilizados como agente precipitante de aprotinina, foi incluído no modelo permitindo a determinação simultânea das concentrações de proteína e de sal durante a cristalização. O NaCl, também utilizado como agente precipitante de aprotinina neste estudo, não foi incluído na calibração uma vez que ele não apresenta sinais de espalhamento Raman. O modelo de calibração foi, entretanto, utilizado também para monitorar aprotinina em soluções contendo NaCl. O modelo de calibração PLS foi construído utilizando o programa computacional QuantIR, da Applied Systems, EUA.

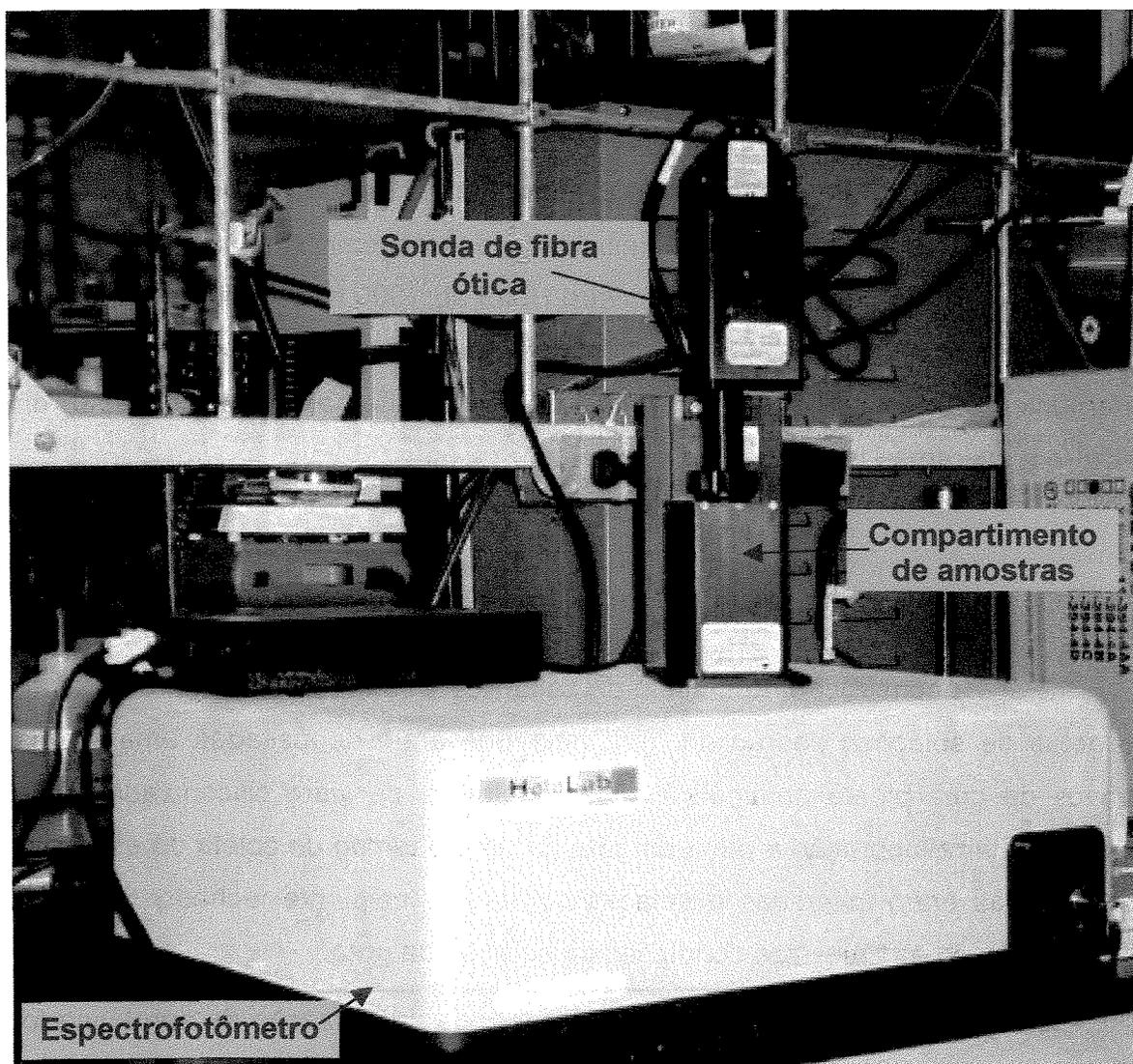


Figura 4.3. Espectrofotômetro Raman HoloLab 1000 equipado com sonda de fibra ótica.

4.1.6 Determinação de solubilidade de aprotinina

Gotas de 10 μ l de solução de aprotinina foram depositadas sobre lamínulas de vidro siliconizado as quais foram a seguir invertidas e seladas sobre reservatórios contendo 10 ml de solução cristalizante. As concentrações iniciais das soluções na gota eram de 10 a 70 mg/ml de aprotinina e 1,0 M de NaCl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nos reservatórios, as concentrações salina das soluções variaram de

1,4 a 2,6 M no caso de NaCl e de 1,5 a 1,8 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Reservatório e gota foram então mantidos em repouso a temperatura ambiente (24°C) por um período de três semanas para formação, crescimento dos cristais e equilíbrio do sistema. Após esse período, foram coletados espectros Raman das gotas determinando-se a concentração protéica da fase líquida, que foi considerada como a solubilidade de aprotinina na condição específica.

4.1.7 Monitoramento da cristalização de aprotinina em gota suspensa

Nos estudos de monitoramento da cristalização, espectros a partir da gota eram coletados ao longo do tempo durante todo o processo de formação dos cristais. A sonda Raman era posicionada sobre a gota suspensa de solução de aprotinina, e espectros eram coletados em intervalos de tempo determinados. Através do modelo de calibração, os espectros coletados durante o processo permitiram monitorar a mudança da composição da fase líquida da gota com o tempo, isto é, as concentrações de aprotinina e também do agente precipitante, no caso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, durante as etapas de evaporação e crescimento dos cristais.

Devido ao pequeno volume da gota, era inevitável que algum cristal em crescimento surgisse no caminho do feixe de luz incidente. Neste caso, a partir de características do espectro era possível dizer se fase líquida ou sólida estava sendo monitorada. O espectro da fase sólida apresentava picos significativamente maiores que o espectro a partir da solução. Sendo assim, através de visualização do espectro, detectava-se quando algum cristal se encontrava no caminho do feixe de luz. Quando isso ocorria, mudava-se a posição do reservatório contendo lamínula e gota, buscando posicionar novamente o feixe sobre a fase líquida fora da direção onde havia cristais.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Obtenção e análise dos espectros Raman de soluções de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Para a obtenção dos espectros Raman de aprotinina foram avaliados inicialmente dois instrumentos, o Hololab Series 1000 equipado com um laser He-Ne com comprimento de onda de 632 nm e o Hololab Series 5000 constituído por um laser Nd:YAG com comprimento de onda de 785 nm.

Os espectros de soluções de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obtidos através de cada um dos sistemas são apresentados na Figura 4.4.

As diferenças que se observam a primeira vista entre os dois espectros é que o espectro a 632 nm apresenta uma significativa inclinação da linha de base, e somente o espectro a 785 nm apresenta uma banda em aproximadamente 1340 cm^{-1} .

O espalhamento a 1340 cm^{-1} é proveniente das lamínulas de vidro siliconizado utilizadas para suportar as gotas a partir das quais foram coletados os espectros.

Na Figura 4.5 é apresentada uma ampliação de parte do espectro apresentado na Figura 4.4, para melhor visualização dos picos de proteína. Observa-se que o espectro a 785 nm apresentou maior sensibilidade em relação a algumas bandas da proteína, corroborando assim com a afirmação da literatura (Schrader, 1995) sobre a vantagem em se utilizar uma fonte de excitação com frequência próxima ou dentro da faixa do infravermelho.

Desse modo, devido a superioridade de detecção dos espectros, o sistema Hololab 5000 com fonte de iluminação a 785 nm foi selecionado para a continuação do presente estudo.

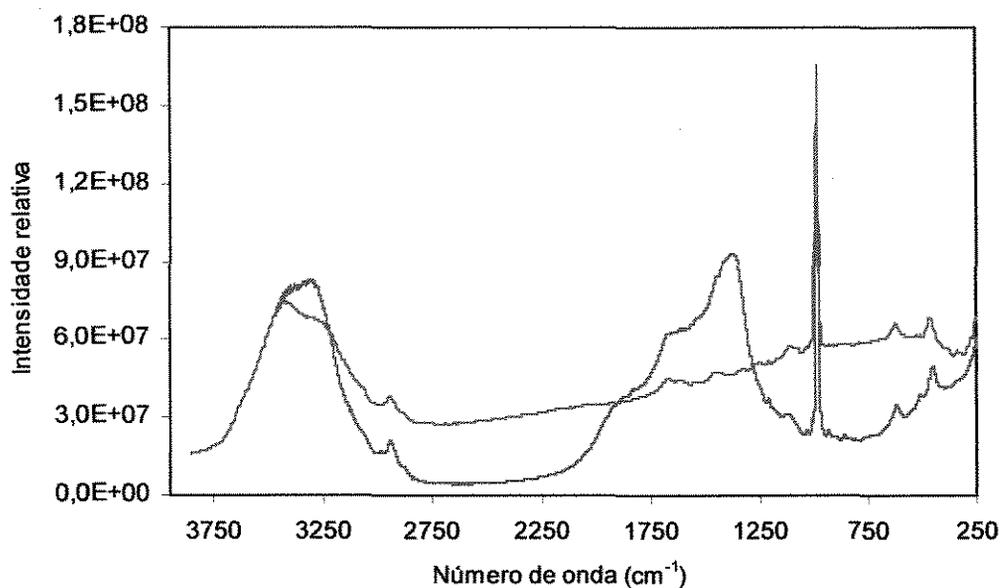


Figura 4.4. Espectros Raman de solução de aprotinina 100 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M obtidos através de fontes de excitação de He-Ne a 632 nm (—) e de Nd:YAG a 785 nm (---).

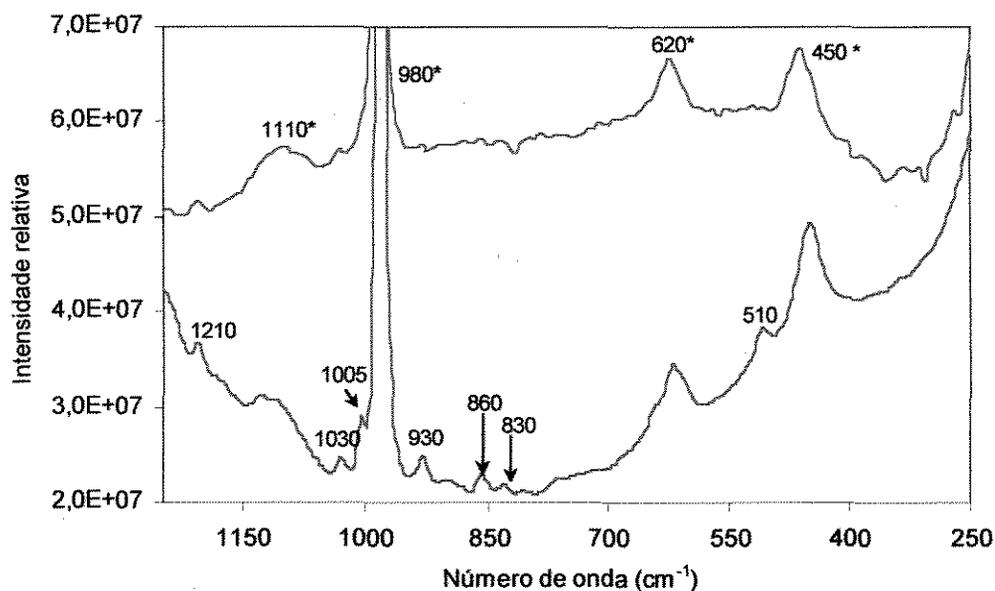


Figura 4.5. Espectros Raman de solução de aprotinina 100 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5 na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M obtidos através de fontes de excitação a (—) 632 nm e (---) 785 nm. As bandas marcadas com asterisco (*) são referentes ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; demais bandas são referentes à aprotinina.

Feita a seleção do laser, foram então estabelecidos os parâmetros para a coleta dos espectros. Cada espectro coletado consistiu da média de 10 aquisições obtidas em 5 s de exposição, com resolução de 8 cm^{-1} . Normalmente, elevando o número de aquisições e o tempo de exposição e reduzindo a resolução, pode-se melhorar a qualidade dos espectros, diminuindo a influência de ruídos. Entretanto, com o aumento do tempo de exposição e número de aquisições aumenta-se significativamente o tempo de coleta de cada espectro. No caso dos espectros de aprotinina, foram avaliados números de aquisições, resolução e tempos de exposição diferentes dos valores mencionados, não se tendo observado nenhuma melhora significativa dos espectros. Dos espectro obtidos, as regiões de interesse, isto é, aquelas contendo bandas de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são apresentadas na Figura 4.6.

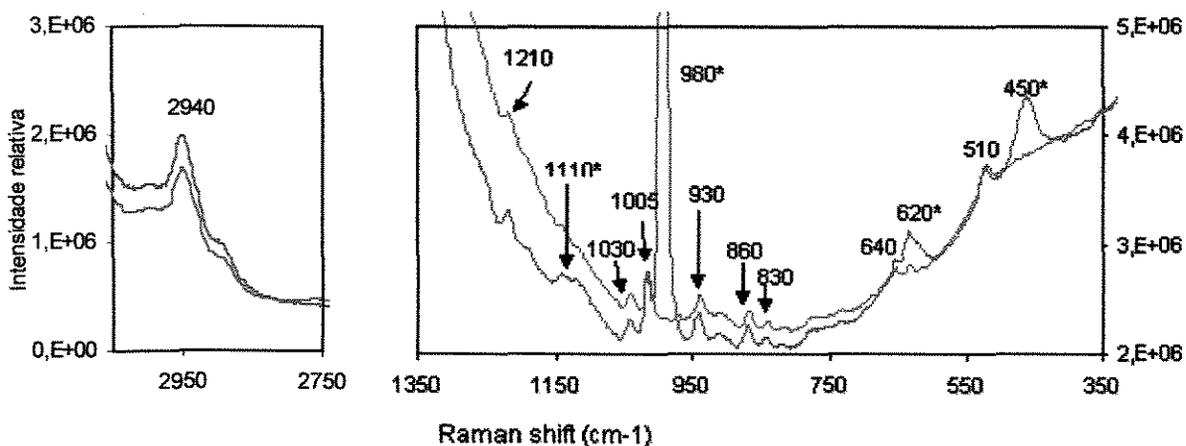


Figura 4.6. Regiões dos espectros Raman de soluções de aprotinina (—) e aprotinina- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (—) em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 4,5 e 24 °C. Concentração de aprotinina: 100 mg/ml em ambas as soluções. Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1,0 M. As bandas a 450, 620, 980 e 1110 cm^{-1} marcadas com asteriscos (*) são referentes ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Demais bandas são referentes a aprotinina.

Comparando-se os espectros de somente aprotinina e da mistura aprotinina- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, identificou-se picos referentes à proteína e picos referentes

ao sal. A identificação dos picos em relação a cada molécula é apresentada na legenda da figura.

O número de vibrações de uma molécula assim como sua atividade na espectroscopia Raman, podem ser previstas a partir de estudos da simetria da molécula. Para moléculas protéicas que caracterizam-se por apresentar estrutura polimérica resultante da combinação entre vinte diferentes monômeros (aminoácidos), tal análise se torna extremamente complexa. Entretanto, alguns tratamentos teóricos baseando-se em moléculas modelo têm sido utilizados visando identificar os principais modos vibracionais de proteínas.

Arêas e Kawano (1991) apresentam em seu trabalho espectros vibracionais de algumas proteínas especificando os picos presentes nos espectros em relação à estrutura macromolecular. Os espectros de aprotinina aqui obtidos apresentaram semelhanças aos espectros apresentados por Arêas e Kawano, como por exemplo, a banda a 510 cm^{-1} referente a pontes de dissulfeto, S-S, muito típico em espectros de proteínas, o duplete de tirosina a 830 e 860 cm^{-1} , a banda a 930 cm^{-1} referente às estruturas α -hélice, as vibrações de estiramento C-S próximo de 640 cm^{-1} e a banda a 1005 cm^{-1} referente às bandas de fenilalanina.

4.2.2 Calibração dos espectros Raman de soluções de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Baseando-se no fato do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentar bandas no espectro Raman, desenvolveu-se um modelo de calibração para a determinação simultânea de aprotinina e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para a construção do modelo de calibração, coletou-se espectros de 20 padrões contendo de 0 a 100 mg/ml de aprotinina e 0 a 2,0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 a 24°C .

A calibração foi realizada através do modelo PLS utilizando o programa computacional Quant IR da Applied Systems, EUA. A construção do modelo consistiu em alimentar o programa computacional com os espectros dos padrões, especificando para cada espectro as concentrações de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Uma vez especificados os espectros dos padrões, selecionou-se as regiões dos espectros de interesse para a calibração, isto é, aquelas contendo picos relativos aos solutos a serem quantificados.

Desse modo, as regiões do espectro selecionadas para a calibração foram 410-535 cm^{-1} , 825-880 cm^{-1} , 924-955 cm^{-1} , 1025-1050 cm^{-1} , 1080-1178, 1204-1230 cm^{-1} , e 2880-2980 cm^{-1} incluindo, portanto, os picos a 510 cm^{-1} , 830 cm^{-1} , 860 cm^{-1} , 930 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 1210 cm^{-1} e 2940 cm^{-1} provenientes da aprotinina e os picos a 450 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} , provenientes do sal (Figura 4.6).

Os picos a 620 cm^{-1} e 640 cm^{-1} provenientes do sal e da proteína, respectivamente, não foram incluídos na calibração devido a estarem parcialmente sobrepostos. Quando os picos de dois componentes se sobrepõem, ambos os picos podem influenciar a quantificação dos respectivos componentes, pois os picos podem sofrer interferência mútua.

Pelo mesmo motivo, foram também excluídos os picos a 980 cm^{-1} referente ao sulfato e 1005 cm^{-1} referente à proteína. Em alguns casos, apesar de não ser o ideal, bandas intercaladas são utilizadas em modelos de calibração. Isso ocorre principalmente na ausência de outras bandas, o que não é o caso dos espectros aqui apresentados.

Na calibração PLS é necessário ainda definir o número de fatores, isto é, o número de componentes principais. No modelo de calibração é aconselhável que se utilize um número mínimo de fatores, número este, sugerido pelo programa computacional através dos gráficos de PRESS (Figuras 4.7 e 4.8).

Nesse caso, os gráficos indicaram que 3 (três) fatores é o número adequado para o modelo, tanto para a aprotinina como para o sal. O modelo de calibração desenvolvido apresentou boa precisão com erro padrão médio de 0,55 mg/ml de aprotinina e 0,03 M de sal, ambos determinados pelo método "leave one out cross validation". Os gráficos da validação, um para cada componente da amostra são apresentados nas Figuras 4.9 e 4.10.

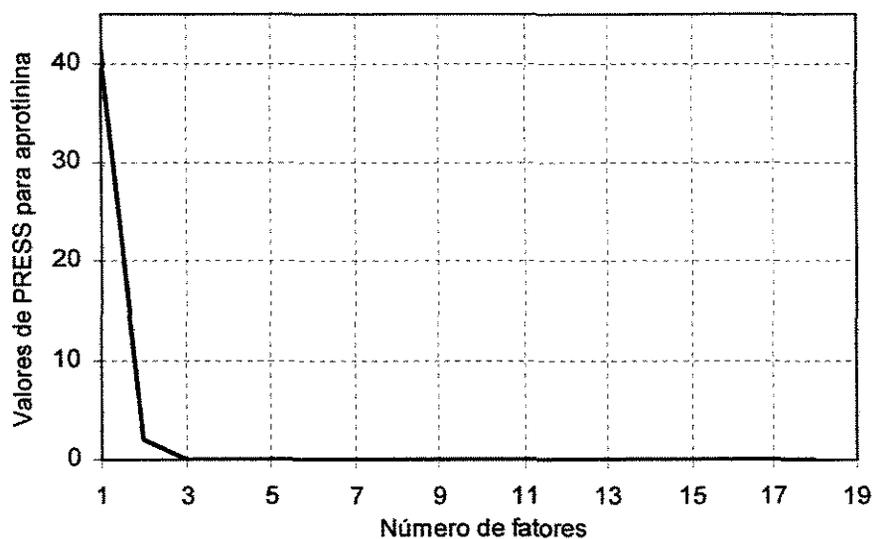


Figura 4.7 Gráfico de PRESS obtido no modelo de calibração PLS para predição de aprotinina em soluções acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 através de espectros Raman.

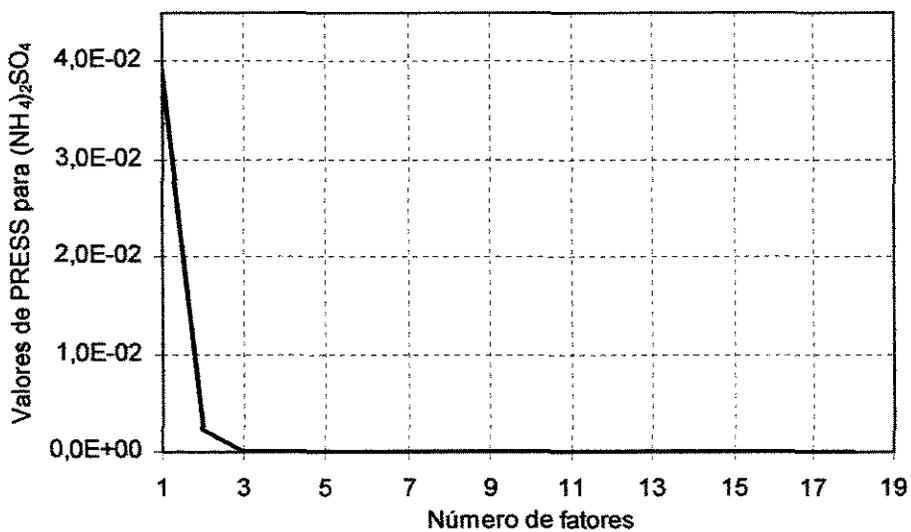


Figura 4.8. Gráfico de PRESS no modelo de calibração para predição de (NH₄)₂SO₄ em soluções acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 através de espectros Raman.

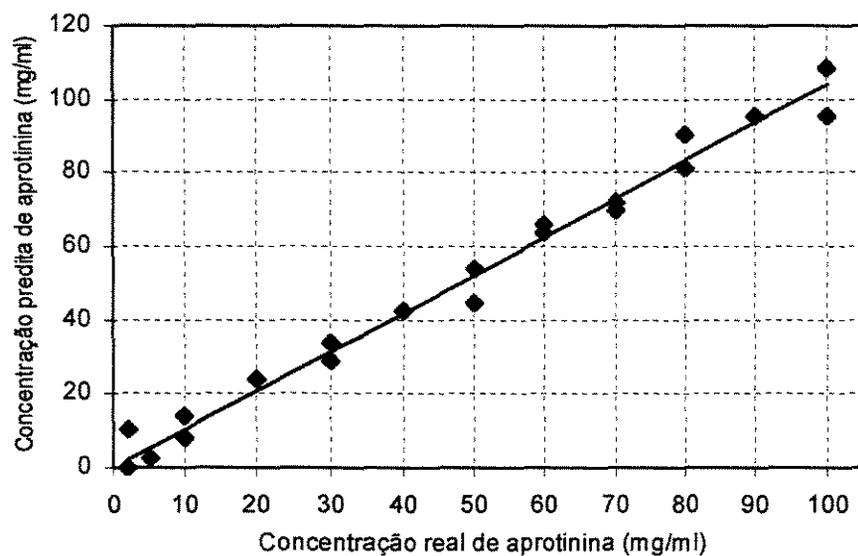


Figura 4.9. Validação cruzada “leave one out” na predição de aprotinina em soluções acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 através do modelo de calibração PLS de espectros Raman.

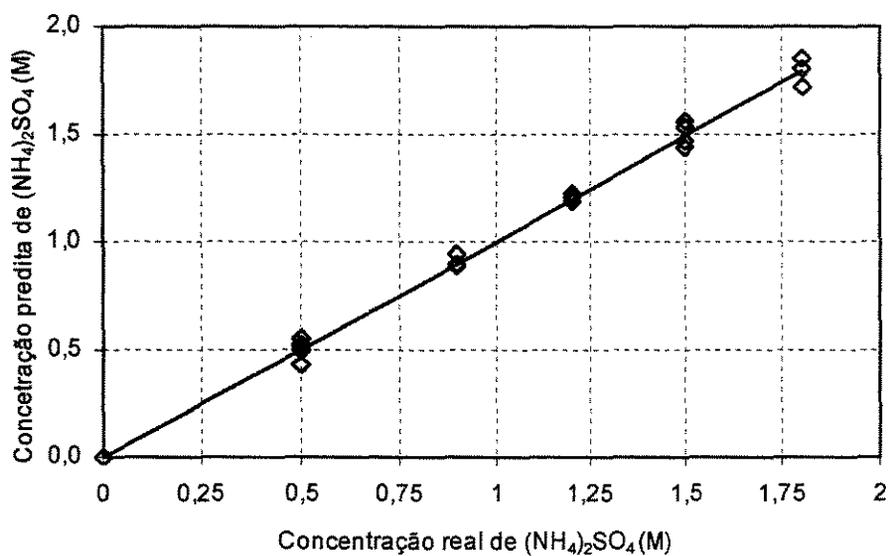


Figura 4.10. Validação cruzada “leave one out” na predição de (NH₄)₂SO₄ em soluções acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 através do modelo de calibração PLS de espectros Raman.

Como dito anteriormente, o NaCl não foi incluído nas soluções padrões usadas na construção deste modelo de calibração, uma vez que este sal não apresenta atividade em espectroscopia Raman. Contudo, o modelo de calibração baseado em soluções de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi utilizado para medidas de concentração de aprotinina em soluções contendo NaCl, com a mesma precisão apresentada em medidas a partir de soluções contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (dados não apresentados).

4.2.3 Determinação de solubilidade de aprotinina a partir de cristalização em gota suspensa

Determinou-se a solubilidade de aprotinina na presença de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de gotas de 10 μl de solução (Figura 4.11). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que as barras de erro na Figura 4.11 representam a amplitude dos dados resultantes de cada triplicata.

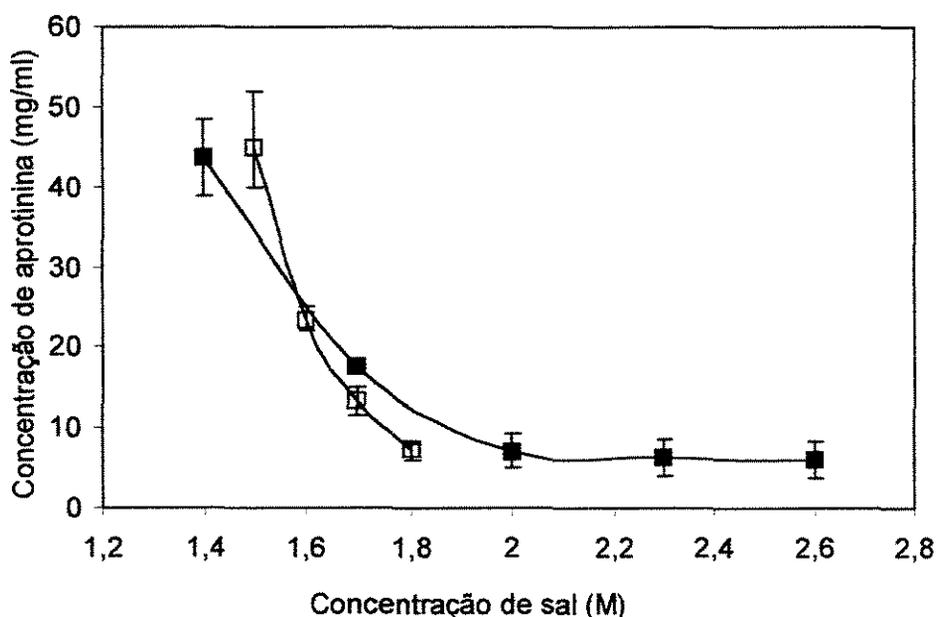


Figura 4.11. Solubilidade de aprotinina a 24 °C na presença de NaCl (■) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (□). Soluções preparadas em acetato de sódio 50 mM pH 4,5. As barras de erros referem-se à amplitude dos dados resultantes de cada triplicata.

Os erros experimentais em valores absolutos foram de no máximo 7 mg/ml equivalente a um erro de 15% em relação ao respectivo valor médio. Na calibração o erro padrão médio determinado na validação foi de 0,5 mg/ml. Em termos de erros percentuais, estes foram de até 35% e maiores para valores mais baixos de concentração. Esse comportamento foi semelhante ao observado no modelo de calibração, onde os erros percentuais atingiram cerca de 35% em valores de concentração abaixo de 10 mg/ml.

Na presença de ambos os sais, a solubilidade de aprotinina decresceu com o aumento da concentração do sal, como era esperado. A solubilidade de aprotinina na presença de NaCl foi razoavelmente próxima da solubilidade determinada por Lafont *et al.* (1994). Os valores determinados no presente estudo foram 43,7; 17,5; 7,1; 6,4 e 6,0 mg/ml de aprotinina na presença de 1,4 ; 1,7 ; 2,0 ; 2,3 e 2,6 M de NaCl, respectivamente. Os valores apresentados por Lafont *et al.* (1994) foram de 44; 15; 5 e 3 mg/ml de aprotinina na presença de 1,4; 1,7; 2,0 e 2,3 M de NaCl, respectivamente. Esses dados mostraram não somente a confiabilidade da metodologia no monitoramento da fase líquida sem interferência da fase sólida, como também a precisão na análise utilizando volumes da ordem de microlitros, facilitando estudos de cristalização de moléculas de alto custo.

4.2.4 Certificação da composição dos cristais de proteína

Em determinadas condições experimentais ocorreu a formação cristais de aprotinina de dois diferentes formatos, sendo um deles em forma de bastão semelhante aos cristais de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, levantando assim a dúvida sobre sua composição. Para certificar que os cristais obtidos nos experimentos eram aprotinina e não sal, 1 μl de IZIT foi adicionado à gota contendo o cristal. A Figura 4.12. apresenta as fotomicrografias de uma gota (A) com cristais de aprotinina e uma gota (B) com cristais de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ambos após adição do corante. Após a adição de corante, com os cristais adquirindo coloração azul confirmou-se que estes eram compostos de proteína. Na gota B, observa-se que

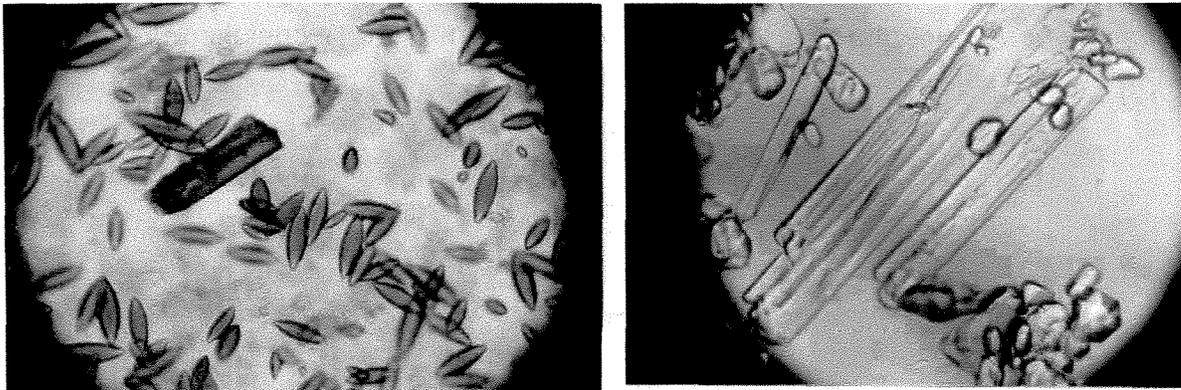


Figura 4.12. Fotomicrografia das gotas “A”, contendo cristais de aprotinina , e “B” contendo cristais de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ambas após adição de $1,0 \mu\text{l}$ de IZIT. Os cristais de aprotinina na gota A foram obtidas em meio tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

os cristais de sal não absorvem o corante e permanecem incolores. Isso ocorre devido à estrutura mais compacta dos seus cristais em relação aos cristais de proteína com estrutura porosa apresentando microduto de solvente.

4.2.5 Monitoramento *in situ* da cristalização em gota suspensa de aprotinina por espectroscopia Raman na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Uma vez estabelecida a metodologia de obtenção dos cristais de aprotinina pelo método da gota suspensa e desenvolvido o modelo de calibração para predição da concentração desta proteína, foram realizados experimentos visando o monitoramento da fase líquida na gota, ao longo de todo o processo de cristalização de aprotinina.

Uma gota de $10 \mu\text{l}$ de solução 30 mg/ml de aprotinina e 1,26 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi depositada sobre uma lamínula de vidro siliconizada a qual foi invertida e selada sobre reservatório com 10 ml de solução cristalizante contendo 2,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Com a sonda de fibra óptica focada sobre a gota, coletou-se espectros Raman da solução na gota continuamente durante etapas de

evaporação, cristalização e equilíbrio. Desse modo, obteve-se os perfis da variação das concentrações de aprotinina e sal durante a cristalização (Figura 4.13).

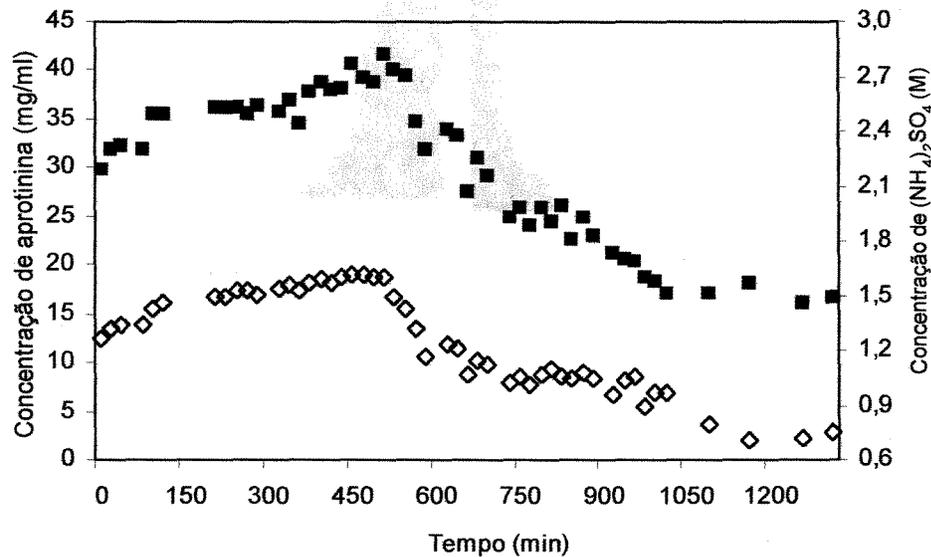


Figura 4.13. Perfis de concentrações no monitoramento de aprotinina e $(NH_4)_2SO_4$ durante cristalização em gota suspensa a 24 °C. (■) concentração de aprotinina ($\times 10^3$); (◇) concentração de $(NH_4)_2SO_4$. Soluções na gota e no reservatório tamponadas em acetato de sódio 50 mM pH 4,5. Concentração de sal no reservatório: 2,2 M.

Observa-se que as concentrações de proteína e sal aumentaram gradualmente no início do processo. Esse aumento de concentrações refere-se à evaporação da gota. Após cerca de 500 minutos, observa-se uma diminuição da concentração indicando o início da cristalização. Com a formação e crescimento dos cristais, a concentração na fase líquida diminui, pois o soluto se transfere desta para a fase sólida. Nos perfis de concentração observa-se que a concentração diminuiu continuamente até o equilíbrio ser atingido, por volta de 1000 minutos. A taxa da diminuição das concentrações é mais acentuada no início, se amenizando ao se aproximar da condição de equilíbrio. Nessa fase próxima do equilíbrio, observa-se uma certa dispersão dos dados, possivelmente, devido à interferência dos cristais sobre as medidas espectrais. Os dados da

Figura 4.13 podem ser visualizados em termos de diagrama de solubilidade, plotando-se as concentrações de proteína versus concentração de sal juntamente com a curva de solubilidade (Figura 4.14).

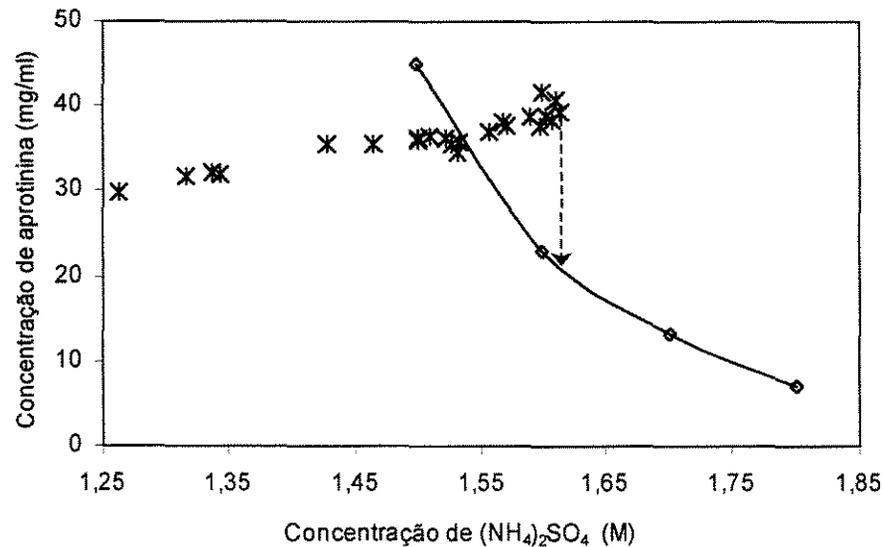


Figura 4.14. Diagrama de solubilidade no monitoramento da cristalização em gota suspensa de aptotina na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 24 °C. Soluções tamponadas em acetato de sódio 50 mM pH 4,5. Concentração de sal no reservatório: 2,2 M.

Observa-se que na fase inicial, as concentrações de proteína e sal aumentam proporcionalmente devido à evaporação da gota. A um certo ponto ultrapassa-se o limite de solubilidade levando a solução da gota à supersaturação. Na região de supersaturação, as concentrações continuam a aumentar até a formação e crescimento dos cristais, quando ocorre uma diminuição da concentração protéica (linha tracejada) caracterizando a fase de cristalização.

Esta linha é composta pelas concentrações de proteína na gota durante a cristalização versus a concentração de sal no instante em que se iniciou a cristalização. Embora a concentração de sal não tenha sido de fato constante durante a etapa de cristalização, na Figura 4.14 representou-se a etapa de cristalização a um valor constante de sal, uma vez que esta ilustra melhor a informação em termos práticos, isto é, informa a concentração de agente

precipitante no momento em que a proteína, componente alvo, começou a cristalizar, diminuindo assim sua concentração na fase líquida até atingir o equilíbrio.

O fato inesperado de não só a concentração de proteína mas também a concentração de sal diminuir durante a cristalização, foi interpretado como uma indicação da co-cristalização de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fenômeno discutido no tópico a seguir. Além da indicação inesperada da co-cristalização de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, estes resultados mostraram o sucesso da metodologia de monitoramento da fase líquida gota durante todo o processo.

4.2.6 Co-cristalização de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Como indicado na Figura 4.13, durante a cristalização de aprotinina na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não somente a concentração de proteína, mas também a concentração de sal diminuiu na fase líquida. A diminuição da concentração de proteína era esperada com sua transferência da fase líquida para a fase sólida. A diminuição de sal, no entanto, era inesperado e, inicialmente, levou à hipótese da cristalização do sal juntamente à cristalização de aprotinina. Esta suposição, no entanto, foi descartada através do teste com IZIT, uma vez que, todos os cristais adquiriram coloração azul com a adição do corante indicando que estes eram constituídos de proteína.

A hipótese remanescente era então a de que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ interagiu com as moléculas de aprotinina durante o crescimento dos cristais, participando na composição destes. O fenômeno em que duas moléculas participam na composição de um cristal em crescimento é referido como co-cristalização.

A co-cristalização de proteína e sal não se apresenta como alvo nos estudos de cristalização de proteínas relatados na literatura, embora seja mencionada a presença de íons de sais durante o refinamento da estrutura cristalina. Em observações feitas por Hamiaux *et al.* (2000) sobre o refinamento dos cristais de aprotinina formados na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ identificou-se a presença de decâmeros de proteína intermediados por íons sulfato. Hamiaux *et*

al. (2000) observaram que na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em altas concentrações, a aprotinina apresentava tendência a formação de decâmeros em solução, estando esses decâmeros presentes nos cristais, onde foram identificados cinco íons sulfato localizados exatamente na interface entre dois pentâmeros.

A interação de sais e proteínas é típica, especialmente em soluções com alta concentração protéica. Essa interação, entretanto, é preferencialmente observada com sais caotrópicos, sendo que, sais não-caotrópicos, como o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aqui utilizado, interagem preferencialmente com a água, favorecendo o “salting-out” e sendo, por esta razão, utilizados na cristalização de proteínas (Scopes, 1994). Por outro lado, um recente estudo sugeriu que 37% de um grupo de proteínas cristalizadas na presença de íons sulfato e fosfato apresentavam íons do respectivo sal nas interfaces dos cristais (Yer *et al.*, 2000).

A presença de íons de sais é muitas vezes subentendida como parte da composição dos canais de solvente remanescente na estrutura do cristal, não tendo necessariamente desempenhado papel significativo na cristalização. Existem, entretanto, diferentes pontos de vista sendo que alguns estudos indicam que íons de sais são essenciais na formação da estrutura dos cristais de proteínas. Yer *et al.*, 2000, por exemplo, sugerem que cristais de proteínas em geral apresentam sítios de interações moleculares com íons de sal. Esses estudos baseiam-se em resultados estatísticos e a falta de evidências concretas não permitem uma comprovação dessa suposição. Certamente, a análise de mapas de densidade eletrônica obtidos através de difração de raios-X poderiam contribuir na identificação de íons de sal na estrutura do cristal. Mas o fato é que na grande maioria dos casos, durante a resolução das estruturas é muito difícil diferenciar moléculas de água e íons de sal (Yer *et al.*, 2000).

De forma semelhante aos fatos aqui observados, no trabalho realizado por Elgersma *et al.* (1992), é relatada a observação da diminuição na concentração de íons Cl^- durante a cristalização de lisozima, sendo essa diminuição concomitante com o crescimento dos cristais. Os autores relatam as razões entre íons Cl^- por molécula de lisozima, da ordem de 10 ± 6 a 5°C e 4 ± 3 a 35°C .

Baseadas em medidas de proteína e sal durante etapa de cristalização de aprotinina neste estudo, estimou-se a razão entre as quantidades de proteína e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ consumidas a partir da fase líquida. Duas gotas, A e B, contendo 50 e 30 mg/ml de aprotinina, respectivamente, e 1,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram depositadas sobre reservatórios contendo 2,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os perfis das concentrações de aprotinina e sal em ambas as gotas durante etapa de evaporação é apresentado juntamente à curva de solubilidade na Figura 4.15. A gota A, com maior concentração inicial de proteína atingiu uma maior supersaturação durante o curso da evaporação.

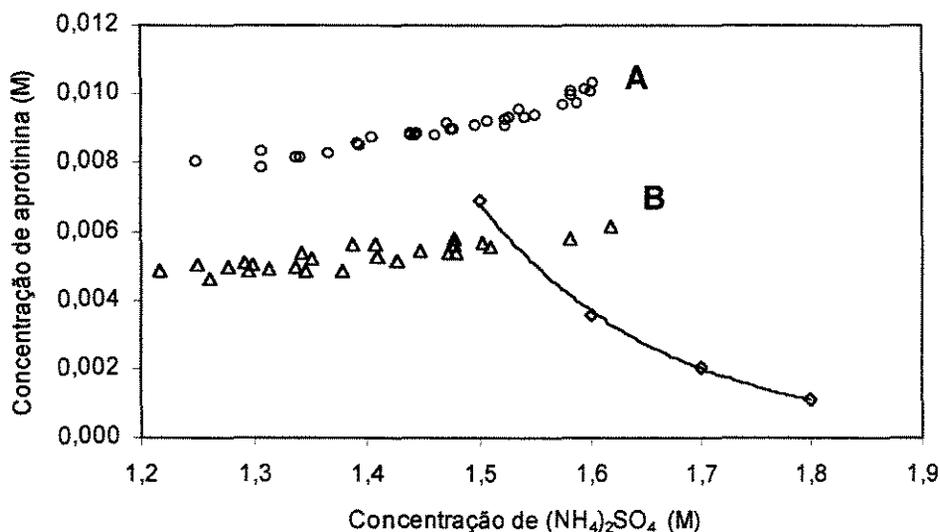


Figura 4.15. Estágio de evaporação a 24 °C de duas gotas A e B contendo inicialmente 50 e 30 mg/ml de proteína, respectivamente, e 1,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ambas as gotas foram suspensas sobre reservatórios contendo 2,2 M de sal. Gota e reservatório foram tamponados com solução de acetato de sódio 50 mM pH 4,5.

O decréscimo das concentrações em ambas as gotas durante a etapa de cristalização é apresentada na Figura 4.16 onde se observa que o decréscimo na concentração de proteína foi linearmente proporcional ao decréscimo da concentração de sal para ambas as gotas, A e B. A razão dos decréscimos, entretanto, foi diferente para cada gota: $6,15 \times 10^{-3}$ para a gota A e $3,80 \times 10^{-3}$

para a gota B. Uma possível causa para as razões variarem de uma gota para outra é a proporção de proteína e sal disponíveis na solução: quanto maior a proporção de proteína em relação ao sal, maior foi a razão entre número de mols de proteína e de sal deixando a fase líquida e agregando ao cristal.

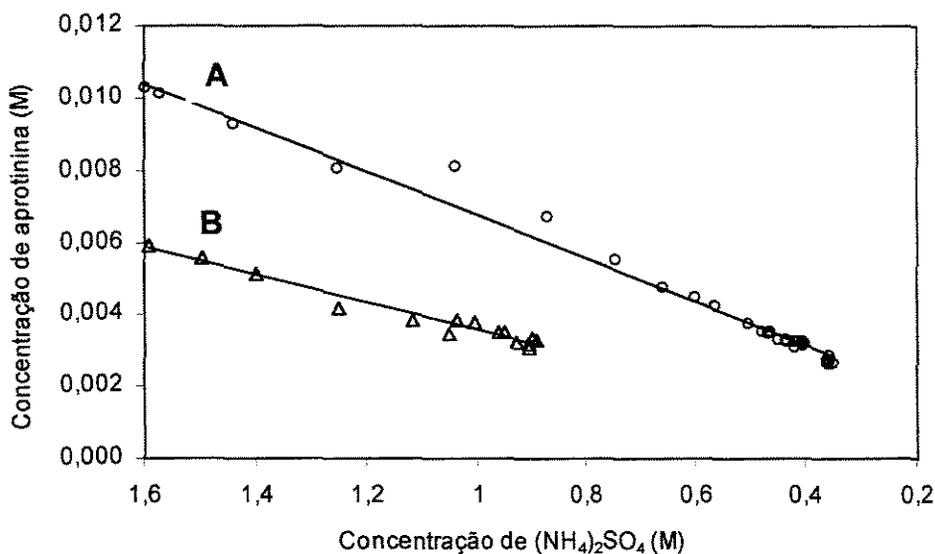


Figura 4.16: Decréscimo da concentração de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na gota durante etapa de cristalização. Coeficientes angulares: $6,15 \times 10^{-3}$ moles de aprotinina/moles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a gota A (correlação $R^2 = 0,995$) e $3,80 \times 10^{-3}$ moles de aprotinina/moles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a gota B (correlação $R^2=0,986$).

Através do inverso dos coeficientes determinados, estimou-se as razões entre os números de mols de sal por mols de proteína presentes nos cristais, que foram 162 e 263 moles de sal por mol de aprotinina, nas gotas A e B, respectivamente. Comparando com as observações de Elgersma *et al.* (1992) e de Hamiaux *et al.* (2000), esses valores apresentam-se na ordem de dezenas de vezes maior. Uma hipótese é de que nem todo o sal que deixou o seio da fase líquida tenha sido convertido à fase sólida. Supõe-se que parte do sal apenas migrou para a proximidade dos cristais formando uma camada com alta

concentração de sal, sendo esta variável de acordo com o tamanho dos cristais e quantidade de canais de solvente no interior dos cristais.

4.2.7 Efeito da taxa de evaporação na cristalização de aprotinina e sua aplicação no controle da supersaturação

A taxa de evaporação é um parâmetro de grande impacto na cristalização de proteínas pois ela tem efeito duplo sobre a supersaturação. A evaporação eleva a concentração de não apenas proteína, mas também do sal, agente redutor de solubilidade. Neste estudo, avaliou-se inicialmente o efeito da aplicação de diferentes taxas de evaporação sobre a cristalização de aprotinina e a seguir demonstrou-se a possibilidade de controle da supersaturação através da taxa de evaporação. Os experimentos foram conduzidos em gotas suspensas, onde, as taxas de evaporação eram controladas através de diferenças de força iônica entre a gota e o reservatório.

Nos estudos de avaliação do efeito de diferentes taxas de evaporação, duas gotas A e B de uma solução 14 mg/ml de aprotinina e 1,4 M de NaCl em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5 foram suspensas sobre reservatórios contendo, respectivamente, 3,0 e 2,6 M de NaCl no mesmo tampão. Ambas as gotas foram monitoradas através de espectroscopia Raman.

A gota A, submetida a uma maior diferença de pressão de vapor, apresentou maior taxa de evaporação e, conseqüentemente, maior taxa de aumento de concentração como podemos observar no perfil de concentração na Figura 4.17. Monitorou-se apenas a variação da concentração protéica, pois NaCl não apresenta bandas Raman.

Para determinação do perfil de concentrações de proteína *versus* sal (Figura 4.18) estimou-se as concentrações de NaCl a partir da taxa de variação da concentração de proteína: através dessa se conhecia a taxa de evaporação usada para estimar a taxa de concentração de NaCl.

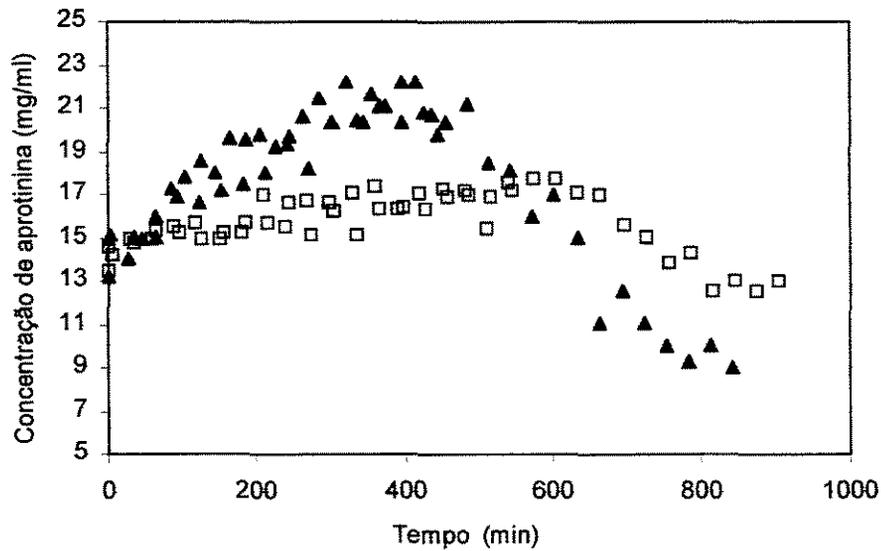


Figura 4.17. Perfil de concentrações no monitoramento de cristalização em gota suspensa de aptrotinina na presença de NaCl a 24 °C. Solução tamponada em acetato de sódio 50 mM a pH 4,5. Concentração de sal no reservatório: 3,0 M na gota A (▲) e 2,6 M na gota B (□).

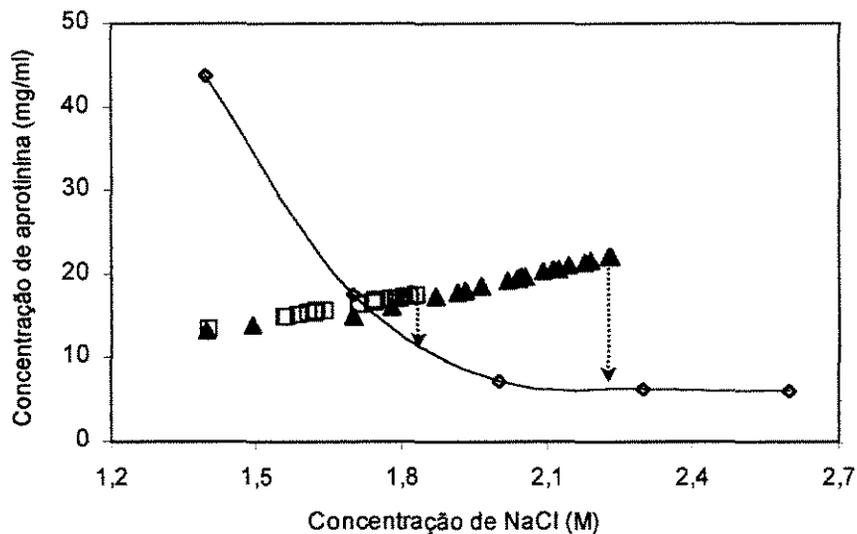


Figura 4.18. Diagrama de solubilidade no monitoramento de supersaturação de aptrotinina durante cristalização em gota suspensa na presença de NaCl a 24 °C. Solução tamponada em acetato de sódio 50 mM pH 4,5. Concentração de sal no reservatório: 3,0 M na gota A (▲) e 2,6 M na gota B (□).

As setas na Figura 4.18 representam as etapas de crescimento dos cristais, com conseqüente diminuição na concentração protéica nas gotas. A seta indica a concentração de sal em que foi detectado o início da cristalização e não é representativa quanto à concentração de sal durante a etapa de crescimento, como mencionado anteriormente para a Figura 4.14.

No diagrama de solubilidade, observa-se que a gota A atingiu maior supersaturação que a gota B e, assim, a gota A gerou uma população maior de cristais que a gota B, como esperado (Figuras 4.19 e 4.20).

Quanto aos tamanhos dos cristais, poderia se esperar que os cristais na gota B, compondo uma população menor, pudessem atingir dimensões maiores. Isso, no entanto, não ocorreu: os cristais gerados nas gotas A e B apresentaram dimensões semelhantes, cerca de 200 μm . O crescimento dos cristais na gota B foi provavelmente interrompido devido o esgotamento de soluto na fase líquida. A gota B, como visto no diagrama de solubilidade (Figura 4.18), atingiu uma supersaturação máxima próxima do limite de solubilidade o que significa que havia uma quantidade pequena de soluto disponível na solução para o crescimento dos cristais antes de se atingir o limite de solubilidade. Assim, com a formação e crescimento dos cristais o soluto se esgotou rapidamente: a baixa supersaturação propiciou um crescimento limitado.

Estes resultados destacam a necessidade de controle da supersaturação, mantendo-a em um nível suficientemente baixo para evitar nucleação excessiva, mas alto o suficiente para propiciar o crescimento dos cristais.

O controle da supersaturação de proteínas através de taxas de evaporação foi alvo de alguns estudos, como nos trabalhos realizados por Wilson *et al.* (1991) e Wilson e Suddath (1992) que desenvolveram um sistema visando o controle da evaporação através de passagem controlada de corrente de N_2 ao redor da gota. Nesse sistema, a gota era monitorada através da condutividade medida por pequenos eletrodos de platina calibrados com gotas de conhecidas concentrações de sal.

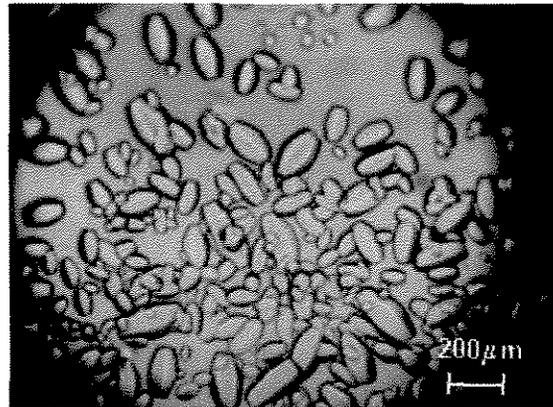


Figura 4.19: Cristais de aprotinina obtidos na gota A pelo método da gota suspensa a 24 °C na presença de NaCl. Condição inicial: 14 mg/ml de aprotinina e 1,4 M de NaCl na gota e 3,0 M de NaCl no reservatório. Solução acetato de sódio 50 mM a pH 4,5.

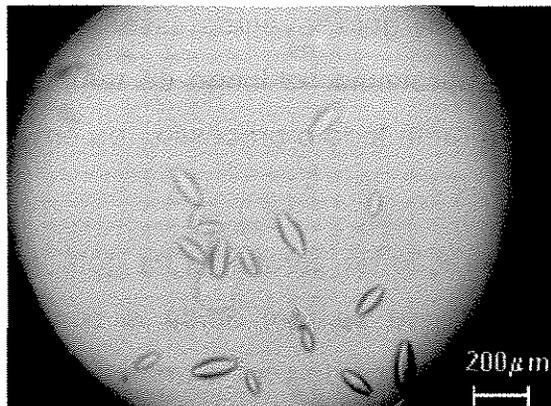


Figura 4.20: Cristais de aprotinina obtidos na gota B pelo método da gota suspensa a 24 °C na presença de NaCl. Condição inicial: 14 mg/ml de aprotinina e 1,4 M de NaCl na gota e 2,0 M de NaCl no reservatório. Solução acetato de sódio 50 mM pH 4,5.

Através desse sistema os autores demonstraram ser possível o controle da supersaturação através da taxa de evaporação evitando a nucleação excessiva e favorecendo a obtenção de cristais maiores.

No presente trabalho demonstrou-se também o controle da evaporação, realizada através de manipulação da concentração de sal no reservatório. Através do aumento da concentração do sal no reservatório proporcionava-se a evaporação da gota elevando a supersaturação e, através da diminuição da concentração de sal no reservatório era possível interromper a evaporação. A descrição e os resultados destes estudos são discutidos a seguir:

Uma gota com 14 mg/ml de aprotinina e 1,4 M de NaCl foi depositada sobre uma lamínula de vidro siliconizada que foi, a seguir, invertida e selada na extremidade de um reservatório contendo 10 ml de solução 3,0 M de NaCl a 24°C. Ambas as soluções, da gota e do reservatório, foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5. O reservatório era equipado com canais para entrada e saída de solução permitindo a troca do líquido no seu interior sem remoção da lamínula, evitando distúrbios ao sistema.

A modificação da solução do reservatório era realizada de acordo com eventos ocorrentes na solução da gota, eventos esses observados a partir das medidas de concentração de aprotinina ao longo do tempo, obtidas através de espectros Raman coletados durante todo o processo, ou em termos do diagrama de solubilidade.

A variação da concentração de aprotinina na gota ao longo do tempo é apresentada na Figura 4.21, onde se tem ainda a concentração de sal no reservatório que foi modificada de acordo com o andamento da cristalização. A variação da concentração em termos do diagrama de solubilidade é apresentada na Figura 4.22. A observação simultânea de ambas as Figuras em cada etapa do processo permite uma melhor compreensão do processo global.

No primeiro estágio do processo, com uma concentração de 3,0 M de sal no reservatório, a concentração de aprotinina foi aumentada gradativamente em consequência de evaporação (estágio A, Figura 4.21). A duração deste estágio foi de 600 minutos. A supersaturação da gota ao final desse estágio corresponde ao

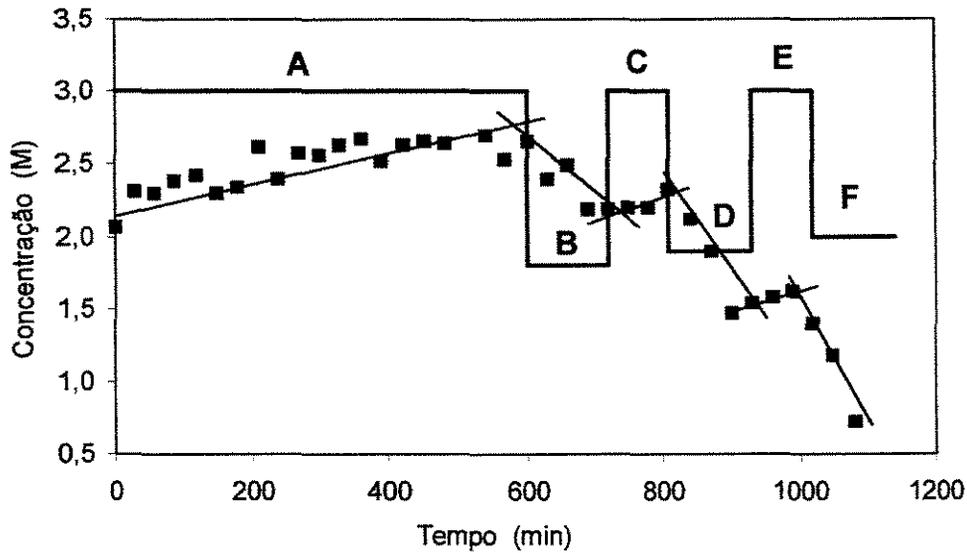


Figura 4.21. Perfil de concentrações de aprotinina na gota ($\blacksquare 10^{+3}$) e de NaCl no reservatório (—) durante cristalização com evaporação controlada. Gota e reservatório foram tamponados com acetato de sódio 50 mM pH 4,5. Experimento conduzido a 24 °C.

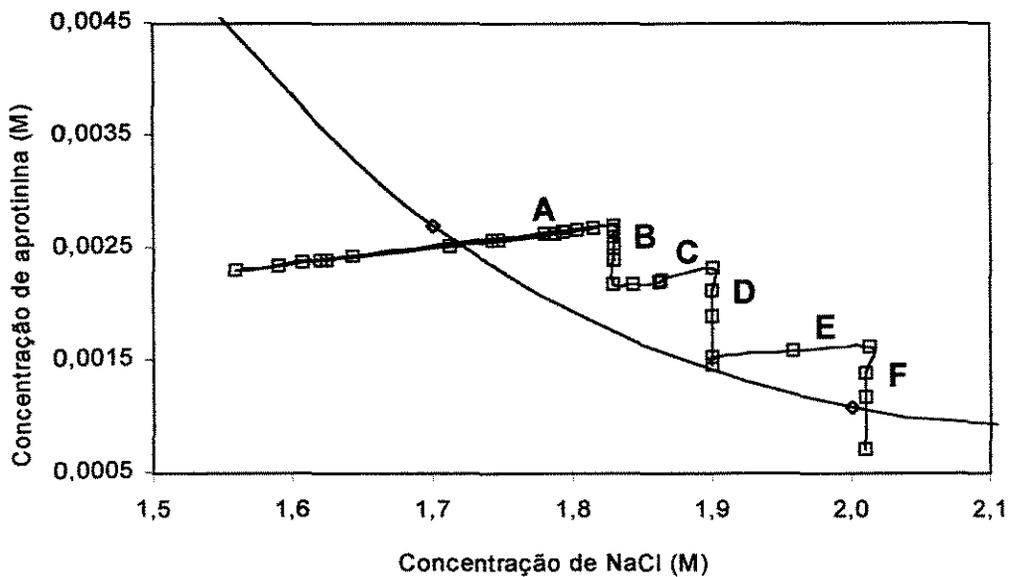


Figura 4.22: Diagrama de solubilidade: cristalização em gota suspensa de aprotinina com controle de supersaturação. Condição inicial da gota: 14 mg/ml de aprotinina e 1,4 M de NaCl em acetato de sódio 50 mM a pH 4,5. Solução no reservatório variante entre 1,8 e 3,0 M de NaCl.

final do segmento A do perfil apresentado na Figura 4.22. Neste instante, a concentração de NaCl na solução do reservatório foi reduzida de 3,0 para 1,8 M, que correspondia à concentração estimada de sal (em função da concentração de aprotinina) na gota naquele momento. Estabelecendo-se, assim, uma mesma concentração de sal na gota e reservatório, gerava-se um equilíbrio da pressão de vapor sobre gota e reservatório interrompendo a evaporação a partir da gota.

Com a evaporação interrompida, cessava-se o aumento da supersaturação, favorecendo assim o crescimento dos cristais existentes e evitando formação de novos núcleos. Na medida em que os cristais cresciam, a concentração na fase líquida diminuía (estágio B, Figura 4.21) e a solução da gota era desupersaturada se aproximando do limite de solubilidade (segmento B, Figura 4.22). Nesse instante, era estabelecido um equilíbrio na gota e o crescimento era interrompido.

Para favorecer a continuidade do processo, a solução do reservatório foi, mais uma vez, substituída, restabelecendo-se a concentração de sal em 3,0 M (estágio C, Figura 4.21). Com o aumento da concentração de sal, a evaporação foi mais uma vez estimulada, elevando-se a concentração de proteína na gota. Dessa forma a solução da gota foi novamente supersaturada (segmento C, Figura 4.22). Ao final desse estágio, substituiu-se novamente a solução do reservatório, equilibrando a concentração de sal com a solução da gota, que foi estimada em 1,9 M de NaCl (estágio D, Figura 4.21). Cessando a evaporação permitiu-se o crescimento adicional dos cristais existentes até que a solução fosse novamente esgotada pela desupersaturação (segmento D, Figura 4.22).

Mais uma vez, estimulou-se a evaporação através de aumento de sal no reservatório aumentando-se levemente a concentração na gota (estágio E, Figura 4.21). No último estágio, F, a concentração de sal no reservatório foi reduzida para 2,0 M favorecendo o crescimento dos cristais que atingiram dimensões de 600 μm (Figura 4.23).

Estes cristais apresentaram tamanhos três vezes maiores em relação aos cristais obtidos anteriormente sem controle da supersaturação (Figuras 4.19 e

4.20). Através desse resultado demonstrou-se o sucesso da metodologia de controle da supersaturação, aqui apresentada.

Com esses dados completou-se com sucesso os estudos com a espectroscopia Raman, tendo sido demonstrada sua aplicabilidade na predição simultânea de proteína e agente cristalizante, na determinação de solubilidade, no monitoramento *in situ* e em tempo real da supersaturação de aprotinina e no controle da sua cristalização otimizando o crescimento dos cristais.

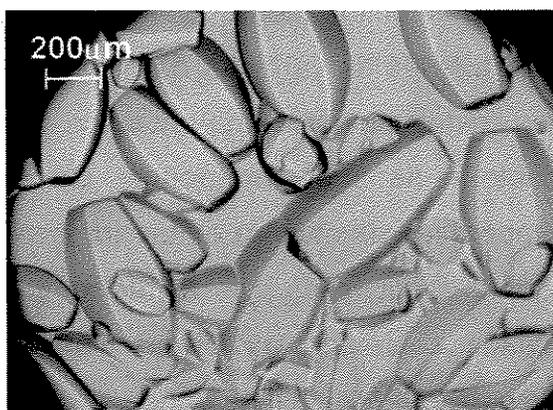


Figura 4.23: Cristais de aprotinina obtidos pelo método da gota suspensa a 24 °C na presença de NaCl com controle de supersaturação. Condição inicial na gota: 14 mg/ml de aprotinina e 1,4 M de NaCl em acetato de sódio 50 mM a pH 4,5. Soluções do reservatório variante entre 1,8 e 2,0 M.

4.3 CONCLUSÕES

A espectroscopia Raman, apesar de não ser tradicionalmente utilizada para quantificações, foi utilizada com sucesso na medidas *in situ* de concentrações de aprotinina assim como de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Um modelo de calibração PLS desenvolvido a partir de soluções padrão contendo misturas de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ possibilitou medidas simultâneas destes componentes com relativa

precisão. Os erros padrão médios foram de 0,5 mg/ml de aprotinina e 0,03 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ determinados através da validação cruzada “leave one out”. O modelo de calibração foi empregado com sucesso no monitoramento da cristalização pelo método da gota suspensa e na determinação de solubilidade de aprotinina na presença de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de gotas de 10 μl de solução. A grande vantagem da metodologia Raman neste trabalho foi a possibilidade de medidas não-invasivas, permitindo monitoramento a partir da gota suspensa, além de evitar a adsorção protéica na sonda, uma vez que não se tinha contato desta com a solução.

A possibilidade de monitoramento *in situ* permitiu o controle da supersaturação, realizado através de variação da difusão de vapor, propiciando aumento do tamanho dos cristais de aprotinina em cerca de três vezes em relação à cristalização sem controle de supersaturação. O controle baseou-se em manipular a taxa de evaporação de modo a evitar supersaturação elevada, e ao mesmo tempo, evitar que o crescimento fosse interrompido pelo equilíbrio. A evaporação era controlada de modo a apenas compensar o consumo de moléculas da solução devido ao crescimento.

O monitoramento simultâneo da concentração de proteína e sal trouxe evidências da co-cristalização de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Embora a co-cristalização não seja tipicamente objeto de estudos de cristalização de proteínas, Elgersma *et al.* (1992) relata fato semelhante ao observado neste trabalho. A razão entre as quantidades de sal e proteína deixando a fase líquida devido suposta co-cristalização não é bem compreendida. Elgersma e colaboradores relataram a razão de algumas unidades de moléculas de NaCl por molécula de lisozima, enquanto que neste trabalho foram estimadas centenas de unidades de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por molécula de aprotinina.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foram avaliadas metodologias de monitoramento de supersaturação de soluções de proteínas através de duas diferentes técnicas, espectroscopia Raman e infravermelho, que embora se baseiem em diferentes fundamentos são complementares entre si.

Nos estudos utilizando infravermelho, a célula de cristalização adaptada ao elemento ATR de Ge apresentou sucesso no monitoramento *in situ* de soluções, com medidas ao longo do tempo bastante precisas, assim como na evaporação para criação de supersaturação. Entretanto, na presença de cristais, houve influência dos mesmos sobre o monitoramento da solução, causado pela decantação e suposta interação dos cristais de lisozima e a superfície de Ge. Quanto à sonda ATR de ZnSe, esta, apresentou vantagem de não sofrer influência significativa da temperatura sobre os espectros de soluções de lisozima acima de 30 mg/ml gerando possibilidade de o modelo de calibração ser aplicado no controle da supersaturação por temperatura. Essa sonda, entretanto, apresentou deficiência no monitoramento de soluções de lisozima e tripsina devido à provável adsorção protéica no elemento ATR. Dessa forma, apesar do potencial da espectroscopia infravermelho, verificou-se que a tendência de proteínas interagirem com diferentes materiais pode ser um problema crítico no monitoramento *in situ* de suas soluções.

A espectroscopia Raman, apesar de não ser tradicionalmente utilizada para quantificações, foi utilizada com sucesso na obtenção simultânea de medidas de concentrações de aprotinina e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, através de uma calibração PLS, cujo erro padrão médio foi de 0,5 mg/ml de aprotinina e 0,03 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ determinados através da validação cruzada "leave one out". No monitoramento da cristalização pelo método da gota suspensa determinou-se a solubilidade de

aprotinina na presença de NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de gotas de 10 μl de solução e demonstrou-se a possibilidade de controle da supersaturação, através de variação da difusão de vapor, propiciando aumento do tamanho dos cristais de aprotinina em cerca de três vezes em relação à cristalização sem controle de supersaturação. Nestes estudos foram obtidas evidências da co-cristalização de aprotinina e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A razão entre moléculas de sal por molécula protéica deixando a fase líquida, foi estimada em centenas moléculas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por molécula de aprotinina. Em comparação à espectroscopia infravermelho, a técnica Raman, nesse trabalho, apresentou melhor desempenho, visto os problemas de adsorção protéica nos sensores ATR de Ge e ZnSe, afetando as medidas a partir da fase líquida dos meios de cristalização. Assim, a grande vantagem da metodologia Raman no monitoramento de soluções de proteína, neste trabalho, foi a possibilidade de medidas não-invasivas.

Acredita-se que apesar da espectroscopia infravermelho não ter sido adequada no presente trabalho, ela tem potencial de aplicação no monitoramento de supersaturação de outras moléculas, inclusive proteínas.

CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Neste trabalho demonstrou-se o sucesso da espectroscopia Raman no monitoramento de supersaturação de aprotinina, sendo a possibilidade de medidas em modo não-invasivo uma das suas principais vantagens na obtenção de medidas a partir de soluções de proteínas, considerando a natureza adsorptiva destas moléculas que é um problema crítico em métodos invasivos.

Para o caso particular da cristalização de aprotinina na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seria interessante explorar a vantagem de ambas as moléculas serem ativas na espectroscopia Raman, para estudar com mais profundidade a co-cristalização dessas espécies, avaliando como as características do meio afetam a incorporação do sal ao cristal de aprotinina e quais os efeitos do sal sobre o teor de água, a pureza, o tamanho médio, as propriedades mecânicas do cristal, ou ainda a atividade biológica da proteína cristalizada.

Uma vez que a espectroscopia Raman não é tradicionalmente utilizada em processos químicos, como a espectroscopia infravermelho, ela pode não ser uma alternativa facilmente viabilizada, isto é, espectrofotômetros Raman não são tão disponíveis como espectrofotômetros infravermelho. Assim, sugere-se também estudar a aplicação de ATR-FTIR no monitoramento de supersaturação em diferentes meios de cristalização onde se minimize a adsorção protéica no elemento ATR. Esses estudos poderiam ser realizados através de avaliação de soluções com diferentes tampões, pH, força iônica, ou outras modificações visando a não-interação da proteína com o elemento ATR. Considerando a possibilidade de adsorção protéica por ligação de coordenação com o Zn^{2+} sugere-se a adição de imidazol no meio de cristalização ou então um pré-tratamento da superfície da sonda com solução de EDTA. Salienta-se que nestes

estudos, deve-se atentar ao mesmo tempo para a não-adsorção da proteína e também para a garantia da cristalização da proteína.

Além de estudo das condições do meio, uma outra possibilidade seria o tratamento da superfície do elemento ATR através da formação de uma película de determinado material, talvez um polímero, que fosse ao mesmo tempo insolúvel e inerte no meio de cristalização e fraco absorvedor da radiação infravermelho. Uma dificuldade da obtenção dessa película seria garantir a reprodutibilidade de sua espessura, além desta ter de ser pequena o suficiente para permitir que a onda evanescente pudesse alcançar o meio de cristalização.

Um estudo, de aplicação mais geral, seria a avaliação e seleção de diferentes elementos ATR constituídos por materiais que não adsorvam proteínas.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.J. **Chemometrics in analytical spectroscopy.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995.
- Ansari, R.R.; Suh, K.I.; Arabshahi, A; Wilson, W.W.; Bray, T.L. e DeLucas, L.J. A fiber optic probe for monitoring protein aggregation, nucleation and crystallization. **Journal of Crystal Growth**, 168, 216-226, 1996.
- Ârêas, E.P.G. e Kawano, Y. Aplicações de técnicas espectroscópicas vibracionais ao estudo conformacional de proteínas. **Química Nova**, 14, 1, 31-43, 1991.
- Ataka, M. e Tanaka, S. The growth of large single crystals of lysozyme. **Biopolymers**, 25, 337-350, 1986.
- Ataka, M. e Asai, M. Systematic studies on the crystallization of lysosyme, determination and use of phase diagrams. **Journal of Crystal Growth**, 90, 86-93, 1988.
- Azzoni, A.R. Plantas como biorreatores: recuperação e purificação de aprotinina recombinante a partir de semente de milho transgênico. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2002.
- Azzoni, A.R. e Miranda, E.A. Recovery of aprotinin from insulin industrial process effluent by affinity adsorption, **Bioprocess Engineering**, 21, 6, 553-360, 1999.
- Barthel, T. e Kula, M.R. Rapid purification of Des Pro (2)-Val15-Leu17-aprotinin from the culture broth of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, 42, 1331-1336 1995.

- Baufreton, C.; Velthuis, H.T.; Jansen, P.G.M.; Besnerais, P.L.; Wildvur, C.H.R. e Loisançe, D.Y. Reduction of blood activation in patients receiving aprotinin during cardiopulmonary bypass for coronary artery surgery. **ASAIO Journal**, 42, 417-423, 1996.
- Bennema, P. Theory of growth and morphology applied to organic crystals, possible application to protein crystals. **Journal of Crystal Growth**, 122, 110-119, 1992.
- Bergfords, T. **Protein Crystallization Techniques, Strategies, and Tips**. IUL Biotechnology series, International University Line, 1998.
- Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E.: The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, 28, 235-242 (2000). <http://www.rcsb.org/pdb/> - acesso 15-04-2003.
- Bernardo, A. Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a cristalização de proteínas a partir da dissolução e do tempo de indução. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2002.
- Berndt, K.D.; Guntert, P.; Orbons, L.P.M. e Wuthrich, K. Determination of a high-quality nuclear magnetic resonance solution structure of the bovine pancreatic trypsin inhibitor and comparison with three crystal structures. **Journal of Molecular Biology**, 227, 757-775, 1992.
- Boistelle, R. e Astier, J.P. Crystallization mechanisms in solution. **Journal of Crystal Growth**, 90, 14-30, 1988.
- Boistelle, R. e Astier, J.P. Crystallization mechanisms in solution, **Journal of Crystal Growth**, 90, 14-30, 1988.
- Bonneté, F.; Vidal, O.; Robert, M.C. e Tardieu, A. Gel techniques and small angle x-ray scattering to follow protein crystal growth. **Journal of Crystal Growth**, 168, 185-191, 1996.

- Boyer, M.; Roy, M.O. e Jullien, M. Dynamic light scattering study of precrystallizing ribonuclease solutions. **Journal of Crystal Growth**, 167, 212-220, 1996.
- Brame, Jr. E.G. e Grosseli, J.G. **Infrared and Raman Spectroscopy**, Pratical Spectroscopy Series, v. 1, Marcel Dekker Inc, USA, 1977.
- Buckel, W; Dorn, Ulrike e Semmler, Roswitha. Glutaconate CoA-Transferase from Acidaminococcus fermentans. **European Journal of Biochemistry**, 118, 315-321, 1981.
- Carrera, A.; Fernández, P.; Garcia, D.V.S.; De La Quintana, B. e Martínez, M.V. Propriedades farmacológicas de la aprotinina y empleo terapéutico en cirugía cardíaca. **Revista Espanhola Anestesiología y Reanimación**, 40, 292-299, 1993.
- Chang, R. **Basic Principles of Spectroscopy**. McGraw-Hill Kogakusha, Japão, 1971.
- Chayen, N. e Saridakis, E. Is lysozyme really the ideal model protein? **Journal of Crystal Growth**, 232, 262-264, 2001.
- Coleman, P.B. Practical sampling techniques for infrared analysis. CRC Press, EUA 1993
- DeMattei, R.C. e Feigelson, R.S. Controlling nucleation in protein solutions. **Journal of Crystal Growth**, 122, 21-30, 1992.
- Drenth, J. e Haas, C. Protein crystals and their stability. **Journal of Crystal Growth**, 122, 107-109, 1992.
- Ducruix, A. e Giegé, R. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: a Pratical Aproach. IRL Press, Oxford, 1992.
- Ducruix, A.; Guilloteau, J.P.; Kautt, M.R e Tardieu, A. Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis. **Journal of Crystal Growth**, 168, 28-39, 1996.

- Dunuwila, D.D. e Berglund, K.A. ATR FTIR spectroscopy for *in situ* measurement of supersaturation. **Journal of Crystal Growth**, 179, 185-193, 1997.
- Durbin, S.D. e Feher, G. Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization. **Journal of Crystal Growth**, 76, 583-592, 1986.
- Elankovan, P. e Berglund, K.A. Technique for obtaining Raman spectra of contact nuclei *in situ*. **Applied Spectroscopy**, 40, 5, 712-714, 1986.
- Elgersma, A.V.; Ataka, M. e Katsura, T. Kinetic studies on the growth of three crystal forms of lysozyme based on the measurement of protein and Cl⁻ concentration changes. **Journal of Crystal Growth**, 122, 31-40, 1992.
- Ewing, G.W. **Analytical Instrumentation Handbook**. Marcel Dekker, Inc, EUA, 1990.
- Feng, L. e Berglund, K.A. ATR-FTIR for determining optimal cooling curves for batch crystallization of succinic acid. **Crystal Growth & Design**, 2, 5, 449-452, 2002.
- Ferraro, J. R. e Nakamoto, K. **Introductory Raman Spectroscopy**. Academic Press, Inc. , EUA, 1994.
- Ferreira, M.M; Antunes, A.M.; Melgo, M.S. e Volpe, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 22, 5, 1-21, 1999.
- Févotte, G. New perspectives for the on-line monitoring of pharmaceutical crystallization process using *in situ* infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, 241, 263-278, 2002.
- Fiddis, R.W.; Longman, R.A. e Calvert, P.D. Crystal-growth kinetics of globular proteins- lysozyme and insulin. **Journal of Chemical Society Faraday Transactions I**, 75, 2753, 1979.
- Fiorucci, L.; Erba, F.; Falasca, L.; Dini, L. e Ascoli, F. Localization and interaction of bovine pancreatic trypsin inhibitor and trypsinase in the granules of bovine

- mast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1243, 407-413, 1995.
- Freifelder, D. **Physical Biochemistry – Applications to Biochemistry and Molecular Biology – 2º Ed.** W.H. Freenan and Company , USA, 1982.
- Geladi, P e Kowalski, B.R. Partial least–squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, 185, 1-17, 1986.
- Genaro, A.C.B; Tamagawa, R.E., Azzoni, A.R; Bueno, S.M e Miranda, E.A. Recovery and purification of aprotinin from industrial insulin-processing effluent by immobilized chymotrypsin and negative IMAC chromatographies. **Process Biochemistry**, 37, 12, 1413-1420, 2002.
- Giulietti, M.; Seckler, M.M.; Derenzo, S.; Ré, M.I. e Cekinski, E. Industrial Crystallization and precipitation from solutions: state of the technique. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 18, 4, 423-440, 2001.
- Govardhan, C.P. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. **Current Opinion in Biotechnology**, 10, 331-335, 1999.
- Grimbergen, R.F.P; Boek, E.S.; Meekes, H. e Bennema, P. Explanation for the supersaturation dependence of the morphology of lysozyme crystals. **Journal of Crystal Growth**, 207, 112-121, 1999.
- Grön, H.; Borissova, A. e Roberts, K. In-process ATR-FTIR spectroscopy for closed-loop supersaturation control of a batch crystallizer producing monosodium glutamate crystals of defined size. **Industrial Chemistry Research**, 42, 198-206, 2003.
- Guilloteau, J-P.; Riès-Kautt, M.M e Ducruix, A.F. Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts. **Journal of Crystal Growth**, 122, 223-230, 1992.
- Hamiaux, C.; Pérez, J.; Prangé, T.; Veessler, S.; Riès-Kautt and Vachette, P. The BPTI decamer observed in acidic pH crystal forms pre-exists as a stable species in solution. **Journal of Molecular Biology**, 297, 697-712, 2000.

- Howard, S.B.; Twigg, P.J.; Baird, J.K. e Meehan, E.J. The solubility of hen egg-white lysozyme. **Journal of Crystal Growth**, 90, 94-104, 1988.
- Jacobsen, C.; Garside, J. e Hoare, M. Nucleation and growth of microbial lipase from clarified concentrated fermentation broths. **Biotechnology and Bioengineering**, 57, 6, 66-675, 1998.
- Judge, R.A.; Jacobs, R.S.; Frazier, T.; Snell, E.H. e Pusey, M.L. The effect of temperature and solution pH on the nucleation of tetragonal lysozyme crystals. **Biophysical Journal**, 77, 1585-1593, 1999.
- Judge, R.A.; Johns, M.R. e White, E.T. Protein purification by bulk crystallization—the recovery of ovalbumin. **Biotechnology and Bioengineering**, 48, 4, 316-323, 1995.
- Judge, R.A.; Johns, M.R.; White, E.T. The effect of protein impurities on lysozyme crystal growth. **Biotechnology and Bioengineering**, 56, 776-785, 1999.
- Kadima, W.; McPherson, A.; Dunn, M.F. e Journak, F. Precrystallization aggregation of insulin by dynamic light scattering. **Journal of Crystal Growth**, 110, 188-194, 1991.
- Kam Z.; Shore, H.B. e Feher, G. On the crystallization of proteins. **Journal of Molecular Biology**, 123, 539-555, 1978.
- Kassel, B. Bovine-kallikrein inhibitor (Kunitz inhibitor, basic pancreatic trypsin inhibitor, polyvalent inhibitor from bovine organs). **Methods in Enzimology**, 19, 844-852, 1970.
- Kenneth, B.R.; Pell, R.J e Seasholtz, M.B. **Chemometrics: a practical guide**. John Wiley, Nova York, 1998.
- Kitazono, A.; Yoshimoto, T. e Tsuru, D. Cloning, sequencing, and high expression of the proline iminopeptidase gene from *Bacillus coagulans*. **Journal of Bacteriology**, Dec, 7919-7925, 1992.
- Kunitz, M. e Northrop, J.H. Isolation from beef pancreas of crystalline

- trypsinogen, trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. **Journal of General Physiology**, 19, 991-100, 1935.
- Lafont, S.; Veesler, S.; Astier, J. P. e Boistelle, R. Comparison of solubilities and molecular interactions of BPTI molecules giving different polymorphs. **Journal of Crystal Growth**, 173, 132-140, 1997.
- Lafont, S.; Veesler, S.; Astier, J. P. e Boistelle, R. Solubility and prenucleation of aprotinin (BPTI) molecules in sodium chloride solutions. **Journal of Crystal Growth**, 143, 249-255, 1994.
- Lee, T.S.; Vaghjiani, J.D.; Lye, G.J. e Turner, M. K. A systematic approach to the large-scale production of protein crystals. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, 582-592, 2000.
- Lewiner, F.; Févotte, G.; Klein, J.P. e Puel, F. An online strategy to increase the average crystal size during organic batch cooling crystallization. **Industrial Engineering Chemistry Research**, 41, 1321-1328, 2002.
- Lewiner, F.; Klein, J.P.; Puel, F. e Févotte, G. On-line ATR-FTIR measurement of supersaturation during solution crystallization process. Calibration and applications on three solute/solvent systems. **Chemical Engineering Science**, 56, 6, 2069-2084, 2001.
- Littlechild, J.A. Protein crystallization: magical or logical: can we establish some general rules? **Journal of Physics D: Applied Physics**, 24, 111-118, 1991.
- Loffelmann, A. e Mersmann, A. How to measure supersaturation? **Chemical Engineering Science**, 57, 4301-4310, 2002.
- Lorenz, H.; Seehan, P. e S-Morgenstern, A. Coupling of simulated moving bed chromatography and fractional crystallization for efficient enantioseparation. **Journal of Chromatography A**, 908, 201-214, 2001.
- Lserna, J.J. **Modern Techniques in Raman Spectroscopy**. John Willery & sons, EUA, 1996.

- Mack, M.; Bendrat, K.; Zelder, O.; Eckel, E.; Linder, D. e Buckel, W. Location of the two genes encoding glutaconate coenzyme A-transferase at the beginning of the hydroxyglutarate operon in *Acidaminococcus fermentans*. **European Journal of Biochemistry**, 226, 41-51, 1994.
- Massart, D. L. **Chemometrics: a textbook**. Elsevier, Amsterdam, 1988.
- McMahon, P.M.; Cerreta, M.K. e Larson, M.A. A Constant-temperature Raman cell for the study of supersaturated aqueous solutions. **Applied Spectroscopy**, 40 (2), 282-283, 1986.
- McPherson, A. A brief history of protein crystal growth. **Journal of Crystal Growth**, 110, 1-10, 1991.
- McPherson, A. **Crystallization of Biological Macromolecules**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1999.
- McPherson, A. Crystallization of Biological Macromolecules - Handbook of Crystal Growth, v.2, DTJ Hurle, 1994.
- Mullin, J.W. **Crystallization**. Butterworth-Heinemann Ltd, 3^a edição, Londres, 1993.
- Myerson, A.S. **Handbook of Industrial Crystallization**. Butterworth-Heinemann, EUA, 1993.
- Norris, K.; Norris, F.; Bjorn, S.E.; Diers, I. e Petersen, L.C. Aprotinin and aprotinin analogues expressed in yeast. **Biological Chemistry Hope-Seyler**, 371, 37-42, 1990.
- Nývlt, J.; Hostomský, J. e Giulietti, M. **Cristalização**. Editora da UFSCar, Brasil, 2001.
- Pan, B. Fluorescent probes for monitoring and characterizing the crystallization conditions of lysozyme. **PhD Dissertation**, Michigan State University - Department of Chemical Engineering, 1995.

- Pitts, J.; Usitalo, J.M.; Mantafounis, D.; Nugent, P.G.; Quinn, D.D.; Orprayoon, P. e Penttilä, M.E. Expression and characterization of chymosin pH optima mutants produced in *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, 28, 69-83, 1993.
- Porath, J. IMAC-Immobilized metal ion affinity based chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, 7, 254-259, 1998.
- Price, W.S.; Tsuchiya, F. e Arata, Y. Time dependence of aggregation in crystallizing lysozyme solutions probed using NMR self-diffusion measurements. **Biophysical Journal**, 80, 1585-1590, 2001.
- Profir, V.M.; Furuşjő, E.; Danielsson, L-G. e Rasmuson, A.C. Study os the crystallization of mandelic acid in water using *in situ* ATR- IR spectroscopy. **Crystal Growth & Design**, 4, 273-279, 2002.
- Przybycien, M.T. Protein-protein interactions as a mean of purification. **Current Opnion in Biotechnology**, 9,2, 164-170, 1998.
- Pusey, M. e Naumann, R. Growth kinectics of tetragonal lysozyme crystals. **Journal of Crystal Growth**, 76, 593-599, 1986.
- Quereshi, A.; Lamont, J.; Burke, P.; Grace, P. e Bouchier-Hayes, D. Aprotinin: the ideal anti-coagulant? **European Journal of Vascular Surgery**, 6, 317-320, 1992.
- Riès-Kautt, M. e Ducruix, A. Crystallization of nucleic acids acids and proteins: a practical aproach. Oxford Univesity Press, EUA, 1992.
- Rosenberger, F. Inorganic and protein crystal growth – similiarities and diferences. **Journal of Crystal Growth**, 76, 618-636, 1986.
- Rosenberger, F.; Vekilov, P.G.; Muschol, M. e Thomas, B.R. Nucleation and crystallization of globular proteins - what we know and what is missing. **Journal of Crystal Growth**, 168, 1-27, 1996.
- Salari, A. e Young, R.E. Application of attenuated total reflectance FTIR

- spectroscopy to the analysis of mixtures of pharmaceutical polymorphs. **International Journal of Pharmaceutics**, 163, 156-157, 1999.
- Schrader, B. **Infrared and Raman Spectroscopy**. VCH publishers, Inc, EUA, 1995.
- Schwartz, A. M. e Berglund, K.A. Monitoring protein crystallization using vibrational spectroscopies. **PhD Dissertation**, Michigan State University - Department of Chemistry & Department of Chemical Engineering, 1999a.
- Schwartz, A.M. e Berglund, K.A. The use of Raman spectroscopy for *in situ* monitoring of lysozyme concentration during crystallization in a hanging drop. **Journal of Crystal Growth**, 203, 599-603, 1999b.
- Schwartz, A.M. e Berglund, K.A. *In situ* monitoring and control of lysozyme concentration during crystallization in a hanging drop. **Journal of Crystal Growth**, 210, 753-760, 2000.
- Scopes, R.K. **Protein purification**. Springer-Verlag, 1994.
- Shekunov, B. e York, P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery. **Journal of Crystal Growth**, 211, 122-136, 2000.
- Skrdla, P.J.; Antonucci, V.; Crocker, L.S.; Wenslow, R.M.; Wright, L. e Zhou, G. A simple quantitative polymorphic transformation under crystallization slurry conditions. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, 25, 731-739, 2001.
- Sulkowski, E. Purification of proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology**, 3, 1, 1985.
- Tamagawa, R.E.; Azzoni, A.R.; Miranda, E.A. e Vijayalakshimi, M.A. Aprotinin recovery: comparisson between biospecific and pseudobiospecific affinity adsorptions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 16, 02, 119-127, 1999.
- Thomas, E. V. A prime on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, 66, 128

15, 795-804, 1994

Tscheche, H. Semisynthetic engineering of proteinase inhibitor homologues. **Biochimica and Biophysica Acta**, 913, 97-101, 1987.

Tsujisaka, Y.; Iwai, M. e Tominaga, Y. Purification, crystallization and some properties of lipase from Geotrichum candidum Link. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, 37, 6, 1457-1464, 1973.

Veesler, S.; Lafont, S.; Marcq, S.; Astier, J. P. e Boistele, R. Prenucleation, crystal growth and polymorphism of some proteins. **Journal of Crystal Growth**, 168, 124-129, 1996.

Vijayalakshmi, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. **Trends in Biotechnology**, 7, 3, 71-76, 1989.

Walter, J. e Huber, R. Pancreatic trypsin inhibitor - a new crystal form and its analysis. **Journal of Molecular Biology**, 167, 911-917, 1983

Wilson, L.J. e Pusey, M. Determination of monomer concentrations in crystallizing lysozyme solutions. **Journal of Crystal Growth**, 122, 8-13, 1992.

Wilson, L.J. e Suddath, F.L. Control of solvent evaporation in hen egg white lysozyme crystallization. **Journal of Crystal Growth** 116, 414-420, 1992.

Wilson, L.J.; Bray, T.L. e Suddath, F.L. Crystallization of proteins by dynamic control of evaporation. **Journal of Crystal Growth**, 110, 142-147, 1991.

Wlodawer, A.; Deisenhofer, J. e Huber, R. Comparison of two highly refined structures of bovine trypsin inhibitor. **Journal of Molecular Biology**, 193, 145-156, 1987.

Wlodawer, A.; Walter, J., Huber, R. e Sjölin, L. Structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor- results of neutron and X-ray refinement of crystal form II. **Journal of Molecular Biology**, 180, 301-329 1984.

Yer, G.H.; Dasgupta, S. e Bell, J.A. Ionic strength and intermolecular contacts in

- protein crystals. **Journal of Crystal Growth**, 217, 429-440, 2000.
- Yoshimoto, T.; Shimoda, T.; Kitazono, A.; Kabashima, T.; Ito, K. e Tsuru, D. Pyroglutamyl peptidase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*: Cloning, sequencing, expression, and crystallization of the expressed enzyme. **Journal of Biochemistry**, 113, 67-73, 1993.
- Zhong, G.-Y.; Peterson, D.; Delaney, D.E.; Bailey, M.; Witcher, D.R.; Register, J.C.; Bond, D.; Li, C.-P.; Marshal, L.; Kulisek, E.; Ritland, D.; Meyer, T.; Hood, E. E. e Howard, J. A. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. **Molecular Breeding**, 5, 345-356, 1999.
- Zulauf, M. e D'Arcy, A. Light scattering of proteins as a criterion for crystallization. **Journal of Crystal Growth**, 122, 102-106, 1992.
- Zureck, C.; Kubis, E.; Keup, P.; Hörten, D.; Beunink, J.; Thömmes, J.; Kula, M-R.; Hollenberg, C. e Gellissen, G. Production of two aprotinin variants in *Hansenula polimorpha*. **Process Biochemistry**, 7, 679-689, 1996.