

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**CRISTALIZAÇÃO DE INSULINA SUÍNA COM DIÓXIDO DE
CARBONO COMO AGENTE ACIDIFICANTE**

Eng.^a Química Gisele Atsuko Medeiros Hirata

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Co-orientador: Dr. André Bernardo

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Julho de 2009

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

H613c Hirata, Gisele Atsuko Medeiros
Cristalização de insulina suína com dióxido de
carbono como agente acidificante / Gisele Atsuko
Medeiros Hirata. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Everson Alves Miranda, André
Bernardo.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cristalização. 2. Proteínas. 3. Dióxido de carbono.
4. Insulina. I. Miranda, Everson Alves. II. Bernardo,
André. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Crystallization of porcine insulin with carbon dioxide as
acidifying agent

Palavras-chave em Inglês: Crystallization, Proteins, Carbon dioxide,
Insulin

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Marco Giuliatti, Martin Aznar

Data da defesa: 13/07/2009

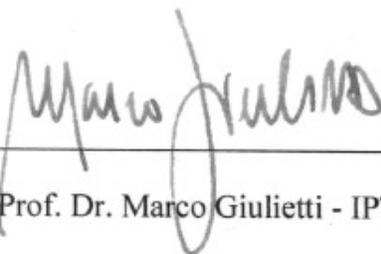
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Gisele Atsuko Medeiros Hirata e aprovada em 13 de julho de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

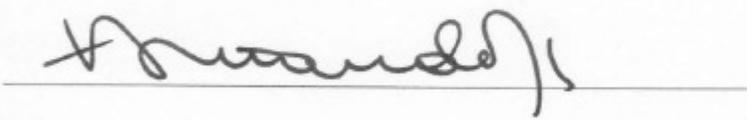


Prof. Dr. Marco Giuliatti - IPT



Prof. Dr. Martin Aznar - FEQ/UNICAMP

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Gisele Atsuko Medeiros Hirata em 13 de julho de 2009.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Everson", is written over a horizontal line. The signature is cursive and somewhat stylized.

Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Orientador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nelson e Sonia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo.

Aos meus pais, Nelson e Sonia, pelo incentivo e amor incondicional.

À minha tia, Socorro, pelo exemplo de disciplina e determinação, e ao meu primo, Dhionatan, pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Everson Alves Miranda, pela orientação, confiança e paciência.

Ao Dr. André Bernardo, por ter aceitado a co-orientação em um momento decisivo para a finalização do trabalho.

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

Ao Prof. Antonio José de Almeida Meirelles, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, pelos ensaios de DSC.

À Profa. Dra. Virgínia Ciminelli e ao Ronaldo Alves Miranda Júnior, da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela análise de espectrometria de absorção atômica.

Ao Prof. Dr. Lisandro Pavie Cardoso e ao Alan Silva de Menezes, do Instituto de Física Gleb Wataghin da Unicamp, pelos ensaios de Difração de Raios-X.

Ao Dr. Alexandre Keiji Tashima, por ter me ensinado a operar o equipamento, pela orientação durante os ensaios iniciais, paciência e entusiasmo.

À Érika, pelas discussões e sugestões durante todo o mestrado.

À Lucimara por ter me ajudado nos primeiros ensaios no laboratório e também pela amizade, fora e dentro da faculdade.

Aos Professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

Aos meus amigos Cristiane, Iara, Igor, Itiara e Juliana pelo companheirismo e os momentos inesquecíveis de alegria e amizade.

Aos amigos do DPB e LPT pela boa companhia durante o período do mestrado.

A CAPES e a FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pêsoa Filho e Dr. Alexandre Keiji Tashima, pelas sugestões para a finalização do trabalho.

Às minhas irmãs, Erin, Talita e Giovana, pela compreensão e incentivo.

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

Em especial, ao Rafael, pela cumplicidade, amor e incentivo, sempre tornando meus dias mais felizes.

"Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência."

Santo Agostinho

RESUMO

A cristalização é uma técnica de separação e purificação largamente utilizada na produção de produtos químicos, farmacêuticos e alimentícios. A maioria dos produtos sólidos é obtida por processos de cristalização/precipitação que provavelmente é a segunda mais importante tecnologia de separação em termos de capacidade, perdendo apenas para processos de destilação. Estudos sobre o uso de eletrólitos voláteis como o CO₂, empregados na precipitação de proteínas, mostram que esses agentes são alternativas promissoras ao uso de ácidos convencionais, pois sua dissolução em solução aquosa gera íons com concentrações fortemente dependentes da temperatura ou pressão, o que facilita sua remoção do sistema. No entanto, não se tem relatos do uso de eletrólitos voláteis na cristalização de proteínas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade de cristalizar uma proteína (insulina suína) utilizando eletrólito volátil (CO₂) como agente de cristalização (agente acidificante). Ensaios de cristalização exploratórios foram realizados para adequar as condições de cristalização e metodologias àquelas usadas na cristalização convencional de insulina. Cristais de formato romboédrico, comum para os cristais de insulina suína que contém zinco em sua estrutura, foram obtidos já nos primeiros ensaios após se ajustar as condições de pH, concentração inicial de insulina e concentração de zinco. Em seguida, a curva de solubilidade de insulina suína no sistema NaHCO₃/ZnCl₂/CO₂ a 15°C foi determinada como função do pH para a faixa de 6,0 a 8,0. Nos ensaios de dissolução e cristalização pode-se observar, através de análises de DSC, que a insulina apresenta duas diferentes estruturas. A partir desses ensaios, foi possível estimar a cinética de dissolução, a cinética de crescimento e a taxa de nucleação dos cristais de insulina como função da supersaturação.

Palavras chave: cristalização de proteínas, dióxido de carbono, insulina.

ABSTRACT

Crystallization is a separation and purification technique used in the production of chemical, pharmaceutical and food products. The majority of the solid products is obtained by crystallization/precipitation processes that probably are the second most important separation technology in terms of capacity, behind only distillation processes. Studies on the use of volatile electrolytes such as CO₂ in protein precipitation showed that these agents are a promising alternative to conventional acids. Volatile electrolytes dissolve and dissociate in water resulting in ions whose concentrations are dependent on the temperature and pressure of the system, what facilitates their removal from system. However, there is no report of the use of volatile electrolyte in protein crystallization. Therefore, the objective of this work was to study the feasibility of protein crystallization (porcine insulin) using volatile electrolyte (CO₂) as crystallization agent (acidifying agent). The crystallization conditions and methodologies were adjusted in preliminary experiments. Rhombohedral crystals – the common shape for porcine insulin crystals that contain zinc in their structure – were obtained in the first crystallization runs after adjustment of pH, initial concentrations of insulin and zinc. The solubility curve for insulin in the NaHCO₃/CO₂/ZnCl₂ system at 15°C was determined as a function of pH in the range of 6.0 to 8.0. DSC analysis of samples from dissolution and crystallization runs indicated that insulin presents different structures. Also, insulin dissolution and crystal growth kinetics as well as nucleation rate as function of supersaturation were determined with data from these experiments.

Keywords: protein crystallization, carbon dioxide, insulin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Colocação do problema	2
1.2. Objetivo	3
1.3. Etapas desenvolvidas	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Cristalização de proteínas	6
2.2. Fundamentos da cristalização	7
2.2.1. Solubilidade e supersaturação	7
2.2.2. Nucleação	10
2.2.3. Crescimento	12
2.2.4. Métodos de cristalização de proteínas	13
2.2.5. Precipitação isoelétrica com eletrólitos voláteis	14
2.3. Insulina e sua cristalização	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Materiais	21
3.2. Equipamento utilizado nos ensaios de dissolução e cristalização com dióxido de carbono	21
3.3. Métodos experimentais	24
3.3.1. Ensaios preliminares de adequação de condições operacionais de cristalização	24

3.3.2. Ensaio exploratório de cristalização de insulina suína.....	25
3.3.3. Determinação da solubilidade da insulina suína a 15°C por ensaios de dissolução.....	26
3.4. Métodos analíticos	26
3.4.1. Determinação da concentração de proteína	26
3.4.2. Medida da quantidade de Zn da insulina suína	27
3.4.3. Análise dos cristais por microscopia óptica e difração a laser	27
3.4.4. Análise da mudança de morfologia dos cristais por calorimetria diferencial exploratória (DSC)	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
4.1. Adequação de condições operacionais da cristalização.....	29
4.2. Ensaio exploratório de cristalização de insulina suína	34
4.3. Determinação da velocidade de agitação (Njs).....	38
4.4. Determinação da solubilidade da insulina suína a 15°C por ensaios de dissolução	40
4.5. Diferença de solubilidade encontrada nos ensaios de dissolução e cristalização.	46
4.6. Cinética de dissolução, do crescimento do cristal e estimativa da nucleação.	50
4.6.1. Cinética de dissolução.....	50
4.6.2. Cinética de cristalização	52
4.6.3. Estimativa da taxa de nucleação.....	59
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63

5.1. Conclusões	63
5.2. Sugestões para trabalhos futuros	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE A – Curvas padrão.....	72
APÊNDICE B – Análise de distribuição do tamanho de cristais (Mastersizer S, Malvern) para os ensaios exploratórios de cristalização de insulina suína.....	75
APÊNDICE C – Dados para determinação das cinéticas de dissolução, crescimento dos cristais e taxa da nucleação	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** – Diagrama esquemático representando as etapas do trabalho desenvolvido..... 5
- Figura 2.1** - O diagrama esquemático da curva de solubilidade ilustra como a solubilidade varia com a concentração do precipitante. Os cristais se dissolvem na região subsaturada – onde a concentração fica abaixo da solubilidade – e crescem na região supersaturada (modificado de Asherie, 2004). 8
- Figura 2.2** – Perfil de concentração do soluto durante o crescimento (g) ou durante a dissolução (d) do polimorfo da α -amilase (adaptado de Boistelle *et al.*, 1992)..... 9
- Figura 2.3** – Seqüência de aminoácidos da insulina suína (adaptado de Walsh e Headon, 1994)..... 17
- Figura 2.4** – Cristais de insulina suína romboédricos (A) e cristais de insulina bovina “tipo estrela” (B) (SCHLICHTKRULL, 1956). 18
- Figura 2.5** – Curva de solubilidade dos cristais de insulina em tampão acetato (adaptado de Wintersteiner e Abramson, 1933)..... 19
- Figura 2.6** – Representação do hexâmero da insulina zíncica, que constitui a unidade de crescimento dos cristais de insulina. Estrutura do PDB – Protein Data Bank, arquivo 3AIY (O’DONOGHUE *et al.*, 2000)..... 20
- Figura 2.7** - Estrutura molecular da insulina - estrutura do monômero, dímero e hexâmero (modificado de Hodgkin, 1974)..... 20
- Figura 3.1** – Desenho esquemático do equipamento utilizado nos ensaios realizados. L-01: linha de entrada de CO₂; P-01: manômetro da linha de entrada; VR-01: válvula de retenção; V-01: válvula micrométrica de entrada; F-01: filtro de linha; E-01: janela de quartzo para observação; TF-01: impelidor para agitação da solução; F-02: tubulação de retirada da fase líquida para amostragem; P-02: manômetro do reator; V-02: válvula micrométrica da fase vapor; V-03: válvula micrométrica da fase líquida; T-01: termopar da fase líquida; pH-01: sensor de pH do reator; AM-01: agitador magnético (Modificado de Tashima, 2007). 22

Figura 3.2 – Imagem do equipamento para a cristalização de proteínas com eletrólitos voláteis.....	23
Figura 3.3 – Sistemas de agitação: a) barra magnética e b) impelidor de pás inclinadas. ...	23
Figura 3.4 – Diagrama esquemático dos passos seguidos nos ensaios de dissolução. Os números indicam a ordem de adição dos reagentes no reator. Os reagentes foram mantidos a 15°C por 15 h antes da adição no reator já a 15°C.	27
Figura 4.1 – Ensaios de adequação de condições operacionais de cristalização de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L em atmosfera de CO ₂ a 5°C. Perfis de concentração da insulina com o tempo para concentração inicial de 2 mg/mL e pH final: 6,48 (◆) A1; pH 6,41 (■) A2.	31
Figura 4.2 – Fotomicrografias dos cristais de insulina suína obtidos a 5°C a partir de solução de NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ sob atmosfera de CO ₂ a pH final: 2mg/mL e pH 6,48 (A1), pH 6,41 (A2); 5mg/mL e pH 7,26 (B1) e pH 7,10 (B2) (ampliação de 400X)...	32
Figura 4.3 – Ensaios exploratórios de cristalização de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 5°C. a) Perfis de concentração da insulina com o tempo e b) variação do pH das soluções de insulina. ◆, ensaio C1, pH _{final} 6,50; □, ensaio C2, pH _{final} 6,50; ○, ensaio C3, pH _{final} 6,37; ◆, ensaio C4, pH _{final} 6,35; ■, ensaio C5, pH _{final} 6,46; ●, ensaio C6, pH _{final} 6,51.....	35
Figura 4.4 – Fotomicrografias dos cristais de insulina suína obtidos a partir de solução de NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 5°C (ampliação de 400X). C1, pH 6,50 (agitação magnética); C2, pH 6,50 (agitação magnética); C3, pH 6,37 (impelidor); C4, pH 6,35 (impelidor); C5, pH 6,46 (impelidor) e C6, pH 6,51 (impelidor).	37
Figura 4.5 – Sistema etanol/insulina suína utilizado na determinação da velocidade de agitação, Njs. a) 10 rpm, b) 20 rpm, c) 30 rpm e d) 50 rpm.	39
Figura 4.6 – Cinéticas de dissolução de insulina em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L a 15°C em diferentes valores finais de pH: 6,30 (◇), 6,50 (□), 6,60 (△), 6,98 (○), 7,34 (×). Suspensão inicial de 2,0 mg/mL de insulina.	41

- Figura 4.7** – Solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ obtida por dissolução de cristais a 15°C. (□) Dados experimentais e (—) ajuste exponencial: $S = 2,00 \times 10^{-11} e^{(4,23 \times pH)}$, $R^2 = 0,93$ 44
- Figura 4.8** – Variação do tamanho das partículas durante os ensaios de dissolução da insulina em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 15°C em diferentes valores finais de pH: 6,30 (◇), 6,50 (■), 6,60 (□) e 7,34 (○)..... 44
- Figura 4.9** – Cinética de cristalização de insulina do ensaio D. Condições experimentais: 2,09 mg/mL de insulina suína em solução de NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ em pH 6,45 a 15°C..... 46
- Figura 4.10** – Fotomicrografia dos cristais de insulina suína obtidos no ensaio D1 a partir de NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ em pH 6,45 a 15°C (ampliação de 400X). 47
- Figura 4.11** – Cinética de cristalização de insulina no ensaio D2. Condições experimentais: 115,34 µg/mL de insulina suína em solução de NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,02 mmol/L sob atmosfera de CO₂ em pH 6,45 a 15°C. 48
- Figura 4.12** – Endotermas para as amostras de insulina original, cristalizada e dissolvida em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ em pH 6,45 a 15°C obtidas nas análises de DSC com taxa de aquecimento de 5°C/min com temperatura máxima de 250°C. Próximo à temperatura de 250°C nota-se uma irregularidade nas endotermas, o que indica a degradação da insulina nessa temperatura. 49
- Figura 4.13** – Cinética de dissolução da insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 15°C. (◆) dados da Tabela 4.5 e (—) valor ajustado ($R^2 = 0,80$)..... 52
- Figura 4.14** – Perfil de concentração da insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 15°C em diferentes valores de pH. Ensaios: (△) E1, pH 6,30; (□) E2, pH 6,50; (◇) E3, pH 6,50; e (○) E4, pH 6,30. Concentrações iniciais em cerca de 2 mg/mL, exceto para o ensaio E3, 1,5 mg/mL. 53
- Figura 4.15** – Fotomicrografias dos cristais de insulina em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 15°C em diferentes valores de pH: E1, pH 6,30; E2,

pH 6,50; E3, pH 6,50 e E4, pH 6,30. Concentrações iniciais em cerca de 2 mg/mL, exceto para o ensaio E3, 1,5 mg/mL.....	55
Figura 4.16 - Cinética de crescimento de cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 15°C. (◆) dados da Tabela 4.7 e (—) valor ajustado (R ² = 0,92).....	57
Figura 4.17 – Processos de dissolução e crescimento dos cristais de insulina: (□) cinética de dissolução (D) e (◇) cinética de crescimento (G).	58
Figura A.1 – Curva padrão para medida de absorbância a 280 nm da solução de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L, pH 9,38. Absorbância _(280 nm) = 0,87 x Concentração de insulina, R ² = 0,99.	72
Figura A.2 – Curva padrão para medida de absorbância a 280 nm da solução de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e HCl 4 mmol/L, pH 7,53. Absorbância _(280 nm) = 0,94 x Concentração de insulina, R ² = 0,99.	73
Figura A.3 - Curva padrão para determinação da concentração de insulina em NaHCO ₃ 50 mmol/L pH 7,50 através da medida de absorbância a 595 nm. Absorbância _(595 nm) = 0,0223 x Concentração de insulina, R ² = 0,97.	74
Figura B.1 – Ensaio C1: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 5°C e pH 6,50.	75
Figura B.2 – Ensaio C2: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 5°C e pH 6,50.	76
Figura B.3 – Ensaio C3: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 5°C e pH 6,37.	77
Figura B.4 – Ensaio C4: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 5°C e pH 6,35.	78
Figura B.5 – Ensaio C5: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 5°C e pH 6,46.	79
Figura B.6 – Ensaio C6: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 5°C e pH 6,51.	80

Figura C.1 – Ensaio E1: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 15°C e pH 6,30.	88
Figura C.2 – Ensaio E2: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 15°C e pH 6,50.	89
Figura C.3 – Ensaio E3: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 15°C e pH 6,48.	90
Figura C.4 – Ensaio E4: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ a 15°C e pH 6,30.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Condições iniciais e finais dos ensaios de cristalização de insulina suína em NaHCO ₃ /ZnCl ₂ /CO ₂ baseado em protocolo industrial.....	33
Tabela 4.2 - Ensaios de cristalização de insulina suína com CO ₂ em solução de NaHCO ₃ /ZnCl ₂	36
Tabela 4.3 - Solubilidade da insulina suína em diferentes valores de pH para o sistema solvente NaHCO ₃ 50 mmol/L/ZnCl ₂ /CO ₂ a 15°C.....	42
Tabela 4.4 - Tamanho das partículas durante a dissolução da insulina em NaHCO ₃ 50 mmol/L sob atmosfera de CO ₂ e ZnCl ₂ 0,4 mmol/L a 5°C.....	45
Tabela 4.5 - Dados utilizados na determinação da cinética de dissolução da insulina suína em NaHCO ₃ /ZnCl ₂ /CO ₂ a 15°C.....	51
Tabela 4.6 - Tamanho dos cristais de insulina em NaHCO ₃ /ZnCl ₂ sob atmosfera de CO ₂ durante os ensaios de cristalização para determinação da cinética de crescimento de cristais a 15°C (tamanhos obtidos pelo método de análise de imagem).....	54
Tabela 4.7 - Dados experimentais linearizados para a determinação da cinética de crescimento de insulina suína em NaHCO ₃ /ZnCl ₂ /CO ₂ a 15°C.....	57
Tabela 4.8 - Distribuição de tamanho dos cristais para a cristalização de insulina suína em NaHCO ₃ /ZnCl ₂ /CO ₂ a 15°C e pH 6,30 - ensaio E1 (os dados similares dos experimentos E2, E3 e E4 estão no Apêndice C.4).....	60
Tabela 4.9 - Estimativa do número de cristais de insulina suína em NaHCO ₃ /ZnCl ₂ /CO ₂ a 15°C e da velocidade média da nucleação.....	61
Tabela C.1 - Dados utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em pH 6,30.....	81
Tabela C.2 - Dados utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em pH 6,50.....	82

Tabela C.3 - Dados utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em pH 6,60.	83
Tabela C.4 - Dados utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em pH 7,34.	84
Tabela C.5 - Dados utilizados no cálculo da cinética de crescimento da insulina suína em pH 6,30 a 15°C.	85
Tabela C.6 - Dados utilizados no cálculo da cinética de crescimento da insulina suína em pH 6,30 a 15°C.	86
Tabela C.7 - Dados utilizados no cálculo da cinética de crescimento da insulina suína em pH 6,45 a 15°C.	87
Tabela C.8 - Dados da distribuição de tamanho dos cristais para a cristalização de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L, ZnCl ₂ 0,4 mmol/L e CO ₂ a 15°C e pH 6,50 (ensaio E2). ...	92
Tabela C.9 - Dados da distribuição de tamanho dos cristais para a cristalização de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L, ZnCl ₂ 0,4 mmol/L e CO ₂ a 15°C e pH 6,50 (ensaio E3). ...	93
Tabela C.10 - Dados da distribuição de tamanho dos cristais para a cristalização de insulina suína em NaHCO ₃ 50 mmol/L, ZnCl ₂ 0,4 mmol/L e CO ₂ a 15°C e pH 6,30 (ensaio E4).	94

NOMENCLATURA

B₀	taxa de nucleação primária
B	taxa de nucleação secundária
C_i	concentração inicial
C_f	concentração final
C_t	concentração em função do tempo
C_{Zn}	concentração inicial de zinco
d	ordem de dissolução
D	velocidade de dissolução
D_t	diâmetro do impelidor
d_p	diâmetro da partícula
DSC	calorimetria diferencial exploratória
f	fração mássica
g	ordem de crescimento
G	velocidade de crescimento de cristais
g_c	constante de aceleração da gravidade
k	constante de Boltzmann
k_d	constante de proporcionalidade para a dissolução
k_g	constante de proporcionalidade para o crescimento
k_N	constante de nucleação
k_v	fator de forma volumétrico
L	dimensão característica do cristal
M_T	densidade da suspensão

Mc	massa de cristal
n	ordem de nucleação
n_p	densidade populacional
N_T	número de cristais por volume de solução
N_{js}	velocidade de agitação “just suspended”
pH_{15°C}	valor de pH na temperatura de 15°C
pH_{5°C}	valor de pH na temperatura de 5°C
S	solubilidade
S_N	número adimensional (função do tipo de impelidor)
S_R	supersaturação relativa
T	temperatura
t_b	tempo de batelada
t_{15°C}	tempo na temperatura de 15°C
t_{5°C}	tempo na temperatura de 5°C
W	velocidade de agitação
X	razão mássica de sólido suspenso e líquido
ΔC	supersaturação
ΔL	variação da dimensão característica do cristal
ΔN	número de cristais, de uma determinada faixa de tamanho, por grama de cristal total
Δt	variação do tempo
ρ_c	densidade do cristal
ρ_l	densidade do líquido
ρ_s	densidade do sólido
σ	tensão de superfície

v	volume molecular
ν_l	viscosidade cinemática do líquido

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 70% dos produtos vendidos em indústrias de processos e também em indústrias farmacêuticas são sólidos (VAN ROSMALEN *et al.*, 2004). Na indústria farmacêutica a cristalização é um importante processo tecnológico para formação de partículas, sendo que mais de 90% de todos os produtos farmacêuticos, tais como tabletes, aerossóis, cápsulas, suspensões e supositórios contêm drogas na forma de particulados geralmente cristalinos (SHEKUNOV e YORK, 2000).

A cristalização de proteínas, otimizada por muitas décadas para produzir cristais com melhores condições para análises de difração de raios-X, também oferece um grande potencial no processo de recuperação e purificação das mesmas. A forma cristalina apresenta vantagens com relação às suas formas dissolvida e amorfa, pois o cristal possui maior tempo de estocagem e maior pureza, o que abre inúmeras aplicações para a cristalização industrial de proteínas (SCHMIDT *et al.*, 2005).

Uma importante técnica de separação e purificação de proteínas utilizada na indústria é a precipitação isoeletrica, que consiste no ajuste do pH do meio até o ponto isoeletrico (pI). No pI a carga global da proteína é nula, pois a repulsão eletrostática entre as moléculas é reduzida, o que favorece a sua precipitação. Como grande parte das proteínas apresenta um pI próximo da região ácida é comum o uso de ácidos convencionais, tais como ácido sulfúrico e ácido clorídrico, para ajustar o pH das soluções que contêm a proteína. Após o processo de precipitação, os efluentes gerados devem ser tratados antes do seu descarte ao meio ambiente.

Os eletrólitos voláteis como o CO₂ surgiram como uma alternativa ao uso de ácidos convencionais nos processos de precipitação isoeletrica. Sob pressão, os eletrólitos voláteis se dissociam em solução aquosa, gerando íons com concentrações dependentes da temperatura e pressão do sistema, que alteram o pH do meio. Após a despressurização do

sistema, a solução retorna ao valor de pH próximo da neutralidade (o eletrólito passa da fase líquida para a fase vapor). Outra vantagem é que não ocorrem extremos locais de pH – a solubilização do agente precipitante é lenta e ocorre em toda a superfície gás-líquido – o que muitas vezes causa a desnaturação da proteína ou até mesmo redução da pureza do precipitado (KHORSHID *et al.*, 2007).

1.1. Colocação do problema

O uso dos eletrólitos voláteis em processos de purificação de proteínas é relativamente recente, havendo poucos trabalhos sobre o assunto. Os estudos da precipitação isoeétrica de proteínas com eletrólitos voláteis foram realizados com sistemas protéicos complexos (HOFLAND *et al.* 1999, 2000), não havendo na literatura um conhecimento do efeito das variáveis termodinâmicas sobre o equilíbrio de fases de sistemas que contenham proteínas (TASHIMA, 2007). A precipitação isoeétrica com CO₂ de uma proteína, albumina de soro bovino foi investigada por Qi *et al.* (2004); estudos sobre a atividade de algumas enzimas no sistema formado por etanol, CO₂ e água foram apresentados por Yao *et al.* (2004). Samadi e Husson (2003) descreveram um processo de precipitação com CO₂ para recuperação de ácido L-aspartico.

Estudos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, coordenado pelo professor Everson Alves Miranda, mostraram que é possível precipitar proteína utilizando CO₂ como agente acidificante. Obtiveram-se dados de equilíbrio da insulina suína em soluções aquosas de NaHCO₃ sob atmosfera de CO₂ pressurizado, abordando-se aspectos teóricos e experimentais da precipitação com o desenvolvimento de um modelo termodinâmico que correlaciona os dados experimentais. Demonstrou-se também que a solubilidade da insulina precipitada por CO₂ segue o mesmo perfil encontrado na precipitação isoeétrica com ácidos e bases convencionais (TASHIMA, 2007). No entanto, o estudo de Tashima (2007) não teve como objetivo a caracterização da fase sólida. Em seu trabalho, foram realizadas análises de microscopia óptica e eletrônica de varredura que demonstraram que os precipitados obtidos eram amorfos e muito diferentes das partículas regulares e romboédricas cristalizadas nesse presente estudo.

1.2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade de cristalizar uma proteína (insulina suína) em reator pressurizado utilizando eletrólito volátil (CO_2) como agente de cristalização (agente acidificante) e identificar as principais variáveis de processo. Para tal, se estudou a cinética de dissolução, a cinética de crescimento dos cristais de insulina suína, e a taxa de nucleação como função da supersaturação em diferentes valores de pH, analisando o tamanho e o tipo de cristais. A taxa de nucleação e a cinética de crescimento têm um impacto significativo na pureza do produto e no hábito cristalino, além da utilidade no desenvolvimento de processos de cristalização industrial.

A insulina suína (um polipeptídio composto por duas cadeias com número total de 51 aminoácidos) foi a proteína escolhida para este estudo por já ter sido estudada anteriormente pelo grupo dos professores Everson Alves Miranda (Faculdade de Engenharia Química da Unicamp) e Pedro de Alcântara Pêssoa Filho (Departamento de Engenharia Química da USP) dentro do projeto de estudo da precipitação isoeletrica com CO_2 (TASHIMA, 2007).

As diferenças entre a precipitação realizada por Tashima (2007) e a cristalização feita nesse trabalho são os valores de concentração inicial de proteína, 2 mg/mL, adição de zinco à solução e a faixa de pH. Na faixa adotada, pH de 6,0 a 8,0, a formação de hexâmeros é favorecida na presença de zinco, sendo a unidade cristalina – o hexâmero – fundamental na formação do cristal.

Nesse estudo, são mostrados dados inéditos de solubilidade da insulina, cinéticas de dissolução e crescimento dos cristais e, a taxa de nucleação no sistema solvente $\text{NaHCO}_3/\text{ZnCl}_2/\text{CO}_2$ a 15°C . Notou-se que, a quantidade de zinco presente na solução influencia nos dados de solubilidade e na forma do cristal. Quando comparado ao trabalho de Tashima (2007), em que não houve adição de zinco à solução, a solubilidade obtida foi cerca de 8 vezes menor e a forma do cristal foi romboédrica.

1.3. Etapas desenvolvidas

Para a realização deste trabalho desenvolveu-se um plano estruturado em seis etapas (Figura 1.1).

Os estudos executados neste trabalho são listados a seguir com a indicação da etapa de trabalho pertinente apresentada entre parênteses ao final da descrição do tópico:

- a) Implementação de métodos analíticos para determinação da concentração de proteína por absorvância a 280 nm e Coomassie Plus (**Etapa 1**);
- b) Ensaios de cristalização da insulina suína a 15°C com o CO₂. Um protocolo industrial de cristalização de insulina da empresa Biobrás (Montes Claros, MG) foi cedido por Luciano Vilela (comunicação pessoal) e utilizado como referência básica para os primeiros ensaios de cristalização (**Etapa 1**);
- c) Determinação do tamanho dos cristais, por difração a laser e análise de imagem, o que permitiu a obtenção de uma estimativa das cinéticas de dissolução, crescimento, nucleação e a avaliação do tipo dos cristais de insulina (**Etapa 1**);
- d) Análises térmicas com DSC (“Differential Scanning Calorimetry”) para verificação da estrutura cristalina da amostra da insulina original (insulina disponível em estoque) e das amostras dos ensaios de cristalização e de dissolução (**Etapa 1**);
- e) Determinação experimental da velocidade mínima de agitação N_{js} (**Etapa 2**);
- f) Ensaios de dissolução da insulina a 15°C para a obtenção da curva de solubilidade e determinação da cinética de dissolução dos cristais em função da supersaturação para diferentes valores de pH (6,30 a 7,34). Esses ensaios indicaram um comportamento polimórfico da insulina (**Etapa 3 e 3.1**);
- g) Ensaios de cristalização da insulina a 15°C para determinação da cinética de crescimento e estimativa da taxa de nucleação dos cristais como função da supersaturação em valores de pH 6,30 e 6,50 (**Etapa 4, 4.1 e 4.2**);

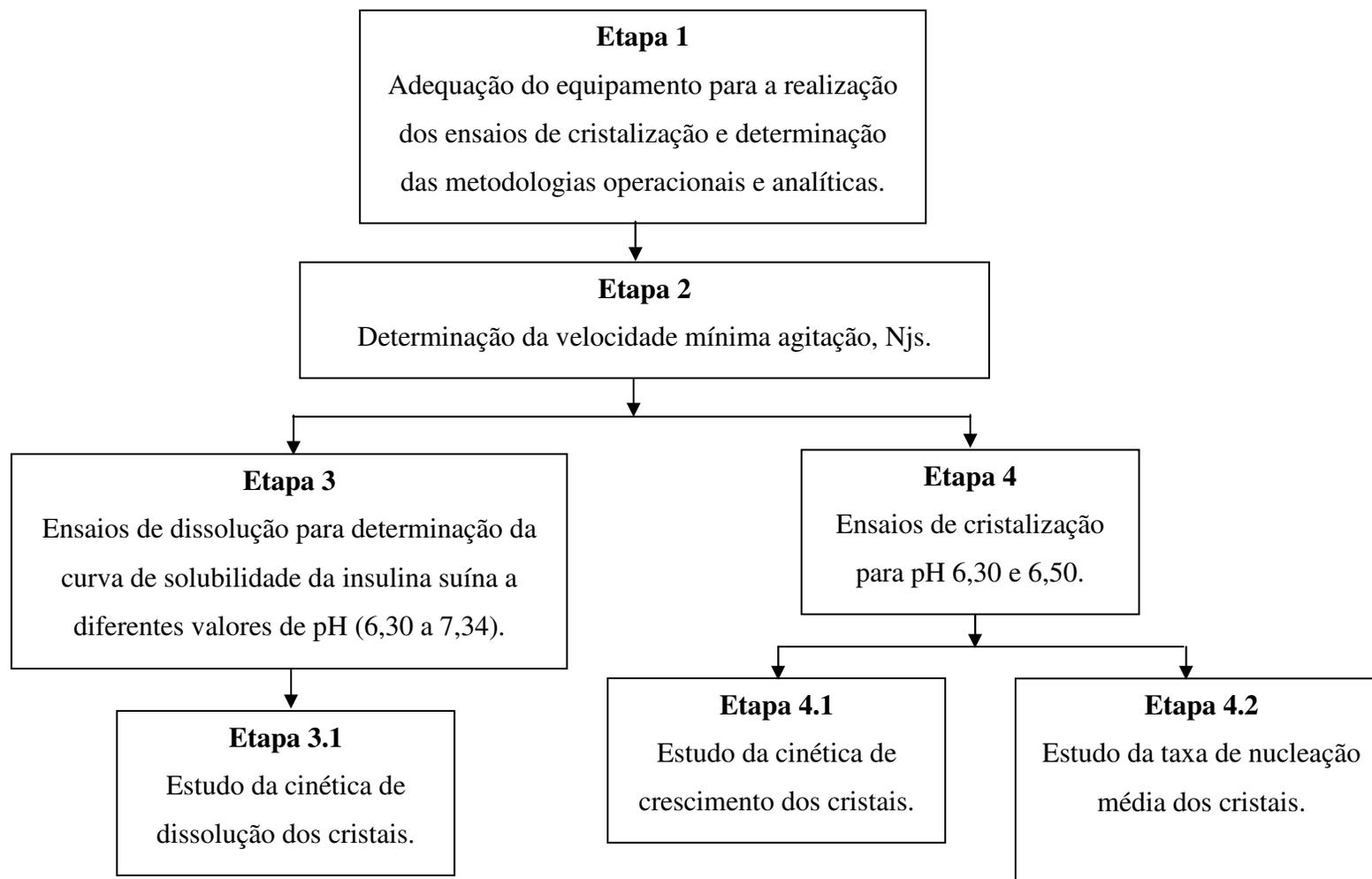


Figura 1.1 – Diagrama esquemático representando as etapas do trabalho desenvolvido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cristalização de proteínas

A cristalização de macromoléculas biológicas, como qualquer outra cristalização, é um processo de múltiplos parâmetros envolvendo passos clássicos de nucleação e crescimento, em que moléculas são levadas a um estado supersaturado, ou seja, termodinamicamente instável ou metaestável, o que significa que o estado supersaturado não resultará necessariamente em cristalização.

O processo de cristalização de proteínas é frequentemente referido mais como uma arte do que uma ciência (LITTLECHILD, 1991), pois a cristalização de macromoléculas biológicas é uma tarefa difícil e laboriosa, por essas substâncias apresentarem extensa sensibilidade a condições externas. Conseqüentemente, os métodos usuais de evaporação, alta pressão, variação drástica de temperatura ou adição de um solvente orgânico, devem ser, quase sempre, substituídos por técnicas menos agressivas. Isso pode ser feito através da manipulação de parâmetros tais como concentração da macromolécula a ser cristalizada, concentração do agente precipitante, temperatura e pH.

Existem várias técnicas de crescimento de cristais de macromoléculas biológicas que têm sido utilizadas por mais de 30 anos. O tempo típico de crescimento de cristais de macromoléculas é de uma a três semanas, contudo, o tempo para obter cristais pode variar de algumas horas até um ano. Nenhum método é considerado superior a qualquer outro. A escolha do método depende da proteína envolvida, sua quantidade e principalmente da preferência do operador (CHAYEN, 1999; MCPHERSON, 1999).

Cristais de proteínas podem ser usados como remédios, detergentes, cosméticos, etc., sendo a cristalização de proteínas em larga escala vista como uma nova operação unitária industrial na recuperação e purificação de algumas proteínas. Porém, condições

ótimas de cristalização são determinadas muitas vezes por tentativas e erros mais do que por uma base teórica sólida (LU *et al.*, 2002; VELEV *et al.*, 1998; JACOBSEN *et al.*, 1998).

2.2. Fundamentos da cristalização

A cristalização de uma molécula ou de qualquer espécie química, incluindo proteínas, ocorre em dois passos distintos e inseparáveis: a nucleação e o crescimento. A nucleação é um processo teórico e experimentalmente difícil de compreender, pois representa uma transição de fase em que moléculas passam de um estado totalmente desordenado para o estado ordenado. Por outro lado, o crescimento já é melhor caracterizado e seus mecanismos são bem entendidos. No entanto, ambos os passos da cristalização são dependentes da supersaturação e da temperatura (MCPHERSON, 2004).

2.2.1. Solubilidade e supersaturação

Os fatores que governam a solubilidade de uma proteína também influenciam no seu comportamento de cristalização. Temperatura, pH, concentração da proteína e força iônica, entre outras, são variáveis importantes que afetam o tipo e tamanho de cristais que se formam. A disponibilidade de curvas de solubilidade ou até mesmo informações de como vários fatores afetam a solubilidade, leva a entender melhor o comportamento da cristalização e, assim, aperfeiçoar o controle do processo.

Quando um cristal de proteína é colocado em um solvente livre de proteína os cristais se dissolvem. Se a quantidade de solvente é pequena, os cristais não irão se dissolver completamente; irão se dissolver até a concentração da proteína em solução atingir um valor específico. Nesta concentração os cristais perdem moléculas de proteína na mesma proporção em que moléculas de proteína se ligam ao cristal – o sistema está em equilíbrio. A concentração da proteína em solução no equilíbrio é conhecida como solubilidade (ASHERIE, 2004). A variação da solubilidade em função da temperatura, pH, pressão ou da concentração de um precipitante (Figura 2.1) é a base para o projeto de um processo de cristalização.

A supersaturação da solução, principal parâmetro na determinação da velocidade de crescimento e da nucleação, é definida como a diferença entre a concentração do soluto e a sua concentração de equilíbrio em condições idênticas, ou seja, sua solubilidade na solução dada (NÝVLT *et al.*, 2001).

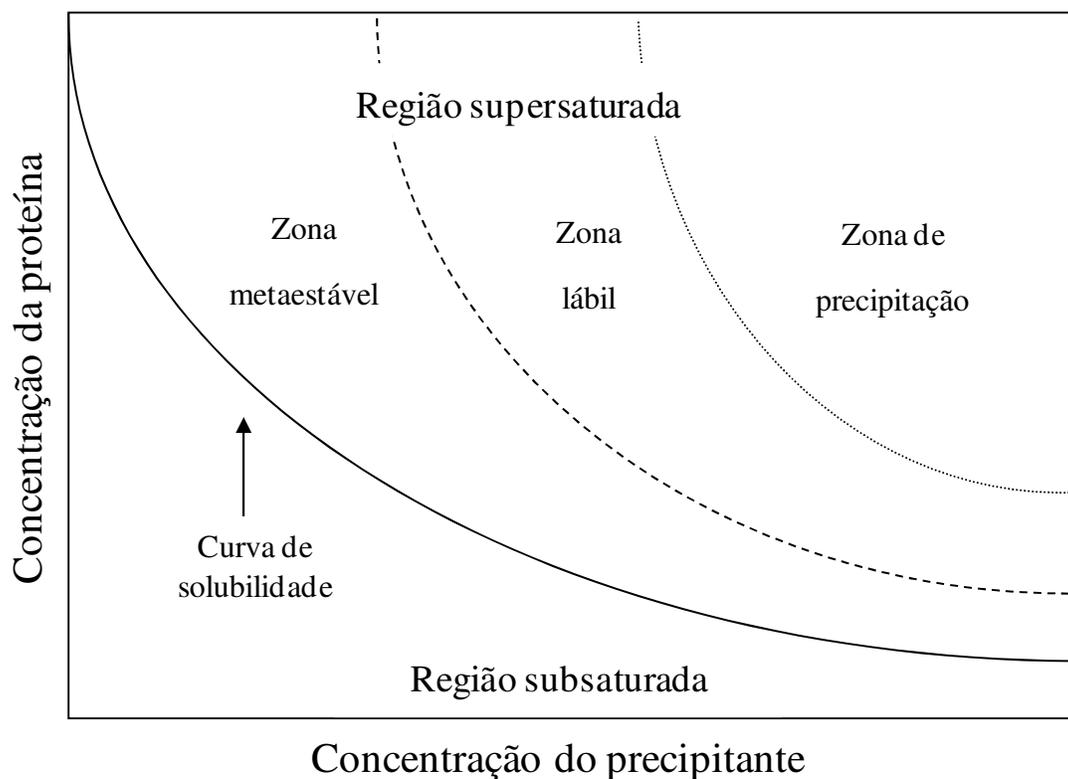


Figura 2.1 - O diagrama esquemático da curva de solubilidade ilustra como a solubilidade varia com a concentração do precipitante. Os cristais se dissolvem na região subsaturada – onde a concentração fica abaixo da solubilidade – e crescem na região supersaturada (modificado de Asherie, 2004).

Segundo Asherie (2004), a solubilidade pode ser determinada por uma solução supersaturada ou uma solução subsaturada. No caso da supersaturada, a solução irá atingir o equilíbrio através da nucleação e crescimento dos cristais em vez da dissolução (no caso de solução subsaturada). Contudo, estabelecer um equilíbrio a partir de uma solução supersaturada é mais difícil. A razão é que como os cristais crescem, sua superfície pode ser envenenada por impurezas ou as moléculas serem inadequadamente orientadas na rede

crystalina. Esse envenenamento pode cessar o crescimento antes que o verdadeiro equilíbrio entre os cristais e a solução seja estabelecido. Porém, independente do caminho, a concentração da proteína no sobrenadante deverá convergir para o mesmo valor. Em muitos casos há uma diferença em torno de 5 a 10% no valor encontrado para a concentração de equilíbrio ao se utilizar os dois métodos. A solubilidade deve ser determinada através de ensaios de dissolução quando tempo e quantidades de materiais são limitados. No caso de Boistelle *et al.* (1992), por exemplo, o equilíbrio da solução supersaturada foi atingido apenas após um mês (Figura 2.2).

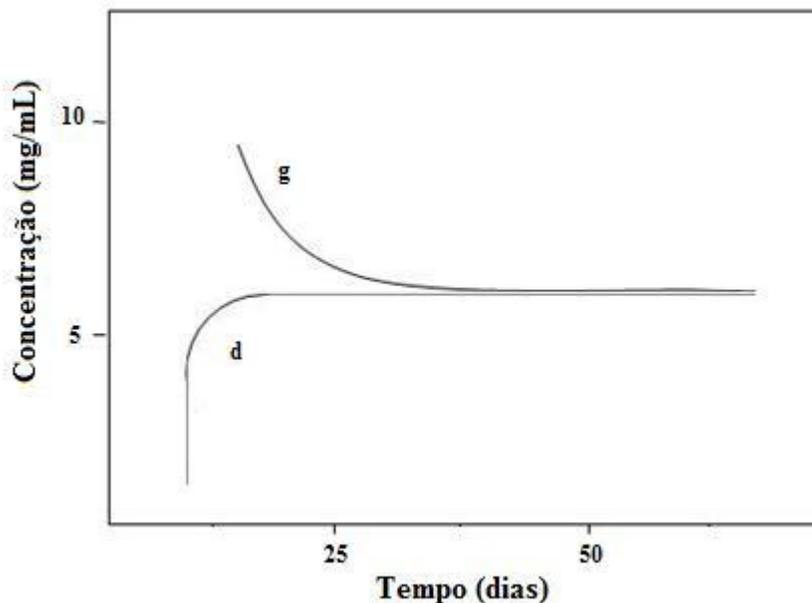


Figura 2.2 – Perfil de concentração do soluto durante o crescimento (g) ou durante a dissolução (d) do polimorfo da α -amilase (adaptado de Boistelle *et al.*, 1992).

Existem várias formas de empacotamento da rede cristalina para um mesmo composto sob diferentes condições de cristalização, resultando em diferentes estruturas. Nesse caso, esse composto cristalino é dito ser polimórfico. Em alguns casos, a composição do cristal pode diferir somente pelo número de moléculas de solvente presente. Na cristalização a partir da solução, por exemplo, a rede pode conter moléculas de solvente

ligada a sua estrutura resultando em cristais que são chamados de solvatos (WOOD, 1997). Estas estruturas podem apresentar diferentes solubilidades.

2.2.2. Nucleação

A nucleação, primeira etapa do processo de cristalização, é conhecida como o “nascimento” de um cristal – surgimento de uma nova fase – sendo classificada como:

- ❖ Nucleação primária
 - Homogênea*: a partir de uma solução límpida
 - Heterogênea*: induzida pela presença de “superfícies estranhas” (ex., parede, impelidor, poeira)
- ❖ Nucleação secundária: ocorre na presença de cristais

A nucleação primária ocorre na ausência de superfícies cristalinas dependendo exclusivamente da supersaturação do sistema. A taxa de nucleação primária (B_0) pode ser obtida da equação (2.1):

$$B_0 = A \cdot \exp\left[\frac{-16\pi\sigma^3 v^2}{3k^3 T^3 (\ln S_R)^2}\right] \quad (2.1)$$

onde A é uma constante, σ é a tensão interfacial, v é o volume molecular, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da solução e S_R é a supersaturação relativa.

A nucleação secundária (B) necessita da presença de cristais no meio e da interação destes com a parede do cristalizador, impelidores, etc., sendo função da agitação, supersaturação e densidade da suspensão. Em muitos processos, cristais são adicionados ao cristalizador (prática chamada de sementeira) para diminuir a supersaturação do sistema – a supersaturação se torna menor do que a necessária para uma nucleação primária. No

entanto, é um fenômeno complexo e pouco entendido sendo modelado por uma lei de potências dado por:

$$B = k_N W_i M_T^j \Delta C^n \quad (2.2)$$

onde k_N é uma constante de nucleação, W a velocidade de agitação, M_T a densidade da suspensão, ΔC a supersaturação, n a ordem de nucleação e j e i são expoentes empíricos (MYERSON, 2002).

A taxa de nucleação pode ser determinada pela observação do tempo de indução detectada por mudanças nas propriedades da solução (exemplos: turbidez e índice de refração), por métodos que utilizam a largura da zona metaestável ou pelo balanço populacional, método empregado neste trabalho.

O balanço populacional foi introduzido por Hulburt e Katz (1964) e mais tarde, Randolph e Larson (1988) detalharam o modelo para processos de cristalização. O balanço populacional é baseado na densidade populacional, n_p , derivada do número de partículas por unidade de volume, N :

$$n_p = \lim_{\Delta L \rightarrow 0} \frac{\Delta N}{\Delta L} = \frac{dN}{dL} \quad (2.3)$$

Na prática, a densidade populacional é calculada da relação:

$$n_p = \frac{\Delta m}{k_v \cdot \rho_c \cdot \bar{L}^3 \cdot \Delta L} \quad (2.4)$$

Com:

$$\Delta m = f \cdot M_T \quad (2.5)$$

onde f é igual a fração mássica ou volumétrica de uma dada faixa de tamanho L , M_T a massa total por unidade de volume, k_v é o fator de forma volumétrico, ρ_c é a densidade do sólido e \bar{L} o tamanho médio (MERSMANN, 1995).

Outras propriedades importantes da distribuição de tamanho dos cristais podem ser calculadas através da densidade populacional, por exemplo, o número total de partículas por unidade de volume, N_T , e também M_T (MYERSON, 2002):

$$N_T = \int_0^L n_p(L) \cdot dL \quad (2.6)$$

$$M_T = \rho_c \cdot k_v \cdot \int_0^L L^3 \cdot n_p(L) \cdot dL \quad (2.7)$$

2.2.3. Crescimento

A disponibilidade de dados da cinética de crescimento de cristais é muito útil no desenvolvimento, projeto e operação de processos industriais. O crescimento pode ser descrito pela mudança da dimensão característica do cristal com o tempo ou pela mudança da massa do cristal.

Existem várias teorias para representar o processo de crescimento do cristal, contudo o crescimento a partir da solução pode ser dividido em dois passos: difusão da unidade de crescimento em direção a superfície do cristal e a integração dessas unidades na sua superfície (VAN ROSMALEN *et al.*, 2004). A expressão básica usada para a velocidade de crescimento (G , comprimento/tempo) está relacionada com a supersaturação:

$$G = k_g \cdot \Delta C^g \quad (2.8)$$

onde ΔC é a supersaturação, o expoente g é conhecido como a ordem de crescimento (tendo o valor normalmente entre 1 e 2 segundo van Rosmalen *et al.*, 2004) e k_g é a constante de crescimento.

De acordo com Mullin (1993), se os processos de cristalização e dissolução são de natureza difusional, a velocidade desses processos devem ser iguais para dadas condições de equilíbrio, ou seja, todas as faces do cristal irão crescer e se dissolver na mesma velocidade.

A velocidade de dissolução, D , assim como o crescimento, pode ser também expressada por uma lei de potências:

$$D = k_d \cdot \Delta C^d \quad (2.9)$$

onde o expoente d é a ordem de dissolução e k_d a constante de dissolução.

2.2.4. Métodos de cristalização de proteínas

Para promover a cristalização, uma ação externa é aplicada ao sistema para modificar o estado da solução de subsaturado para supersaturado. A natureza dessa ação determina o método de cristalização. A criação do estado supersaturado pode ser feito através da mudança de temperatura, pH, concentração do sal, entre outros.

Segundo Chayen (1999) existem quatro principais métodos de cristalização de macromoléculas: a cristalização batelada, um método tradicional e relativamente simples em que a supersaturação é atingida logo após a mistura da molécula a ser cristalizada e do agente cristalizante; na difusão a vapor, o equilíbrio ocorre através da difusão da água ou solvente orgânico presente na gota que contém a macromolécula para o reservatório com solvente de concentração maior que a concentração da gota, levando à cristalização da macromolécula devido à mudança na concentração da gota (uma vantagem é a pequena quantidade de material utilizado). A difusão líquido/líquido acontece através da formação de um gradiente de precipitante na região de interface líquido/líquido, provocando uma

supersaturação local, o que promove a cristalização e, por último, a diálise, método semelhante à difusão líquido/líquido, onde a solução da macromolécula é separada do solvente por uma membrana semipermeável (a difusão através da membrana é lenta e pode ser controlada pelo tamanho do poro) (McPHERSON, 1982; McPHERSON, 1999; CHAYEN, 1999).

2.2.5. Precipitação isoelétrica com eletrólitos voláteis

Entre os métodos utilizados para precipitar proteínas em soluções aquosas, pode-se citar a precipitação através da adição de sais (a solubilidade diminui com a dissolução do sal – efeito “salting-out”), adição de solventes orgânicos (provoca a redução da atividade da água: diminui a capacidade de solvatação da água na proteína, conforme a concentração do solvente orgânico aumenta), desnaturação seletiva (mudança de temperatura ou pH em que a proteína desejada não é totalmente desnaturada) e ajuste de pH (precipitação isoelétrica), entre outros (SCOPES, 1988).

Como uma alternativa aos ácidos minerais, ácidos voláteis como o dióxido de carbono podem ser usados para precipitar proteínas. Quando se aplica uma pressão parcial elevada aos ácidos voláteis em um sistema contendo uma solução aquosa ocorre a acidificação dessa solução. O controle do pH na faixa de interesse é possível através da manipulação da pressão e temperatura. Conseqüentemente, a acidificação torna-se dependente da pressão do sistema e do contato entre o líquido e a fase vapor. Ao contrário do que ocorre em sistemas de precipitação convencional em que o contato local da mistura líquido/líquido (solução do ácido convencional com a solução de proteína) pode provocar um extremo de pH (THIERING *et al.*, 2001). Nos sistemas com eletrólitos voláteis, a dissolução se dá em toda a interface gás-líquido, de forma mais homogênea, sem causar extremos locais de pH.

O dióxido de carbono é um dos inúmeros eletrólitos voláteis que podem ser usados para acidificar soluções aquosas. Outros gases solúveis em água, tal como dióxido de enxofre, também podem ser usados para mudar a faixa de acidez das soluções aquosas (THIERING *et al.*, 2001).

A dissolução do dióxido de carbono é caracterizada pela lei de Henry, que estabelece que quanto maior a pressão de dióxido de carbono maior a força motriz para sua dissolução e reação com a água. Uma vez dissolvido em solução aquosa (equação 2.10 e 2.11), o dióxido de carbono se dissocia em íons (equação 2.12 e 2.13) e conforme a concentração de íons H^+ aumenta, ocorre a acidificação da solução e mudança do pH do meio:



O uso do CO_2 como agente acidificante foi primeiro relatado por Jordan *et al.* (1987) que demonstraram que era possível precipitar caseína dissolvendo CO_2 no leite sob pressão. Hofland *et al.* (1999), investigaram a precipitação da caseína a partir do leite com CO_2 sob pressão. Thiering *et al.* (2001) também usaram CO_2 para precipitar isoeletricamente glicina e β -conglucina da soja e obtiveram níveis de pureza de 95 e 80%, respectivamente.

Tashima *et al.* (2009) realizaram a precipitação isoeletrica da insulina suína com CO_2 em soluções de $NaHCO_3$, além de determinar experimentalmente a solubilidade da proteína e propor um modelo termodinâmico de eletrólitos que correlaciona a solubilidade da insulina em função da temperatura, pressão e pH do sistema (a modelagem termodinâmica mostrou que quando a proteína se afasta do seu pI sua solubilidade aumenta). Em seus estudos, observaram que tanto os valores de pH de equilíbrio quanto as concentrações de equilíbrio da insulina na fase sobrenadante não dependem da concentração inicial de proteína (concentrações iniciais entre 0,61 e 0,96 mg/mL a 25°C), demonstrando que o equilíbrio de fases para a insulina no sistema solvente $NaHCO_3$ 10 mmol/L sob atmosfera de CO_2 (pressões de 1, 2, 3 e 9 bar) é sólido-líquido. Também perceberam que a insulina apresenta solubilidade retrógrada (maior solubilidade em temperatura menor) já observada antes por Bernardo *et al.* (2004). Além desses estudos, a

atividade biológica foi avaliada, onde se concluiu que a precipitação isoelétrica com CO₂ em soluções aquosas de NaHCO₃ não provoca a desnaturação da insulina.

2.3. Insulina e sua cristalização

A insulina é um hormônio que participa do metabolismo dos carboidratos e é essencial para o processo que fornece energia às células do corpo. A falha na produção de insulina é a principal causa da doença diabetes mellitus, a terceira maior causa de mortes em países industrializados depois das doenças cardiovasculares e do câncer (HARRISON *et al.*, 2003).

O hormônio terapêutico insulina é uma pequena proteína usada diariamente no tratamento médico de diabetes por milhões de pessoas. A rota preliminar de administração é feita por injeções subcutâneas de microcristais ou misturas de microcristais e proteína amorfa. Depois da injeção subcutânea, os cristais de insulina dissolvem-se vagarosamente levando então a liberação de insulina para a corrente sanguínea. Desde a descoberta da sua função biológica em 1920, a molécula tem sido amplamente caracterizada. A sua estrutura cristalográfica foi uma das primeiras estruturas de proteínas determinada. O tipo, tamanho e morfologia dos cristais afetam o tempo de liberação da insulina. Por essa razão a cristalização de insulina tem sido extensivamente estudada (NORRMAM, 2007).

Insulina suína é um polipeptídeo que consiste em 51 aminoácidos arranjados em duas cadeias: a cadeia A composta por 21 aminoácidos, e a B com 30 aminoácidos. As cadeias A e B são ligadas por duas pontes de dissulfeto. A insulina suína tem uma massa molecular de 5.808 Da e ponto isoelétrico 5,4 (HARRISON *et al.*, 2003; BROMBERG *et al.*, 2005).

A seqüência de aminoácidos da insulina obtida de diferentes espécies é similar, mas não idêntica. A insulina suína (C₂₅₆H₃₇₇N₆₅O₇₅S₆, Figura 2.3) difere da insulina humana (C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆) apenas por um aminoácido na cadeia B – a insulina humana possui uma treonina na posição B30, enquanto a suína tem uma alanina. Já a insulina bovina difere do hormônio humano por 3 aminoácidos (2 aminoácidos na cadeia A, posição A8 e A10 e 1 na cadeia B, posição B30 – a insulina humana possui treonina, isoleucina e treonina, respectivamente, enquanto a bovina possui alanina, valina e alanina) (LADISCH, 2001).

Assim como a seqüência de aminoácidos, o tipo de cristal de insulina também depende da espécie. De acordo com Schlichtkrull (1956), os cristais de insulina suína possuem forma romboédrica (Figura 2.4), enquanto os tipos de cristal de insulina bovina mostram uma aparência “twinned” (tipo estrela).

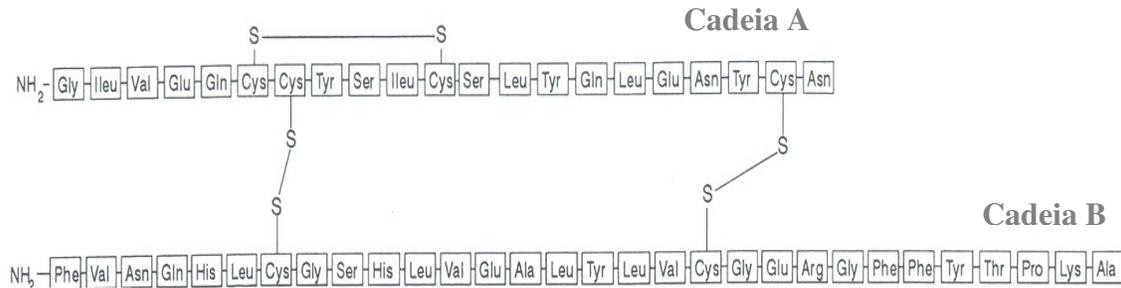


Figura 2.3 – Seqüência de aminoácidos da insulina suína (adaptado de Walsh e Headon, 1994).

A primeira cristalização de insulina, conhecida há muitos anos e usada em sua purificação, citada por Schlichtkrull (1956), foi feita por Abel em 1926 e a cristalização de insulina com zinco, em 1929 por Hartig. Schlichtkrull (1956) descreveu a cristalização de insulina suína e bovina em tampão citrato pH 6,0 na presença de acetona.

Segundo Dodson *et al.* (1978), cristais de insulina suína normalmente são obtidos em pH cerca de 6,5 na presença de cátions divalentes. Esses autores conseguiram cristais cúbicos de insulina suína livre de zinco crescidos na presença de cresol, fenol, tolueno e xileno. Sakabe *et al.* (1985) obtiveram cristais de insulina suína zíncica em pH 6,2 da mistura de 1,0% de insulina suína zíncica, acetona 12,5%, 0,042 mol/L de citrato de sódio e 0,01 mol/L de HCl. Yip *et al.* (1998) utilizaram pH 6,25; Ladisch (2001) descreveu o processo de cristalização em pH 5,9 e Crowfoot (1935) usou valores de pH 6,2 e 6,5, todos na presença de zinco.

Wintersteiner e Abramson (1933) cristalizaram insulina usando o método de Abel (soluções com amônia, piridina, brucina e ácido acético em alta concentração) com o interesse de determinar o ponto isoelétrico da insulina cristalina, comparar os resultados

com as medidas de solubilidade e determinar o ponto máximo de precipitação (Figura 2.5). Na faixa de pH 4,6 a 6,5 a solubilidade é muito baixa, entre 3,1 e 4,0 µg/mL.

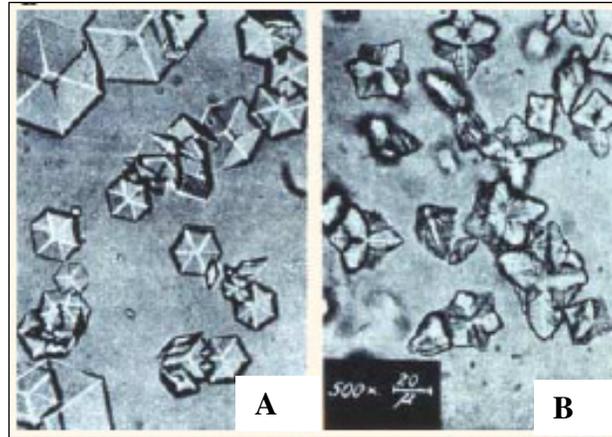


Figura 2.4 – Cristais de insulina suína romboédricos (A) e cristais de insulina bovina “tipo estrela” (B) (SCHLICHTKRULL, 1956).

A insulina cristalizada primeiramente na forma romboédrica por Abel mostrou um rendimento de cristais tão variável que havia muitas dúvidas sobre sua identidade com o hormônio. Isso foi o indício de que o pâncreas continha zinco, presente nas preparações impuras, mas algumas vezes ausentes que levaram a descoberta de que os cristais romboédricos eram um complexo de insulina-zinco. A quantidade de átomos de zinco nos cristais de insulina (2 átomos de zinco para cada seis moléculas de insulina – um hexâmero) foi descoberta durante estudos de crescimento de cristais regulares de insulina para administração no tratamento clínico de diabetes (SCHLICHTKRULL, 1956). A solução dos cristais fornece um método de retardamento da ação da insulina que se assemelha a métodos adotados no próprio pâncreas para liberação e armazenagem de insulina. O cristal de insulina é muito mais solúvel em pH alto e alta força iônica.

O hexâmero (Figura 2.6), presente nos cristais de insulina é um fato característico de soluções de insulina em faixas neutras ou moderadamente alcalinas, contanto que zinco ou outros cátions divalentes estejam presentes. Nesta faixa de pH a proporção de hexâmeros aumenta com a quantidade de zinco, de poucos centésimos para cerca de 0,35%,

ou 2 átomos de zinco por hexâmero. A insulina se liga ao zinco continuamente com o aumento do pH na faixa de 4,5 a 8,0 podendo conter até 7 átomos de zinco por hexâmero para pH igual a 8,0. A população de hexâmero é estável acima de 2 átomos de zinco por hexâmero. A quantidade de átomos de zinco ligados à insulina em solução ou no cristal é fortemente dependente do pH e sofre um aumento com a variação do pH na faixa de 6,0 a 8,0. Com o aumento do pH acima de 8,0 a dissociação da insulina e zinco torna-se novamente predominante, até mesmo na presença de altas concentrações de zinco (3-6 átomos por hexâmero). Abaixo da faixa de pH de 3,5-4,5, o zinco não se liga totalmente e a proporção de dímeros aumenta com a diminuição do pH, concentração e força iônica. Estudos feito por Jeffrey e Coates (1966) mostraram uma população máxima de dímeros perto de pH 2,0 em NaCl 0,05-0,10 mol/L para uma concentração de 0,1-0,25%. A Figura 2.7 contém uma representação da associação dos monômeros em dímeros e hexâmeros (BLUNDELL *et al.*, 1972).

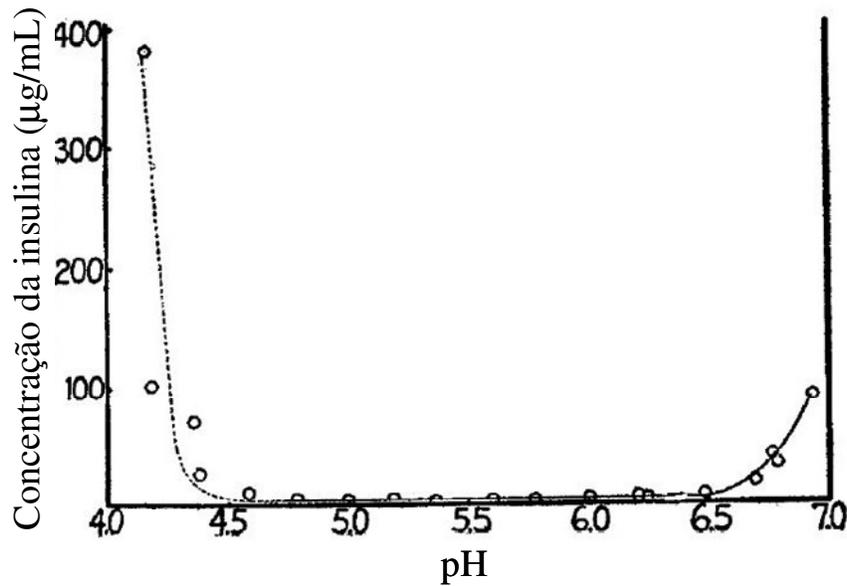


Figura 2.5 – Curva de solubilidade dos cristais de insulina em tampão acetato (adaptado de Wintersteiner e Abramson, 1933).

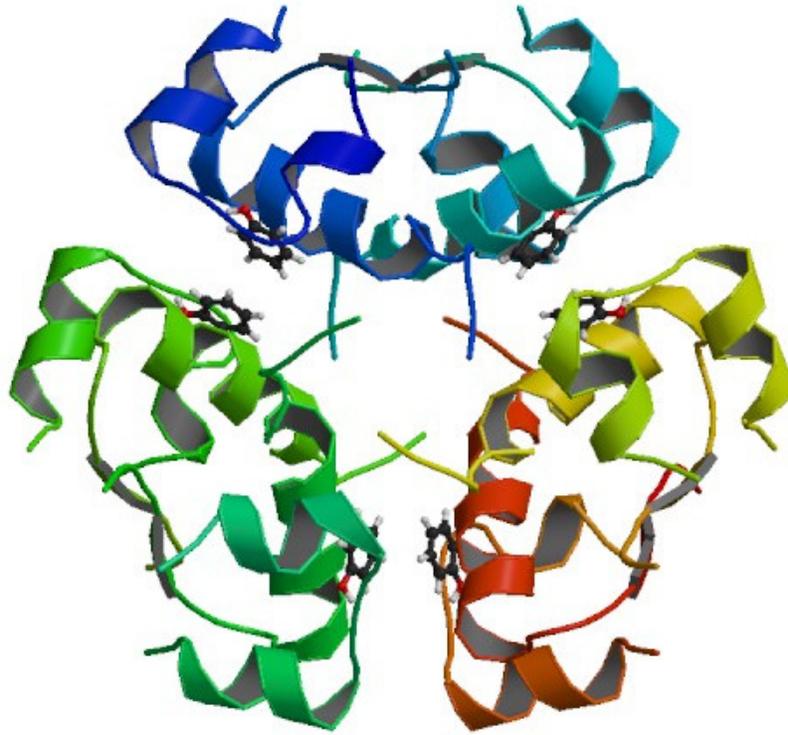


Figura 2.6 – Representação do hexâmero da insulina zínica, que constitui a unidade de crescimento dos cristais de insulina. Estrutura do PDB – Protein Data Bank, arquivo 3AIY (O'DONOGHUE *et al.*, 2000).

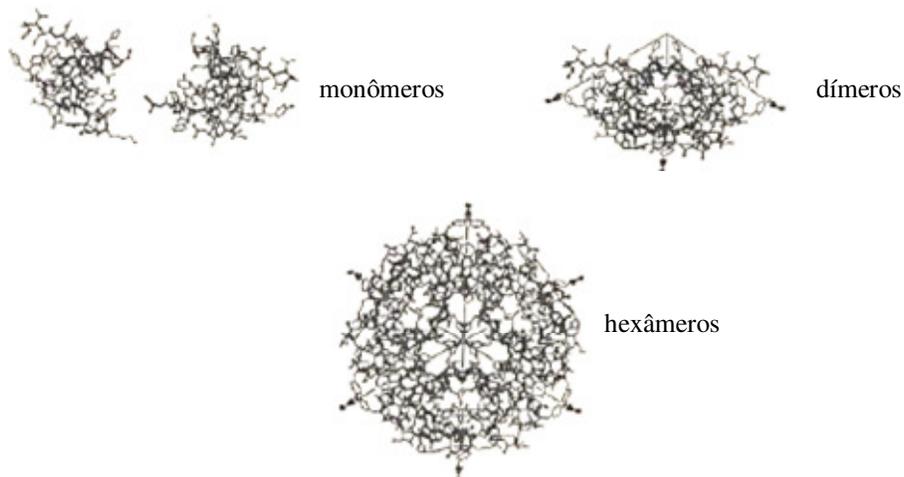


Figura 2.7 - Estrutura molecular da insulina - estrutura do monômero, dímero e hexâmero (modificado de Hodgkin, 1974).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

A insulina suína (96,6% de pureza e 0,55% de zinco) utilizada no presente trabalho foi doada pela Biobrás (Montes Claros, MG). O bicarbonato de sódio foi adquirido da J. T. Baker (México), o dióxido de carbono da White Martins Gases Industriais, Campinas/SP com 99,8% de pureza e o cloreto de zinco da Vetec Química Fina (Brasil). As soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 foram adquiridas da Merck (Alemanha). Água ultrapura foi obtida com o equipamento Milli-Q System (Millipore, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Equipamento utilizado nos ensaios de dissolução e cristalização com dióxido de carbono

O equipamento utilizado neste trabalho foi o mesmo equipamento de precipitação de proteínas com eletrólitos voláteis utilizado por Tashima *et al.* (2009), tendo sido projetado e construído pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, coordenado pelo Prof. Dr. Everson Alves Miranda (Faculdade de Engenharia Química da Unicamp), com a colaboração do Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho (Departamento de Engenharia Química da USP) e pela empresa Autic Automação e Instrumentação Industrial (Campinas, SP).

O equipamento (Figuras 3.1 e 3.2) possui um vaso de pressão cilíndrico com fundo em forma de calota em aço inox 316 com volume interno de 340 mL, diâmetro de 5,5 cm, uma janela de quartzo (Autoclave Engineers, EUA), para visualização da parte interna do reator, sistemas de agitação (Figura 3.3) magnética e hélice de pás inclinadas (quatro pás com inclinação de 45°) com agitação de 120 a 720 rpm e 0 a 300 rpm, respectivamente.

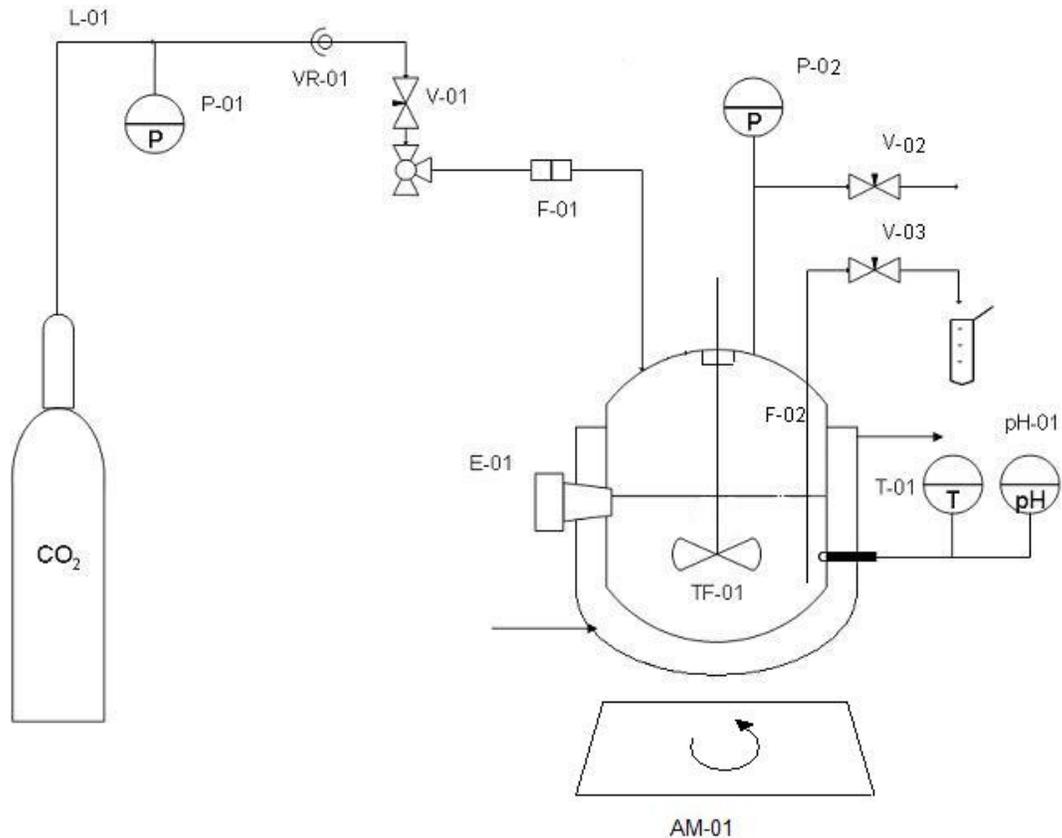


Figura 3.1 – Desenho esquemático do equipamento utilizado nos ensaios realizados. L-01: linha de entrada de CO₂; P-01: manômetro da linha de entrada; VR-01: válvula de retenção; V-01: válvula micrométrica de entrada; F-01: filtro de linha; E-01: janela de quartzo para observação; TF-01: impelidor para agitação da solução; F-02: tubulação de retirada da fase líquida para amostragem; P-02: manômetro do reator; V-02: válvula micrométrica da fase vapor; V-03: válvula micrométrica da fase líquida; T-01: termopar da fase líquida; pH-01: sensor de pH do reator; AM-01: agitador magnético (Modificado de Tashima, 2007).



Figura 3.2 – Imagem do equipamento para a cristalização de proteínas com eletrólitos voláteis.

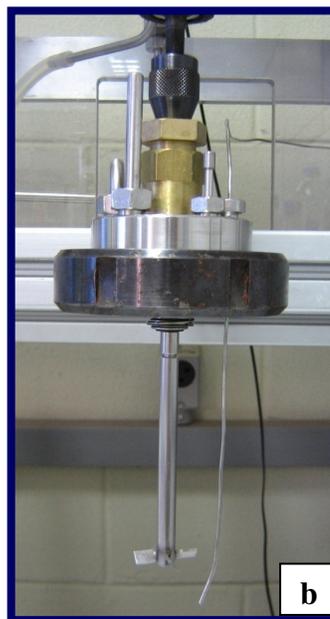
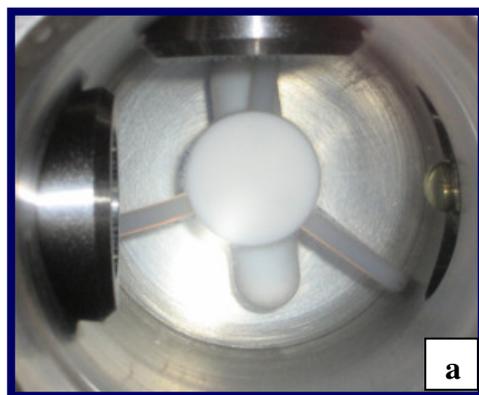


Figura 3.3 – Sistemas de agitação: **a)** barra magnética e **b)** impelidor de pás inclinadas.

A hélice ficava a 2,2 cm do fundo do reator e tinha um diâmetro de 2,7 cm. A agitação magnética era provida por uma placa de agitação Super-Nuova modelo SP131825 (Barnstead International, EUA) e uma barra magnética de 3,8 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro, sustentada por uma fina estrutura, a 1 cm do fundo do reator. A vedação do vaso de pressão era feita na tampa por um conjunto de rosca e anel O'ring. De acordo com o laudo do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT-São Paulo, SP), o vaso de pressão suporta em teste hidráulico uma pressão de 250 bar a 20°C sem vazamentos. A janela de quartzo, segundo o fabricante, resiste até a pressão de 413 bar a 238°C.

A temperatura do reator era controlada (com precisão de $\pm 0,2^\circ\text{C}$) por uma jaqueta térmica, alimentada com água pelo banho termostaticado TE-2000 (Tecnal, Piracicaba, SP). A pressão no reator era medida com precisão de $\pm 0,15$ bar pelo transmissor de pressão digital PSI-420 (Zurich Indústria e Comércio, São Paulo, SP), operando na faixa de 0 a 60 bar, e indicada no painel de instrumentação PLN-2 (Zurich Indústria e Comércio, São Paulo, SP). O pH e a temperatura da solução eram medidos com precisões de $\pm 0,03$ e $\pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente, pelo sensor TBX567 (ABB, EUA) e indicados no painel de instrumentação TB84PH (ABB, EUA). A aquisição de dados dos painéis de instrumentação era feita por uma câmera digital modelo Creative Webcam Live! (Creative Labs, EUA) configurada para capturar imagens dos painéis de instrumentação em intervalos de tempo regulares. As imagens eram analisadas e os dados organizados em uma planilha.

3.3. Métodos experimentais

3.3.1. Ensaios preliminares de adequação de condições operacionais de cristalização

O protocolo utilizado para os experimentos iniciais de cristalização de insulina suína com o dióxido de carbono foi adaptado do método convencional cedido pela empresa Biobrás (Montes Claros, MG). Uma massa de insulina suína (500 – 1250 mg) era pesada e colocada em frasco Erlenmeyer junto com 250 mL de solução de bicarbonato de sódio 50 mmol/L. A solução era agitada com barra magnética durante 48 h a temperatura ambiente e, em seguida, filtrada em filtros de seringa Minisart 16534 de porosidade 0,2 μm (Sartorius, Alemanha). Após a dissolução da insulina uma solução de ZnCl_2 20% (1,47 mol/L) era adicionada à solução. A proporção de solução de ZnCl_2 utilizada nos ensaios variava de

acordo com a massa de proteína (para cada grama de proteína, 0,2 mL de solução de ZnCl_2 20%). A concentração final da insulina e do ZnCl_2 era de 2 mg/mL ($3,44 \cdot 10^{-4}$ mol/L) e 30 $\mu\text{g/mL}$ ($2,21 \cdot 10^{-4}$ mol/L de ZnCl_2), respectivamente. Realizaram-se também ensaios com concentrações de proteína de 5 mg/mL ($8,61 \cdot 10^{-4}$ mol/L) e ZnCl_2 de 68,5 $\mu\text{g/mL}$ ($5,03 \cdot 10^{-4}$ mol/L de ZnCl_2). A razão molar foi de aproximadamente 0,60 moles de Zn^{2+} para 1 mol de insulina, cerca de duas vezes a estequiometria do cristal zíncico, 0,33:1.

Em seguida, separava-se uma alíquota de 1 mL da solução de insulina em bicarbonato de sódio em tubo Eppendorf (1,5 mL) para análise da concentração inicial de proteína. O restante da solução era colocado no reator e a temperatura da jaqueta ajustada em 15°C. O reator era fechado e as válvulas de entrada e saída de CO_2 eram abertas durante 5 min para que o ar presente no interior do reator fosse substituído pelo CO_2 . As válvulas eram então fechadas e iniciava-se a agitação do sistema para acidificar a solução com a dissolução do CO_2 da fase gasosa e, assim, atingir o pH desejado (pressão máxima utilizada ≤ 5 bar). A agitação era mantida durante 5 h e ao fim desse tempo de agitação a temperatura da camisa era ajustada para 5°C e a solução ficava em repouso durante 19 ou 120 h (tempo de repouso de acordo com o protocolo industrial adotado).

Os dados de pH, indicados no painel de instrumentação eram capturados pela câmera digital e os dados organizados em uma tabela. As amostras da solução protéica eram retiradas através da válvula V-03 (Figura 3.1), com a ajuda de uma seringa, em intervalos de tempo definidos. Previamente às coletas, um volume de 1,0 mL era retirado do sistema como purga para a limpeza da tubulação usada na amostragem. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 7.000g para separar o precipitado do sobrenadante no qual se fazia a determinação da concentração da proteína na fase sobrenadante. O precipitado era utilizado para caracterização visual das partículas e medida de tamanho.

3.3.2. Ensaios exploratórios de cristalização de insulina suína

O procedimento dos ensaios exploratórios de cristalização foi similar ao descrito no item 3.3.1. com duas modificações básicas: a) em alguns ensaios a temperatura foi mantida fixa a 15°C com agitação e sem o repouso a 5°C e b) devido à dissolução lenta da insulina em NaHCO_3 , decidiu-se dissolvê-la com HCl, pois sabe-se que a proteína é facilmente

dissolvida em pH ácido. Assim, quantidades de aproximadamente 500 mg de insulina suína eram colocadas em um béquer (300 mL) junto com 100 mL de solução de HCl 10 mmol/L e a suspensão era agitada por uma barra magnética. Após a dissolução completa da proteína (cerca de 5 min), 125 mL de bicarbonato de sódio 100 mmol/L e 25 mL de água eram acrescentados ao béquer. Em seguida, a solução era filtrada em filtros de seringa Minisart 16534 de porosidade 0,2 μm (Sartorius, Alemanha) e o ZnCl_2 20% (1,47 mol/L) era adicionado à solução.

Em alguns ensaios iniciais a agitação no reator era feita com a barra magnética, mas posteriormente se instalou no reator um impelidor de pás inclinadas. Ao fim da agitação, a temperatura da jaqueta térmica do reator era ajustada para 5°C e a solução era mantida em repouso durante 19 ou 40 horas.

3.3.3. Determinação da solubilidade da insulina suína a 15°C por ensaios de dissolução

Nos ensaios de dissolução uma massa de 500 mg de insulina suína era colocada no reator e adicionava-se 25 mL de água, 125 mL de NaHCO_3 100 mmol/L, 100 mL de HCl 10 mmol/L e 71,4 μL de solução de ZnCl_2 20%. O reator era fechado e o dióxido de carbono adicionado para o ajuste do pH pelo mesmo procedimento de ajuste de pH descrito no item 3.3.1. Amostras eram coletadas em intervalos de tempo definidos para determinar a concentração de insulina na fase sobrenadante. As solubilidades da insulina em diferentes valores de pH foram determinadas como sendo as concentrações de equilíbrio atingidas em cada ensaio. A Figura 3.2 apresenta os passos seguidos nos ensaios de dissolução da insulina.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Determinação da concentração de proteína

A concentração da insulina suína em solução foi determinada por dois métodos: pela medida de absorvância a 280 e 320 nm e pelo método de Bradford (1976) modificado. As absorvâncias de 280 e 320 nm foram medidas em cubetas de quartzo e a diferença entre elas foi utilizada para eliminar o efeito da turbidez no cálculo da concentração, como

proposto por Gehle e Schügel (1984). Para a medida de concentração da proteína pelo método modificado de Bradford, de maior sensibilidade, utilizou-se o reagente Coomassie Plus (Pierce, EUA) tendo-se a própria insulina suína como referência para obtenção da curva padrão. As medidas de absorbância foram feitas no espectrofotômetro Beckman DU 640 (Beckman Instruments, EUA).

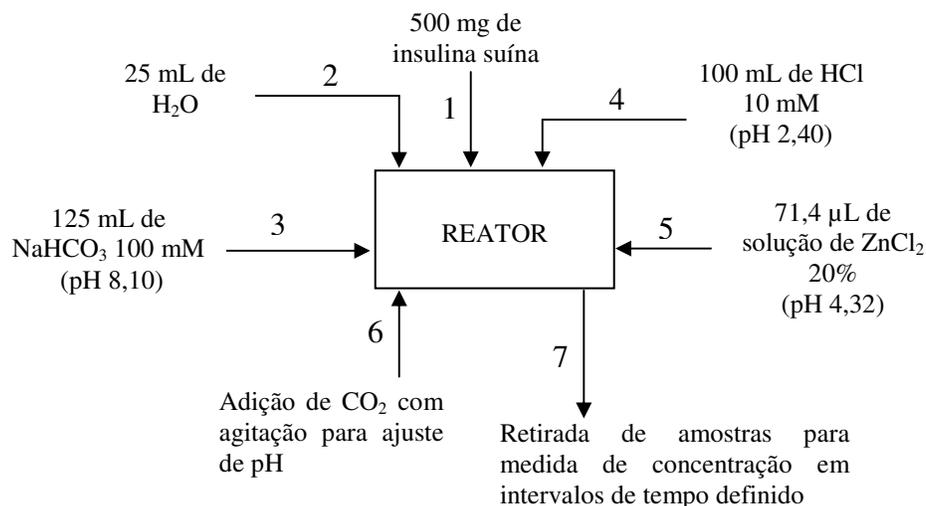


Figura 3.4 – Diagrama esquemático dos passos seguidos nos ensaios de dissolução. Os números indicam a ordem de adição dos reagentes no reator. Os reagentes foram mantidos a 15°C por 15 h antes da adição no reator já a 15°C.

3.4.2. Medida da quantidade de Zn da insulina suína

O teor de Zn presente na insulina suína (0,55%) foi determinado por espectrometria de absorção atômica, modo chama, no equipamento AAnalyst 300 (Perkin Elmer, EUA), do Laboratório de Análises Químicas coordenado pela Prof^a. Dr^a. Virgínia Ciminelli do Departamento de Engenharia Metalúrgica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG).

3.4.3. Análise dos cristais por microscopia óptica e difração a laser

A distribuição de tamanho dos cristais foi analisada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, utilizando-se o equipamento Mastersizer S (Malvern, UK). A técnica se baseia no

espalhamento da luz laser pelas partículas da amostra, sendo o tamanho inversamente proporcional ao desvio do ângulo da luz espalhada. A faixa de tamanho medido pelo equipamento é de 0,05 a 900 μm . O resultado da análise é a distribuição do tamanho das partículas representada sob a forma de gráfico e tabela com dados de tamanho médio e erro da medida, percentagem volumétrica e tamanho correspondente, tamanhos de partículas em que 10 e 90% da amostra estão abaixo dos valores dados, entre outros. Para a análise foram utilizados cerca de 2 mL do produto final dispersos em cerca de 300 mL de álcool etílico.

A morfologia e o tamanho dos cristais foram obtidos por análise de imagem utilizando-se um microscópio biológico trinocular (modelo Tim-108, Opton, Brasil) com aumento de 40 até 1600X. Os tamanhos das partículas foram medidos pelo programa “UTHSCSA Image Tool” (versão 3.00, UTHSCSA, EUA). Esse método de análise de imagem por microscopia permite a medida de partículas com tamanhos de até 240 μm . Os cristais, de uma amostra de aproximadamente 10 μL , eram fotografados por uma câmera digital para serem medidos posteriormente com o auxílio do programa. A medida era feita a partir de uma ferramenta digital do programa calibrada com uma régua de 1 mm no aumento de 400X (o mesmo aumento utilizado para visualizar os cristais no microscópio).

3.4.4. Análise da mudança de morfologia dos cristais por calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As análises térmicas com DSC foram realizadas no equipamento modelo 2920 da TA Instruments (EUA) do Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio (Extrae) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, por cortesia do Prof. Dr. Antônio José de Almeida Meirelles. Essas análises fornecem informações sobre os efeitos térmicos que são caracterizados por uma mudança na entalpia e pela faixa de temperatura (por exemplo, comportamento de fusão, cristalização, transições sólido-sólido). A técnica mede a diferença no fluxo de calor entre uma substância e a referência como uma função da temperatura da amostra. A curva no DSC é dada em termos de temperatura na ordenada e miliwatts por miligramas na abscissa. Para cada ensaio, uma pequena quantidade de insulina foi utilizada, cerca de 3 a 8 mg. A taxa de aquecimento utilizada em todos os ensaios foi de 5°C/min a pressão atmosférica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo apresenta os resultados dos experimentos realizados. No item 4.1., são apresentados e discutidos os ensaios preliminares utilizados na determinação das condições de cristalização da insulina suína com CO₂ uma vez que, este trabalho (sendo pioneiro) não possui paralelo a não ser o trabalho de precipitação isoelétrica de insulina suína com CO₂ de Tashima (2007). Uma vez obtidos os primeiros cristais, ensaios exploratórios de cristalização (item 4.2.) foram realizados empregando dois sistemas de agitação, hélice e agitador magnético, para avaliar a influência do tempo de repouso e o tipo de agitador sobre o tamanho e morfologia dos cristais. A seguir, relata-se a determinação da solubilidade da insulina a 15°C no sistema NaHCO₃/ZnCl₂/CO₂ (medida a partir de ensaios de dissolução) e a determinação das cinéticas de dissolução, crescimento e nucleação dos cristais como função da supersaturação.

4.1. Adequação de condições operacionais da cristalização

Os ensaios iniciais de cristalização descritos a seguir foram baseados em um protocolo industrial de cristalização de insulina suína como uma maneira de se ter certeza de obter cristais e assim ajustar o equipamento e as metodologias empregadas neste trabalho.

Segundo a literatura, cristais de insulina suína normalmente são obtidos na faixa de pH 6,0 a 6,5 na presença de cátions divalentes (CROWFOOT, 1935; SCHLICHTKRULL, 1956; DODSON *et al.*, 1978; SAKABE *et al.*, 1985; YIP *et al.*, 1998 e LADISCH, 2001). Tashima *et al.* (2007) precipitaram insulina com CO₂, entretanto, em seu trabalho não há relatos de cristais, provavelmente por causa da baixa concentração de proteína empregada, cerca de 1 mg/mL, pequena quantidade de zinco na solução (apenas o zinco presente nos cristais) e valores de pH muito próximos ao ponto isoelétrico da insulina, 5,4. Assim, nos

primeiros ensaios se ajustou a concentração de zinco para 1,47 mol/L (de modo que a concentração final de zinco em solução – zinco presente nos cristais + zinco adicionado na solução – ficasse próximo ao valor estabelecido pelo protocolo industrial, ou seja, quase duas vezes a estequiometria requerida para o cristal zíncico, 0,33 mol de Zn^{2+} para 1 mol de insulina), utilizou-se valores de pH maiores relatados em vários trabalhos de cristalização de insulina e testou-se duas concentrações diferentes.

Foram feitos quatro experimentos nas mesmas condições, exceto para a concentração de insulina suína e tempo de repouso, sendo dois ensaios (A1 e A2) a cerca de 2 mg/mL e 19 h, e outros dois (B1 e B2) a cerca de 5 mg/mL e 120 h de repouso (Figuras 4.1, 4.2 e Tabela 4.1). Os valores finais de pH não foram exatamente iguais para as diferentes concentrações iniciais de insulina. Durante o processo de acidificação notou-se a influência da concentração da proteína no valor de pH final, colocando em evidência a capacidade tamponante da insulina como função da sua concentração. Esse efeito tamponante já havia sido observado por Hofland *et al.* (1999 e 2000) para a caseína e a soja precipitada com CO_2 . Porém, Tashima *et al.* (2007) mostraram que, para baixas concentrações – 0,5 a 1,0 mg/mL – a insulina suína apresenta baixa capacidade tamponante e pouca dependência do pH de equilíbrio em relação à concentração inicial, mas nesses experimentos as concentrações iniciais de insulina foram ≥ 2 mg/mL.

Nos ensaios A1 e A2, após a adição de $ZnCl_2$ 20% (71,4 μ L), houve queda no pH da solução de 8,37 para 8,32 e formação de precipitado que se dissolvia rapidamente com a agitação. Os cristais obtidos nos ensaios A1 e A2 (Figura 4.2) têm formato romboédrico e tamanho médio de 11,69 μ m e 11,50 μ m, respectivamente. Quanto aos ensaios B1 e B2, não foi possível realizar medidas de concentração e de tamanho por difração a laser devido à solução ter-se transformado em gel o que impossibilitou a separação precipitado/sobrenadante.

Os ensaios B1 e B2, também tiveram como objetivo testar o uso de concentrações maiores, cerca de 5 mg/mL, pois assim a quantidade de proteína recuperada seria maior para um mesmo volume de solução ou ainda, o tamanho dos cristais poderia ser diferente. O volume de solução de $ZnCl_2$ 20% adicionado à solução era de 178,5 μ L. Nestes ensaios, a solução era deixada em repouso durante 120 h a 5°C.

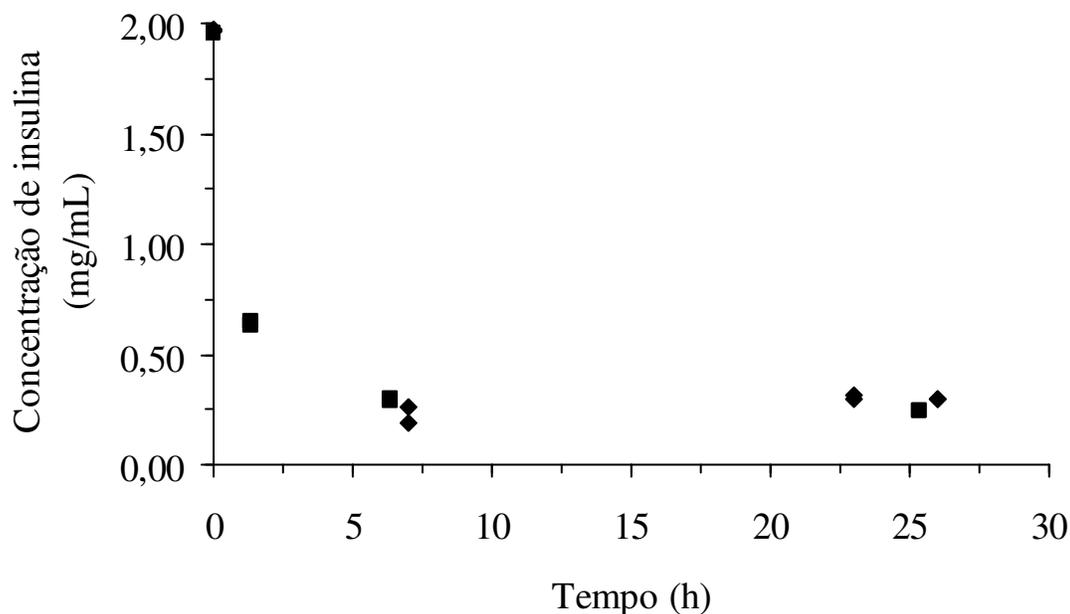


Figura 4.1 – Ensaio de adequação de condições operacionais de cristalização de insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L em atmosfera de CO_2 a 5°C . Perfis de concentração da insulina com o tempo para concentração inicial de 2 mg/mL e pH final: 6,48 (◆) A1; pH 6,41 (■) A2.

No decorrer dos experimentos, o pH da solução variou durante os 5 dias, de 7,86 a 7,26 para o ensaio B1 e de 7,60 a 7,10 para o ensaio B2. Depois da despressurização do reator, observou-se que a solução estava em forma de gel. A solução foi retirada e centrifugada durante 30 min a 7.000g. O gel foi observado no microscópio e pelas imagens, já apresentadas na Figura 4.2, notou-se a presença de cristais de tamanhos variados.

A gelificação da solução poderia ser justificada por um processo de agregação que envolve a interação entre dois ou mais monômeros de insulina sendo facilmente reversível pela redução da concentração. Sobre influência de calor e exposição das superfícies hidrofóbicas, a insulina pode sofrer mudanças na sua conformação, resultando em agregações lineares e formação de gel viscoso ou um precipitado insolúvel. No entanto, nas amostras B1 e B2 havia gel e cristais. A insulina também é conhecida por agregar-se na presença de excesso de Zn^{2+} em valores de pH acima de 4,0. Porém, a possibilidade da solução ter gelificado pelo excesso de Zn^{2+} poderia ser descartada, pois a quantidade de Zn

é proporcional à massa de insulina e para os ensaios com concentração menor de insulina, não houve a formação de gel (BRANGE *et al.*, 1997).

Os resultados mostraram que a técnica de acidificação da solução por meio de eletrólitos voláteis permite a cristalização de insulina suína a relativas baixas pressões. Para a insulina suína no sistema $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ houve a gelificação da solução, resultado de uma nucleação excessiva, que também formou cristais. Com concentrações maiores há a possibilidade de obter sistemas com supersaturações muito altas, o que favorece a formação de muitos núcleos. Devido a essa formação de gel, apenas a concentração de 2 mg/mL foi empregada para os ensaios posteriores devido à dificuldade de se trabalhar com soluções gelatinosas.

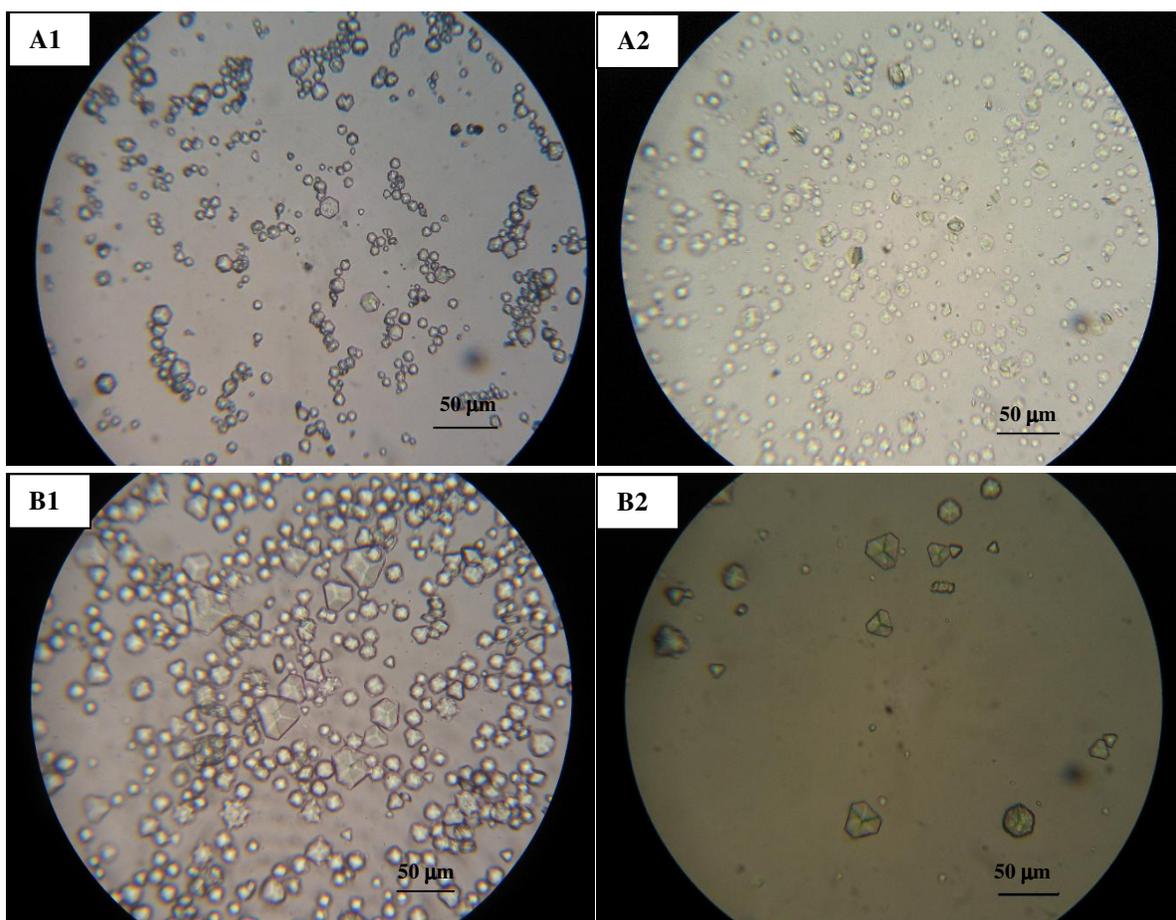


Figura 4.2 – Fotomicrografias dos cristais de insulina suína obtidos a 5°C a partir de solução de NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 sob atmosfera de CO_2 a pH final: 2mg/mL e pH 6,48 (A1), pH 6,41 (A2); 5mg/mL e pH 7,26 (B1) e pH 7,10 (B2) (ampliação de 400X).

Tabela 4.1 - Condições iniciais e finais dos ensaios de cristalização de insulina suína em $\text{NaHCO}_3/\text{ZnCl}_2/\text{CO}_2$ baseado em protocolo industrial.

Ensaio	A1	A2	B1	B2
C_i^* (mg/mL)	1,98	1,96	4,71	4,83
C_{Zn} ($\mu\text{g/mL}$)	30,00	30,00	68,50	68,50
$\text{pH}_{15^\circ\text{C}} - \text{pH}_{5^\circ\text{C}}$	6,46 – 6,48	6,39 – 6,41	7,86 – 7,26	7,54 – 7,10
C_f (mg/mL)*	0,30	0,24	-	-
Tamanho médio (μm)	11,60 \pm 0,49	11,50 \pm 0,37	-	-
10% _a	4,36	5,10	-	-
90% _b	20,60	18,46	-	-
Recuperação (%)	85	88	-	-

* Razão molar Insulina-Zinco: A1 e A2 = 1:0,64; B1 e B2 = 1:0,58.

C_i - concentração inicial da proteína na solução.

C_{Zn} - concentração inicial de Zn.

$\text{pH}_{15^\circ\text{C}} - \text{pH}_{5^\circ\text{C}}$ - pH final para os períodos a 15°C e 5°C.

C_f - concentração final da proteína na solução.

a - 10% da amostra estão abaixo do tamanho indicado.

b - 90% da amostra estão abaixo do tamanho indicado.

4.2. Ensaios exploratórios de cristalização de insulina suína

O propósito dos ensaios descritos a seguir (realizados de acordo com o item 3.3.2.) foi inicialmente verificar a influência do tempo de repouso da solução a 5°C no tamanho e tipo final dos cristais obtidos. No entanto, estudaram-se também a cinética de cristalização da insulina suína pelo CO₂ através das medidas de concentração da proteína na fase sobrenadante e os efeitos do sistema de agitação (magnética a 120 rpm e impelidor a 65 rpm) e de diferentes tempos de repouso a 5°C (19 e 40 h).

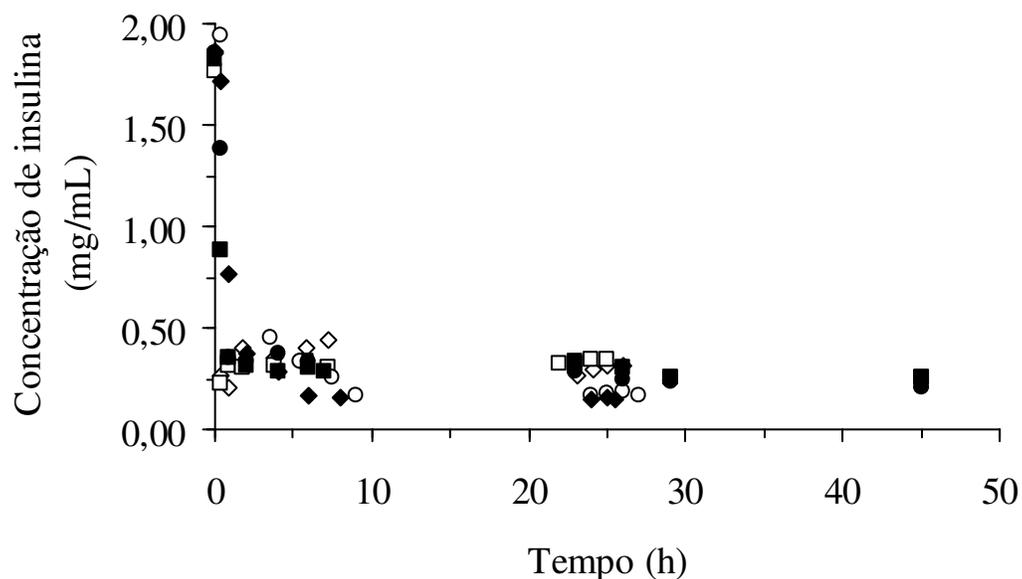
Em todos os ensaios houve uma forte diminuição na concentração inicial da insulina logo nos primeiros 20 min de acidificação com o CO₂ em função da queda do pH da solução (Figura 4.3), provocando uma alteração na solubilidade da proteína e consequente cristalização.

Com os cristais obtidos em cada experimento realizava-se a análise de distribuição de tamanhos para avaliar se a distribuição das partículas era uniforme e também se o tamanho final dos cristais variava com o tempo de repouso da solução ou com o tipo de agitação – barra magnética e hélice de pás inclinadas (Tabela 4.2).

Nos ensaios realizados com a agitação magnética, o tamanho dos cristais foi significativamente menor, entre 7,50 e 10,56 µm, enquanto que agitação com o impelidor de pás inclinadas rendeu cristais com tamanhos entre 14,80 a 19,58 µm. No ensaio C6, a amostra analisada no microscópio mostrou muitas partículas quebradas e poucos cristais. Apesar do tamanho diferenciado dos cristais para cada ensaio, a forma dos cristais se manteve constante e semelhante aos cristais romboédricos de insulina zíncica observados por Schlichtkrull (1956) (Figura 4.4).

O tamanho diferente dos cristais resulta provavelmente do tipo de agitação empregada. O menor tamanho dos cristais obtidos com o agitador magnético pode ser atribuído à quebra provocada pela maior velocidade de agitação (120 rpm) quando comparado ao impelidor (65 rpm). Além disso, a estrutura da barra magnética favorece o impacto frontal com os cristais, ao contrário do impelidor que favorece o fluxo desses cristais acima das pás. Baseando-se nos resultados apresentados, o impelidor foi o sistema escolhido para a realização dos ensaios posteriores.

a)



b)

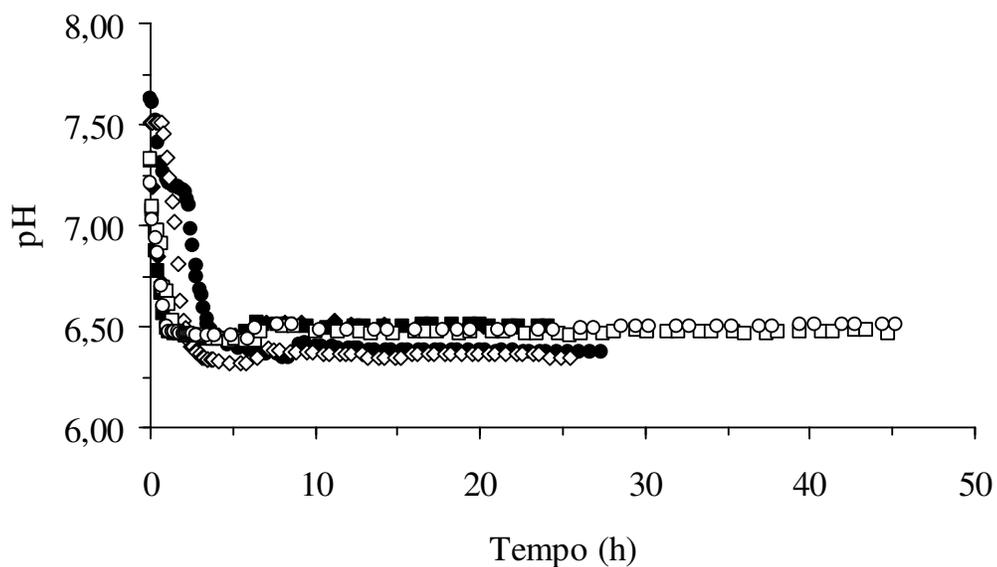


Figura 4.3 – Ensaio exploratório de cristalização de insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 5°C . **a)** Perfis de concentração da insulina com o tempo e **b)** variação do pH das soluções de insulina. \diamond , ensaio C1, pH_{final} 6,50; \square , ensaio C2, pH_{final} 6,50; \circ , ensaio C3, pH_{final} 6,37; \blacklozenge , ensaio C4, pH_{final} 6,35; \blacksquare , ensaio C5, pH_{final} 6,46; \bullet , ensaio C6, pH_{final} 6,51.

Tabela 4.2 - Ensaios de cristalização de insulina suína com CO₂ em solução de NaHCO₃/ZnCl₂.

Ensaio	C1	C2	C3	C4	C5	C6
C_i (mg/mL)	1,86	1,77	1,85	1,85	1,83	1,85
t_{15°C} - t_{5°C}	5 - 19	5 - 19	5 - 19	4 - 19	5 - 40	5 - 40
pH_{15°C} - pH_{5°C}	6,45 – 6,50	6,47 – 6,50	6,35 – 6,37	6,32 – 6,35	6,43 – 6,46	6,44 – 6,51
Sistema de agitação	magnética		impelidor			
Tamanho médio (µm)	7,50 ± 0,34	10,56 ± 0,34	16,73 ± 0,43	14,87 ± 0,44	19,58 ± 0,81	6,05 ± 0,45
10% ^a	1,38	5,31	5,50	5,98	3,48	1,43
90% ^b	11,49	16,43	28,75	25,23	41,72	9,74
C_f (mg/mL)	0,309	0,345	0,168	0,149	0,251	0,201
Recuperação (%)	83	85	92	93	88	90

a: 10% da amostra estão abaixo do tamanho indicado.

b: 90% da amostra estão abaixo do tamanho indicado.

C_i: concentração inicial da proteína.

C_{Zn}(concentração inicial de Zn): 30 (µg/mL).

C_f: concentração final da proteína.

pH_{15°C} – pH_{5°C}: pH final em t_{15°C}, t_{5°C} - tempo em que a solução foi mantida a 15°C e a 5°C, respectivamente.

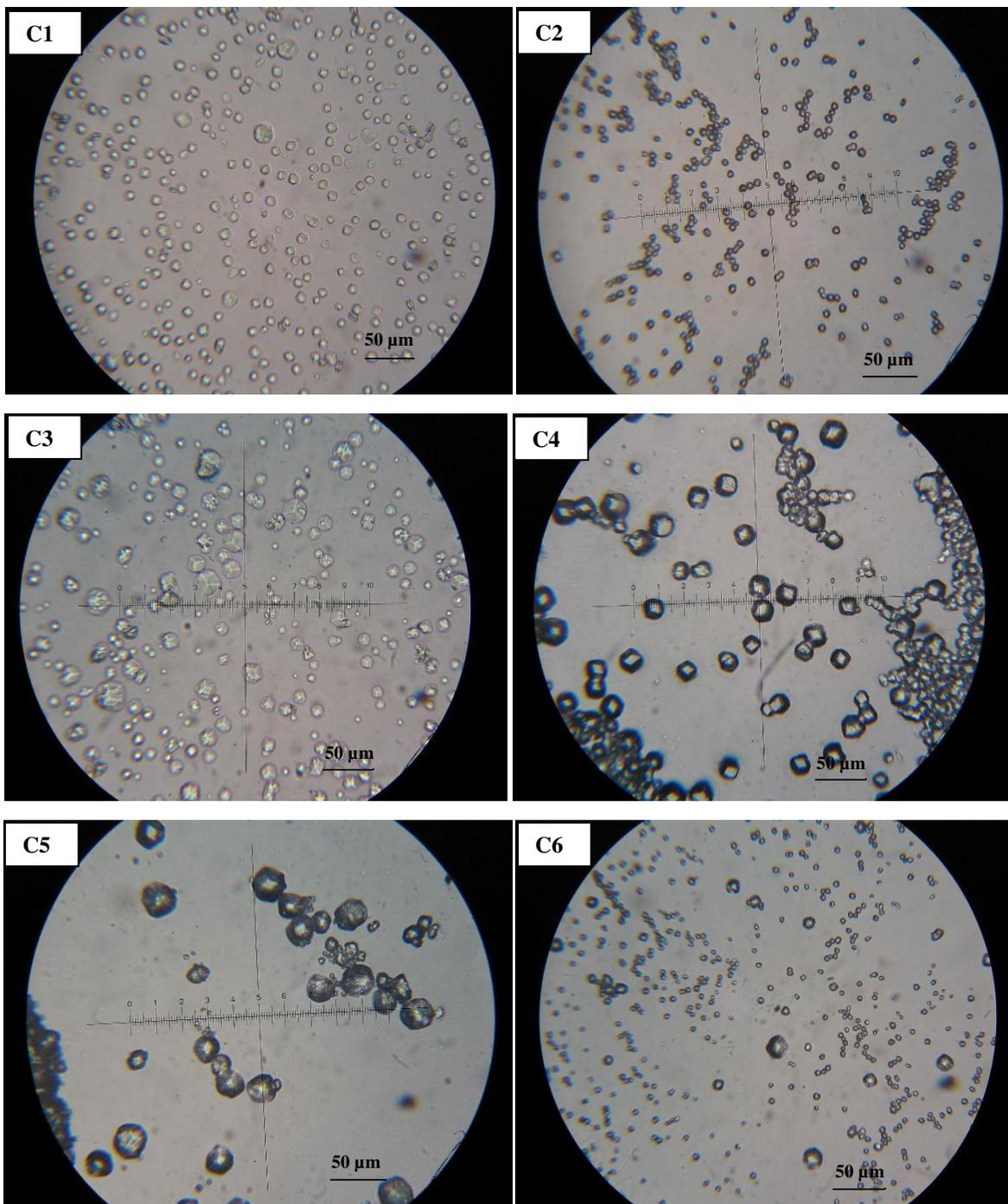


Figura 4.4 – Fotomicrografias dos cristais de insulina suína obtidos a partir de solução de NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 5°C (ampliação de 400X). C1, pH 6,50 (agitação magnética); C2, pH 6,50 (agitação magnética); C3, pH 6,37 (impelidor); C4, pH 6,35 (impelidor); C5, pH 6,46 (impelidor) e C6, pH 6,51 (impelidor).

4.3. Determinação da velocidade de agitação (N_{js})

A condição para velocidade “just suspended” de um sistema de agitação de suspensão de partículas refere-se à mínima agitação para o qual todas as partículas permanecem em suspensão. Na cristalização, regiões com diferentes concentrações podem gerar níveis altos de supersaturação local e conseqüentemente um crescimento não uniforme. O tamanho médio e a distribuição de tamanho são propriedades importantes e dependentes da nucleação e crescimento, processos que também podem ser influenciados pela agitação (PAUL *et al.*, 2004).

Devido à quantidade de insulina disponível e da dificuldade de realizar esses ensaios no próprio reator – por causa da sua estrutura em aço inox – a determinação da velocidade N_{js} foi feita experimentalmente.

Para a realização dos ensaios de dissolução (descritos no item 3.3.3) foram feitos testes com três velocidades diferentes do impelidor. Em um béquer com capacidade de 300 mL, eram adicionados 50 mg de insulina em 250 mL de etanol (melhor dispersão da insulina nesse solvente, o que facilitou a visualização do movimento das partículas). A agitação era iniciada e a massa de cristais observada (Figura 4.5). O recipiente escolhido para determinar a velocidade de agitação apresenta características semelhantes ao reator, como medidas de diâmetro, volume e altura aproximados. O sistema de agitação (impelidor) era exatamente o mesmo utilizado no reator.

Para a velocidade de 10 rpm (Figura 4.5a) notou-se que as partículas maiores decantavam em uma trajetória helicoidal ao redor da hélice até atingirem o fundo do béquer, enquanto as partículas menores ficavam em movimento apenas ao redor da hélice. Na velocidade de 20 rpm (Figura 4.5b), as partículas também decantavam em trajetória helicoidal ao redor da hélice, porém, permaneciam por alguns instantes em suspensão antes de atingirem o fundo do béquer. Uma parte das partículas menores ficava em movimento ao redor da hélice e parte acima dela. Já para a velocidade de 30 rpm (Figura 4.5c), as partículas se distribuíram de forma uniforme pela solução, e as maiores decantavam vagarosamente; quando tocavam o fundo do reator, elas se movimentavam em direção ao centro do béquer subindo lentamente em trajetória helicoidal. Uma velocidade maior que 30 rpm foi testada – 50 rpm – porém, esta velocidade se mostrou bem acima do N_{js} , pois

notou-se forte centrifugação das partículas que se chocavam entre si e com as paredes do vaso e impelidor.

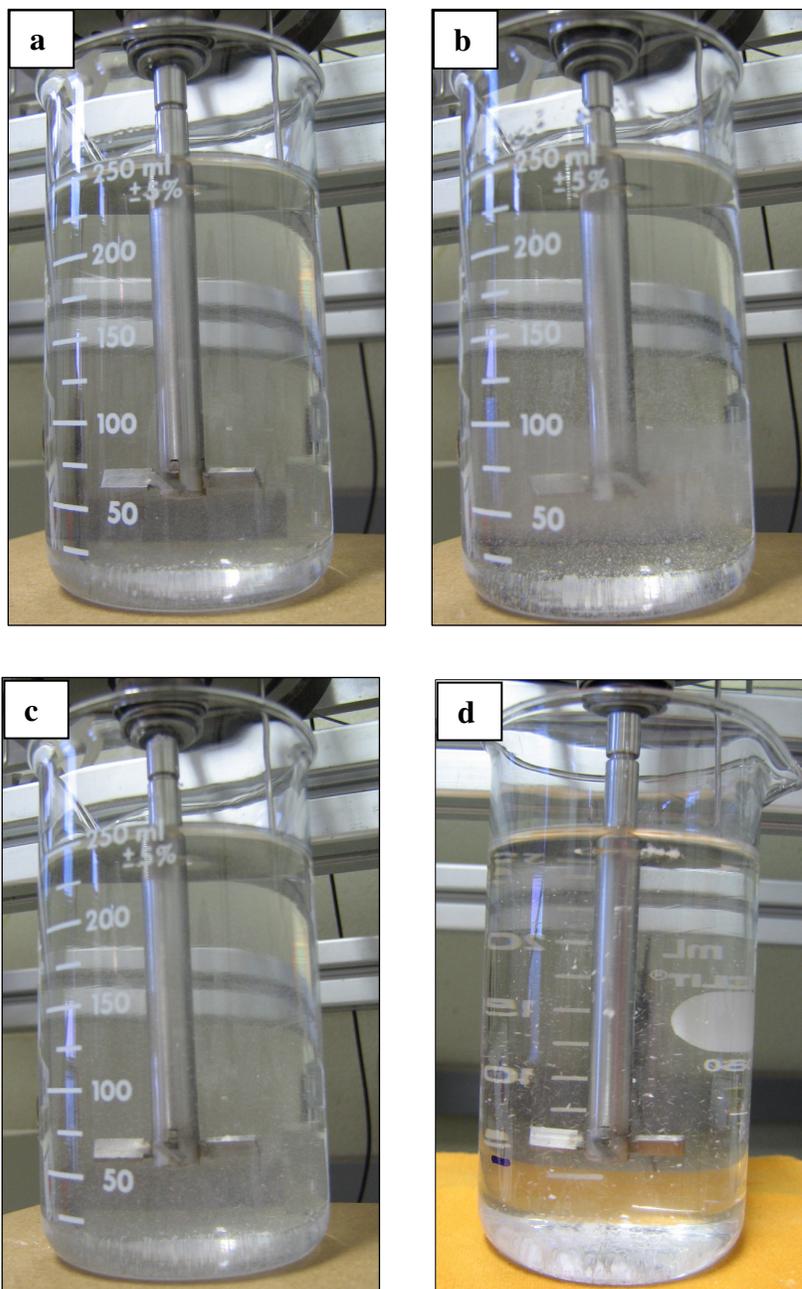


Figura 4.5 – Sistema etanol/insulina suína utilizado na determinação da velocidade de agitação, Njs. **a)** 10 rpm, **b)** 20 rpm, **c)** 30 rpm e **d)** 50 rpm.

Com base nas observações citadas, a velocidade N_{js} foi determinada como 30 rpm e assim, escolhida para ser utilizada nos ensaios de dissolução e cristalização descritos a seguir, pois esta velocidade permitia o contato entre a maioria das partículas com a solução – sem que elas se chocassem entre si e também com a parede e impelidor do sistema, o que evitaria uma maior quebra dos cristais –, facilitando assim a transferência de massa.

No entanto, vários fatores influenciam na determinação da velocidade N_{js} e, por isso, a determinação apenas através da observação de ensaios experimentais não é a ideal, principalmente por se utilizar, nesse trabalho, fluido diferente dos ensaios de cristalização (etanol ao invés de tampão aquoso). Existem muitos estudos, com o trabalho pioneiro de Zwietering (1958), que estima a velocidade N_{js} através da correlação 4.1 e considera os efeitos da viscosidade, densidade do líquido e do cristal, entre outras variáveis na determinação da velocidade N_{js} :

$$N_{js} = S_N \times \nu_l^{0,1} \left[\frac{g_c (\rho_s - \rho_l)}{\rho_l} \right]^{0,45} X^{0,13} d_p^{0,2} D_I^{-0,85} \quad (4.1)$$

onde S_N é um número adimensional (função do tipo de impelidor), ν_l é a viscosidade cinemática do líquido, g_c é a constante de aceleração da gravidade, ρ_s e ρ_l são as densidades da partícula e do líquido, X a razão mássica de sólido suspenso e líquido x 100 (kg sólido/kg líquido), d_p é o diâmetro da partícula e D_I é o diâmetro do impelidor (Paul *et al.*, 2004).

Assim, pode-se concluir que a divergência do valor experimental do N_{js} determinado aqui, com o uso de etanol, do valor que se determinaria pela equação 4.1, com o uso de tampão aquoso, se daria pelos efeitos da ν_l , ρ_l e da razão mássica da suspensão X , uma vez que os outros parâmetros da equação são, para os dois casos, de mesma ordem de grandeza (d_p) ou idênticos (S e D_I , função do impelidor e ρ_s , propriedade intrínseca da insulina).

A razão entre os valores de N_{js} calculados para os usos de etanol e água, como fases líquidas a 20°C, é de 0,40. Isto indica que o N_{js} , determinado experimentalmente, é possivelmente menor do que aquele que seria determinado com tampão aquoso de cristalização.

4.4. Determinação da solubilidade da insulina suína a 15°C por ensaios de dissolução

Tashima (2007) determinou a solubilidade, mas para valores de pH próximo ao ponto isoelétrico da insulina, em soluções de apenas 10 mmol/L NaHCO_3 sem a adição de zinco. Por não se conhecer dados de solubilidade para a insulina suína no sistema solvente NaHCO_3 50 mmol/L/ $\text{ZnCl}_2/\text{CO}_2$ determinou-se a curva de solubilidade da insulina nesse sistema a 15°C. O método utilizado para a determinação da solubilidade foi a dissolução em sistema agitado por um impelidor a uma velocidade de 30 rpm. Foram feitos ensaios em cinco valores diferentes de pH a 15°C. As medidas de solubilidade, concentrações da insulina para o sistema em equilíbrio, foram consideradas como a média dos últimos pontos, quando os valores se tornavam praticamente constantes, sendo a diferença entre eles menor que o desvio padrão da medida (Figura 4.6).

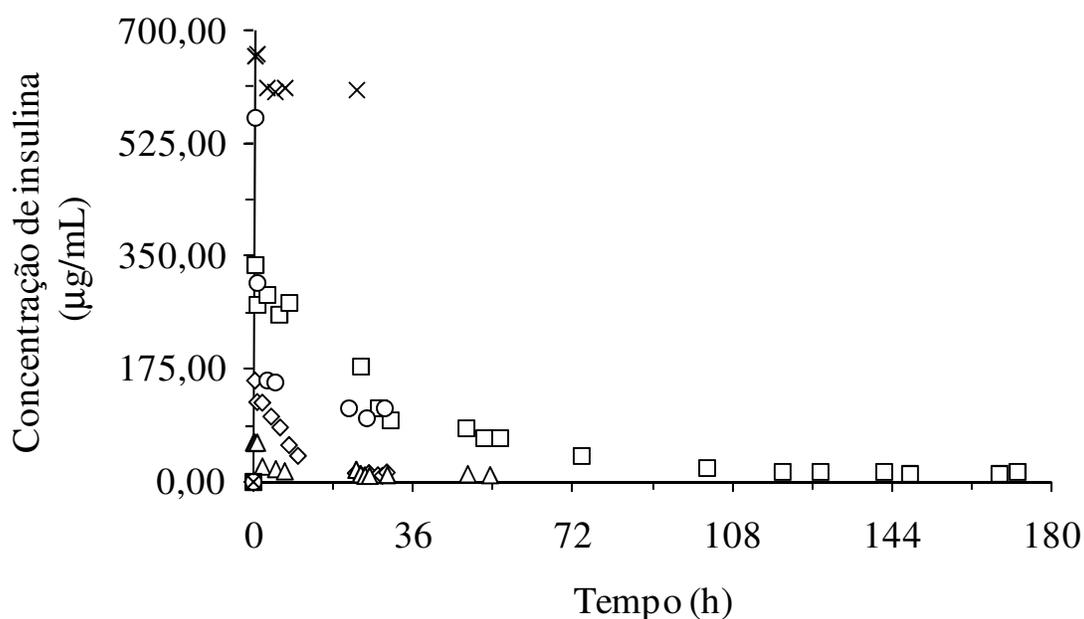


Figura 4.6 – Cinéticas de dissolução de insulina em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L a 15°C em diferentes valores finais de pH: 6,30 (◇), 6,50 (□), 6,60 (△), 6,98 (○), 7,34 (×). Suspensão inicial de 2,0 mg/mL de insulina.

Os valores de pH estudados foram de 6,30 a 7,34, pois sabe-se da literatura (BLUNDELL *et al.*, 1972) que a quantidade de átomos de zinco (importante na formação do hexâmero, unidade cristalina) ligados à insulina em solução ou no cristal da proteína é fortemente dependente do pH e sofre um aumento com a variação do pH na faixa de 6,0 a 8,0. A Tabela 4.3 lista os resultados dos ensaios com o valor de solubilidade da insulina no sistema solvente para cada valor de pH.

A curva de solubilidade para a insulina suína em NaHCO₃/CO₂ (Figura 4.7) apresentou a mesma tendência do perfil encontrado na precipitação isoelétrica com ácidos convencionais (TASHIMA, 2007). As curvas de solubilidade de proteínas obtidas por precipitação isoelétrica em função do pH apresentam um formato em “U” e foram obtidas por diversos autores para diversas proteínas (MCPHERSON, 1999; WINTERSTEINER e ABRAMSON, 1933).

Os ensaios de dissolução apresentaram o mesmo comportamento para todos os valores de pH estudados: um aumento rápido da concentração e em seguida uma diminuição do valor da concentração até atingir o equilíbrio. Isso pode ser justificado através do modo como a acidificação da solução é feita, pois se sabe da literatura que a insulina dissolve-se melhor em valores de pH elevado, sendo as primeiras amostras da suspensão coletadas a valores de pH maiores do que o pH de equilíbrio.

Tabela 4.3 - Solubilidade da insulina suína em diferentes valores de pH para o sistema solvente NaHCO₃ 50 mmol/L/ZnCl₂/CO₂ a 15°C.

pH	Concentração (µg/mL)
6,30	10,80 ± 0,53
6,50	12,86 ± 2,32
6,60	10,03 ± 0,81
6,98	109,18 ± 8,63
7,34	608,64 ± 3,06

No entanto, outro fenômeno deve ser considerado. Esse comportamento já tinha sido observado por Bernardo *et al.* (2005): um pico inicial na concentração para a insulina suína com o tempo quando dissolvida em tampão acetato 0,1 mol/L com 7% de NaCl para valores de pH entre 3,0 e 7,0 a 25°C. Esses autores sugeriram que poderia estar ocorrendo uma mudança da estrutura cristalina, ou do grau de cristalinidade, da insulina. Eles também estudaram a possibilidade do pico de concentração seguido da queda até um valor de equilíbrio ser resultante da desnaturação da insulina (pelo cisalhamento na agitação ou por fibrilação), ou a possibilidade do aumento no teor do zinco (dois átomos de zinco para a estabilização do hexâmero que constitui a célula unitária do cristal já discutido no Capítulo 2) alterar o comportamento da dissolução da insulina. Após o estudo dessas possibilidades, concluíram que nem a desnaturação nem o teor de zinco em solução poderiam ter modificado a cinética de dissolução da insulina. O fenômeno, segundo Bernardo *et al.* (2005), é explicado pelo comportamento polimórfico da insulina suína.

Para os ensaios listados na Tabela 4.4, a diminuição do tamanho do cristal durante a dissolução foi observada (Figura 4.8).

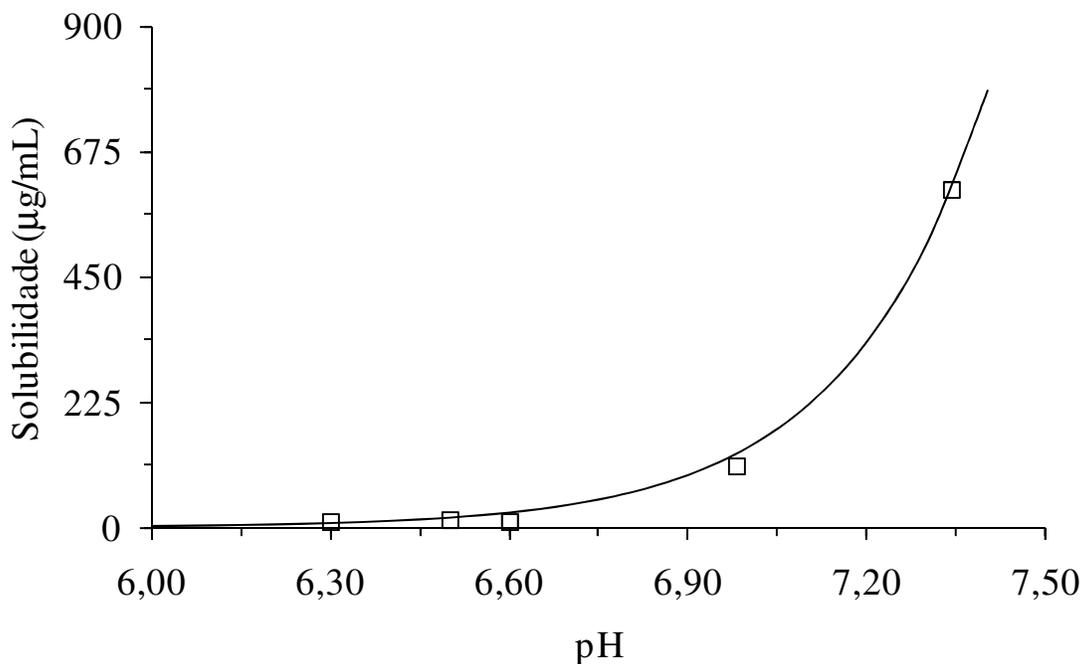


Figura 4.7 – Solubilidade da insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 obtida por dissolução de cristais a 15°C . (\square) Dados experimentais e (–) ajuste exponencial: $S = 2,00 \times 10^{-11} e^{(4,23 \times \text{pH})}$, $R^2 = 0,93$.

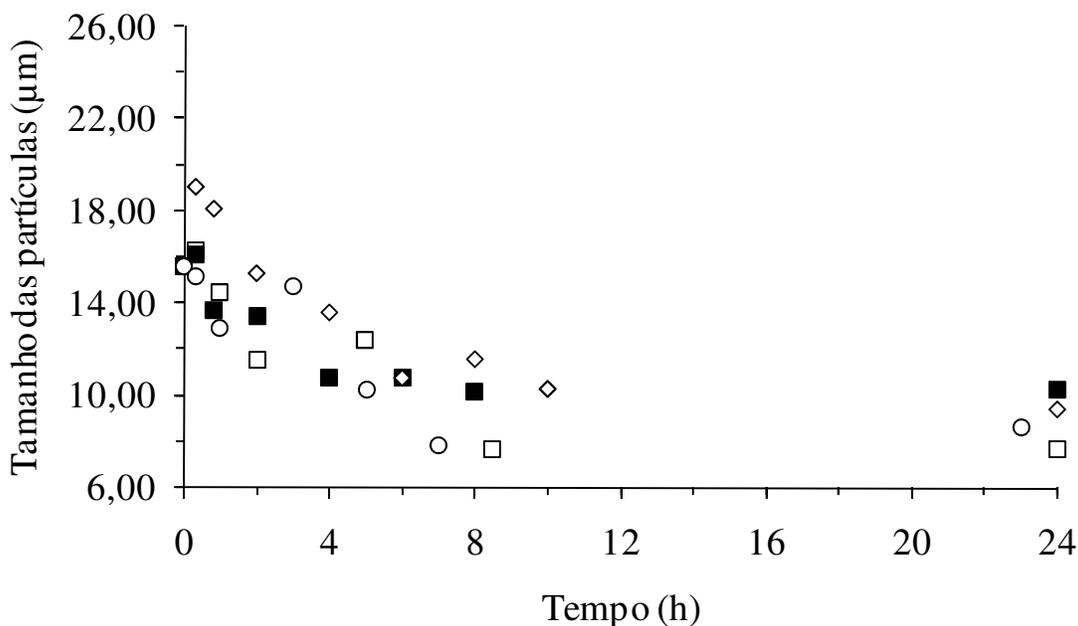


Figura 4.8 – Variação do tamanho das partículas durante os ensaios de dissolução da insulina em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 15°C em diferentes valores finais de pH: 6,30 (\diamond), 6,50 (\blacksquare), 6,60 (\square) e 7,34 (\circ).

Tabela 4.4 - Tamanho das partículas durante a dissolução da insulina em NaHCO₃ 50 mmol/L sob atmosfera de CO₂ e ZnCl₂ 0,4 mmol/L a 5°C.

Tempo (h)	Tamanho da partícula* (µm)			
	pH 6,30	pH 6,50	pH 6,60	pH 7,34
0,00	14,24 ± 4,06			
0,33	19,05 ± 4,69	16,14 ± 5,71	16,30 ± 6,55	15,14 ± 3,05
0,83	18,10 ± 4,66	13,73 ± 4,38	-	-
1,00	-	-	14,47 ± 3,30	12,90 ± 1,94
2,00	15,30 ± 3,68	13,46 ± 3,56	11,60 ± 2,69	-
3,00	-	-	-	14,77 ± 4,05
4,00	13,60 ± 4,22	10,73 ± 3,02	-	-
5,00	-	-	12,42 ± 3,89	10,26 ± 2,22
6,00	10,76 ± 3,24	10,76 ± 2,67	-	-
7,00	-	-	-	7,88 ± 1,47
8,00	11,57 ± 1,60	10,15 ± 2,13	-	-
8,50	-	-	7,72 ± 0,55	-
10,00	10,28 ± 1,93	-	-	-
24,00	9,39 ± 2,52	10,25 ± 2,89	7,68 ± 2,73	8,69 ± 1,69

* - tamanho medido pelo método de análise de imagem.

Concentração da suspensão inicial: 2,0 mg/mL.

4.5. Diferença de solubilidade encontrada nos ensaios de dissolução e cristalização.

Depois de analisar os resultados obtidos nos ensaios de dissolução e cristalização até aqui realizados, notou-se uma grande diferença no valor das concentrações de equilíbrio desses ensaios (Tabelas 4.2 e 4.3). Apesar dos dados de dissolução terem sido obtidos a 15°C e os de cristalização exploratórios a 5°C, as concentrações de equilíbrio para pH 6,50 foram 0,013 e 0,35 mg/mL, respectivamente, enquanto que dados determinados por Tashima *et al.* (2007) a 15°C e 5°C foram 0,31 e 0,33 mg/mL, respectivamente. Assim, para comparar as concentrações de equilíbrio dos ensaios de cristalização e dissolução para uma mesma temperatura de 15°C, realizou-se um novo ensaio de cristalização (ensaio D1).

Esse ensaio de cristalização (ensaio D1) foi preparado de acordo com o item 3.3.2, mas a agitação (30 rpm) permaneceu constante durante todo o tempo de cristalização e a temperatura também foi mantida constante a 15°C, condição idêntica àquela usada para determinar a curva de solubilidade. A Figura 4.9 mostra o perfil de concentração na cristalização da insulina e a solubilidade foi determinada como $103,80 \pm 7,41 \mu\text{g/mL}$. Os cristais obtidos nesse ensaio, também romboédricos, tiveram o tamanho médio medido pelo método de análise de imagem por microscopia de $19,49 \pm 3,37 \mu\text{m}$ (Figura 4.10).

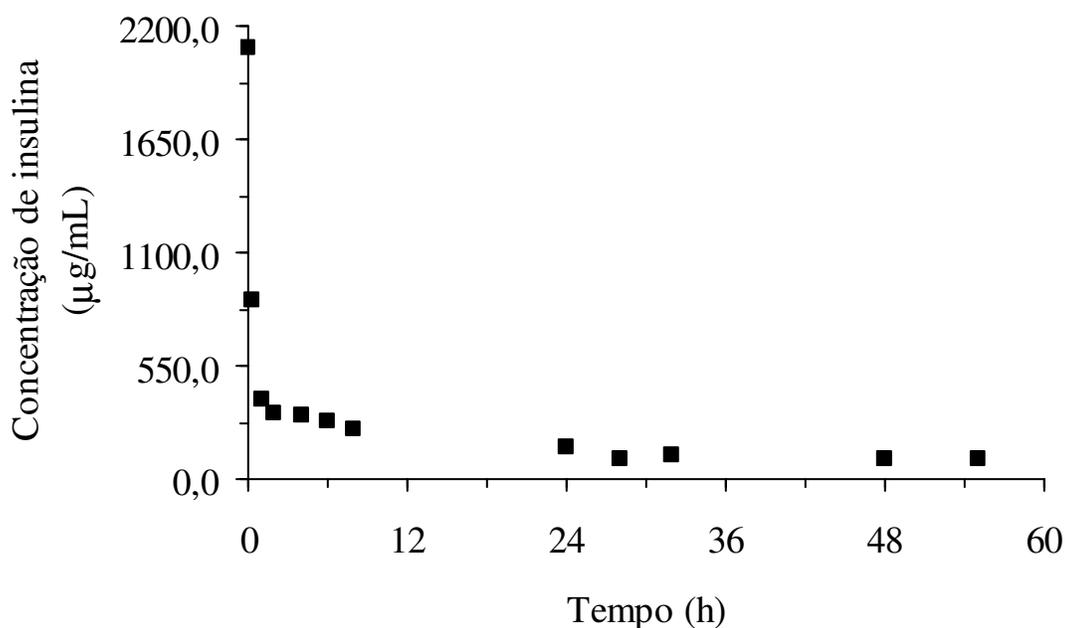


Figura 4.9 – Cinética de cristalização de insulina do ensaio D. Condições experimentais: 2,09 mg/mL de insulina suína em solução de NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 em pH 6,45 a 15°C.

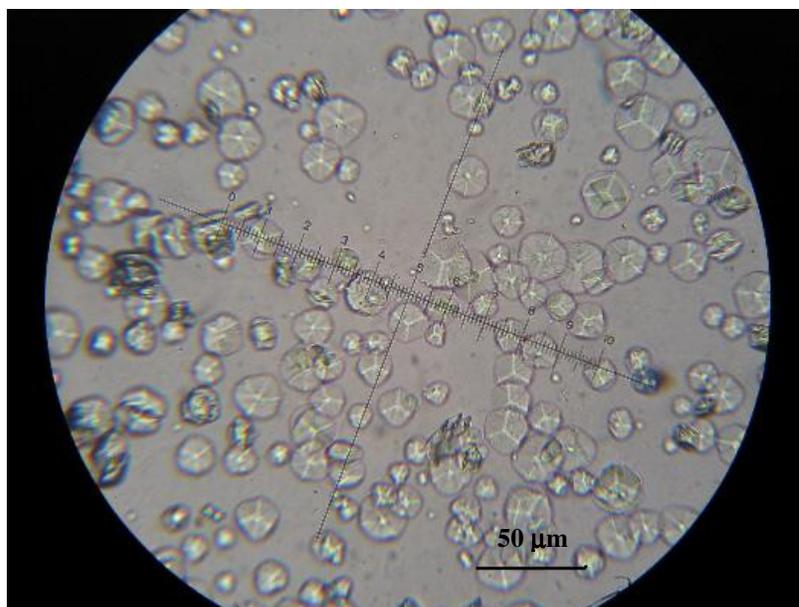


Figura 4.10 – Fotomicrografia dos cristais de insulina suína obtidos no ensaio D1 a partir de NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 em pH 6,45 a 15°C (ampliação de 400X).

As solubilidades encontradas nos ensaios de cristalização e dissolução não convergiram para um mesmo valor. A solubilidade obtida pelo ensaio de dissolução a pH 6,50 (Tabela 4.3) foi de $12,86 \pm 2,32 \mu\text{g/mL}$, enquanto que a solubilidade a partir da cristalização (ensaio D1) a pH 6,45 foi de $103,80 \pm 7,41 \mu\text{g/mL}$, um valor aproximadamente 8 vezes maior que a solubilidade encontrada para a dissolução.

Como já discutido no item 2.2.1, a solubilidade pode ser determinada por uma solução supersaturada ao invés de uma solução subsaturada. A presença de impurezas pode orientar de forma inadequada as moléculas na rede cristalina cessando o crescimento e a solução permanecer em um estado metaestável. Isso pode ter acontecido no ensaio D1.

Outra explicação para os diferentes valores de concentração encontrados nos ensaios de dissolução e cristalização seria a existência de mais de uma fase em solução, em que a única fase estável é a de solubilidade mais baixa (regra de estágios sucessivos de Ostwald). Essa fase raramente nucleia primeiro, sendo cristalizada a fase de maior solubilidade, a menos supersaturada. Se o crescimento continua, a concentração do soluto diminui até

atingir a curva de solubilidade da fase cristalizada. Nesse momento, a solução é supersaturada somente em relação à fase de menor solubilidade. Ao se formar um cristal da nova fase, a menos solúvel, a concentração do soluto volta a cair, tornando a primeira fase instável, que se dissolve gerando soluto para contribuir com o crescimento da fase estável. Porém, se não se formarem cristais da fase mais estável, a primeira fase precipitada permanece em um estado metaestável (BERNARDO *et al.*, 2002).

Para verificar se houve a formação de uma fase mais estável no ensaio D1, realizou-se um ensaio de cristalização (D2) partindo de uma concentração de insulina ($115,34 \pm 2,16 \mu\text{g/mL}$) próxima da concentração de equilíbrio obtida no ensaio de cristalização D1 ($103,80 \pm 7,41 \mu\text{g/mL}$). Nesses ensaios, devido à baixa concentração de insulina inicial, se evitaria a cristalização de uma fase de maior solubilidade (menos estável) possibilitando apenas a cristalização da fase mais estável. Entretanto, após 94 h, nenhum cristal ou queda na concentração foi observado, provavelmente devido à baixa supersaturação do sistema (Figura 4.11).

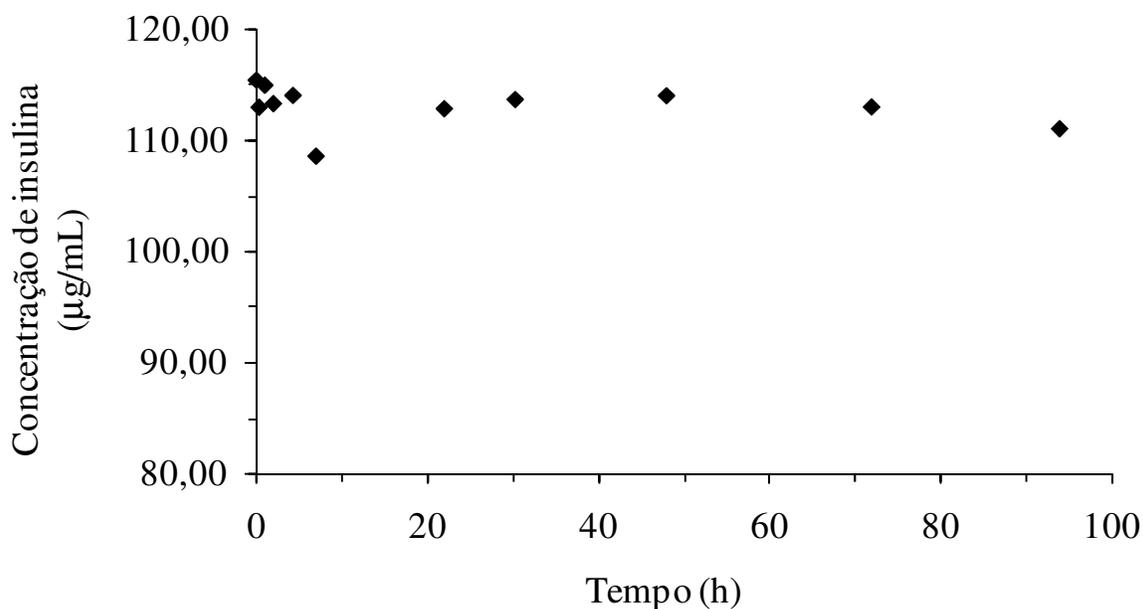


Figura 4.11 – Cinética de cristalização de insulina no ensaio D2. Condições experimentais: $115,34 \mu\text{g/mL}$ de insulina suína em solução de NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 $0,02 \text{ mmol/L}$ sob atmosfera de CO_2 em pH $6,45$ a 15°C .

Com a finalidade de verificar a formação de diferentes estruturas nos ensaios de dissolução e cristalização, foram realizadas análises de DSC das amostras de insulina original (estoque usado neste trabalho), dos ensaios de dissolução (pH 6,50) e de cristalização (D1) (Figura 4.12).

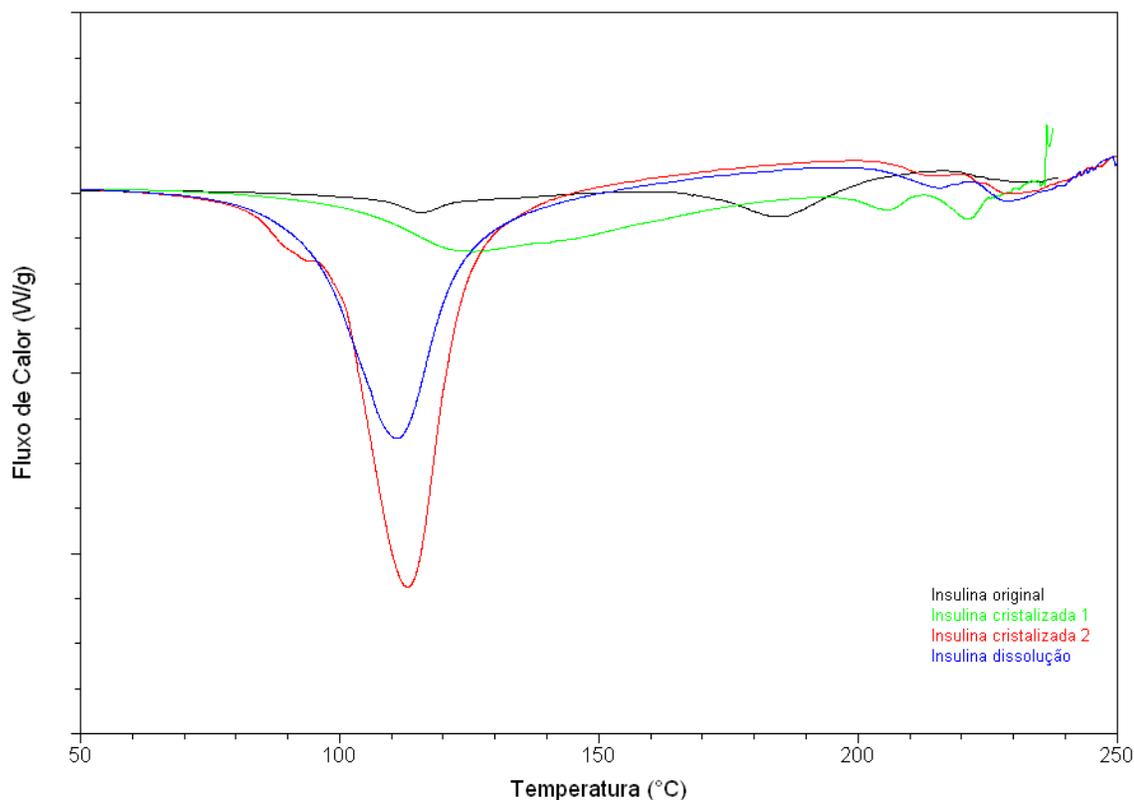


Figura 4.12 – Endotermas para as amostras de insulina original, cristalizada e dissolvida em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 em pH 6,45 a 15°C obtidas nas análises de DSC com taxa de aquecimento de 5°C/min com temperatura máxima de 250°C. Próximo à temperatura de 250°C nota-se uma irregularidade nas endotermas, o que indica a degradação da insulina nessa temperatura.

Observando as curvas da amostra cristalizada 1 e 2, ensaio D1, pode-se considerar a existência de duas estruturas diferentes, uma mais e outra menos estável (a mais estável, cristalizada 2, apresenta perfil semelhante à curva obtida para a amostra do ensaio de dissolução). No entanto, o modo como a amostra do ensaio D1 foi seca pode ter

influenciado a cristalinidade da insulina, uma vez que, cristais de proteína contêm muita água inclusa em sua estrutura. Para a análise desses resultados, considera-se que a amostra que secou de forma branda, cristalizada 2, se assemelha mais à estrutura que estava em solução ao fim da cristalização, ou seja, amostra mais parecida com a amostra dissolvida.

Os perfis obtidos nas análises de DSC confirmam os indícios encontrados nos ensaios de dissolução (pico de concentração) de que as amostras representam diferentes estruturas já que a estrutura cristalina da insulina original difere muito das amostras cristalizadas 1 e 2 e da dissolvida. A amostra cristalizada 2 e a do ensaio de dissolução são parecidas entre si e diferentes da insulina original. Portanto, há uma mudança na estrutura quando a amostra original é cristalizada ou dissolvida no sistema solvente empregado; a diferença de concentração entre as amostras da cristalização e dissolução não se deve ao polimorfismo.

4.6. Cinética de dissolução, do crescimento do cristal e estimativa da nucleação.

4.6.1. Cinética de dissolução

A partir dos ensaios de dissolução (item 4.4) foi possível, além de determinar a curva de solubilidade para a insulina suína no sistema solvente $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ também estimar a cinética de dissolução a partir do tratamento dos dados experimentais da Tabela 4.4.

Segundo a equação 2.9, apresentada no item 2.2.3:

$$D = k_d \times \Delta C^d \quad (2.9)$$

a velocidade de dissolução dos cristais, D ou $\Delta L/\Delta t$, definida como uma lei de potências em relação à supersaturação do sistema, ΔC , pode ser determinada a partir dos dados de concentração da fase líquida e da solubilidade da insulina no pH correspondente a cada ponto experimental (segundo curva de ajuste na Figura 4.7) e da diferença de tamanho dos cristais, também medida experimentalmente. Um gráfico de $\log(D)$ em função de $\log(\Delta C)$

fornece, como a inclinação da reta, o valor do expoente d e, como intercepto com o eixo das ordenadas, o valor de $\log(k_d)$. Assim, para a determinação dos parâmetros k_d e d , calcularam-se os parâmetros ΔC e D , além de seus logaritmos (dados no Apêndice C.1).

Este procedimento foi aplicado para os ensaios de dissolução e, a partir das Tabelas do Apêndice C.1, a Tabela 4.5 foi elaborada descartando-se os pontos em que $\Delta L > 0$ e $\Delta C < 0$; a partir desta Tabela o gráfico da Figura 4.13 foi construído. Com o auxílio do programa Excel (Microsoft, EUA), obteve-se k_d igual a $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{m/h}$ e d igual a 1,0 através da linearização da equação 2.9.

$$D = 2,5 \cdot 10^{-2} \frac{\mu\text{m}}{\text{h}} \times \Delta C^{1,0} \quad (4.2)$$

Tabela 4.5 - Dados utilizados na determinação da cinética de dissolução da insulina suína em $\text{NaHCO}_3/\text{ZnCl}_2/\text{CO}_2$ a 15°C .

Dados*	pH	log(D)	log(ΔC)
2	6,35	0,28	2,05
3	6,18	0,38	2,07
4	6,20	-0,07	1,98
5	6,22	0,15	1,89
7	6,23	-0,19	1,54
8	6,28	-1,20	0,68
10	6,52	0,68	2,21
12	6,48	0,14	2,24
23	7,18	0,52	2,55
25	7,32	0,35	1,65

* - numeração de acordo com do Apêndice C.1.

Pode-se assumir que para a faixa de pH estudada neste trabalho (valores de pH: 6,18 a 7,32) essa variável não interfere fortemente na cinética de dissolução dos cristais, pois os dados de todos os ensaios se ajustaram razoavelmente a uma única reta (Figura 4.13).

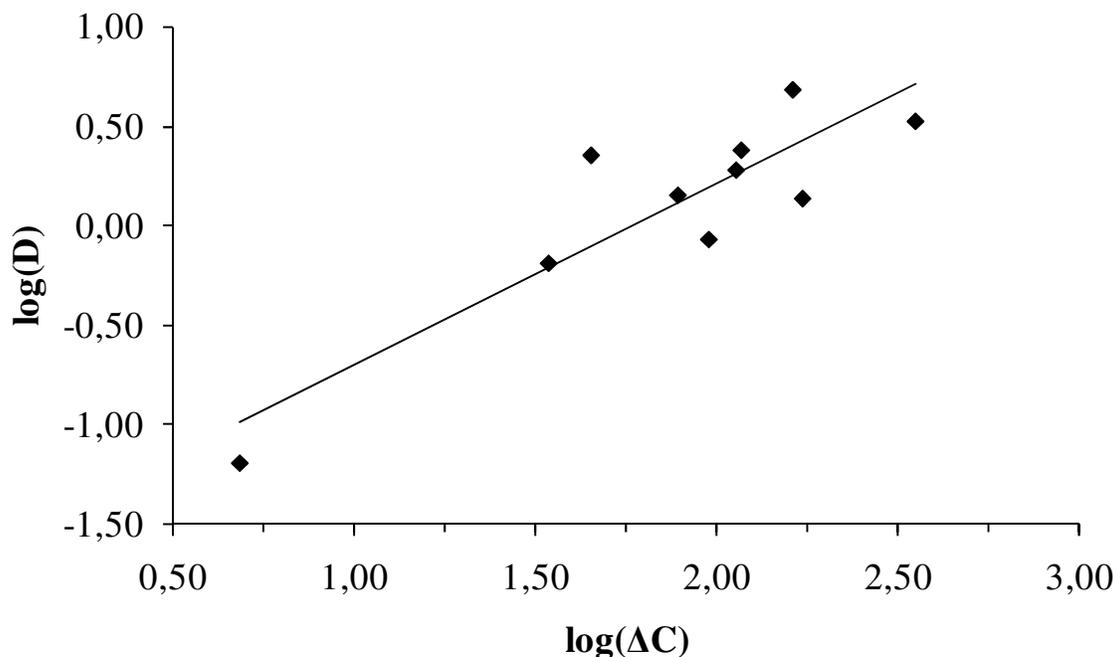


Figura 4.13 – Cinética de dissolução da insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 15°C . (◆) dados da Tabela 4.5 e (—) valor ajustado ($R^2 = 0,80$).

4.6.2. Cinética de cristalização

Para a determinação da cinética de crescimento de cristais foram realizados ensaios de cristalização nos valores de pH 6,30 (ensaios E1 e E4) e 6,50 (ensaios E2 e E3) e a eles se acrescentou os dados do ensaio D1, apresentado no item 4.5. Todos os ensaios tiveram concentração inicial de cerca de 2 mg/mL, exceto o ensaio E3 que foi realizado com uma concentração inicial menor de insulina suína (1,5 mg/mL), visando reduzir o tempo de surgimento dos cristais (54 h para pH 6,50 contra 22 h para os demais ensaios) e minimizar o efeito da nucleação primária, responsável talvez pela rápida precipitação da proteína nos primeiros minutos de experimento. No entanto, essa mudança não teve resultados

significativos, pois o tempo de surgimento dos cristais para o pH 6,50 foi reduzido de 54 para apenas 47 h.

A formação dos cristais a partir do precipitado gerado logo após a acidificação da solução pode ser explicada por um processo de transformação chamado de “Ostwald ripening”, em que pequenas partículas tendem a se dissolver para que cristais maiores cresçam. Devido o precipitado ter uma estrutura menos ordenada, ele é cineticamente favorecido e se forma primeiro, porém o cristal representa um estado de menor energia sendo essa diferença de energia a responsável pela conversão de um estado amorfo para ordenado – este estado é termodinamicamente favorecido. Essa transformação ocorre para reduzir a energia livre global do sistema (MCPHERSON, 1999).

A Tabela 4.6 apresenta os dados de tamanho dos cristais utilizados na determinação da velocidade de crescimento. O perfil típico de concentração dos ensaios de cristalização (Figura 4.14) foi o mesmo encontrado para o ensaio D1 (Figura 4.9). A Figura 4.15 apresenta as imagens dos cristais, porém, a forma romboédrica bem definida - semelhante aos cristais do ensaio D1 (Figura 4.10) - foi obtida apenas para os ensaios E1 e E4.

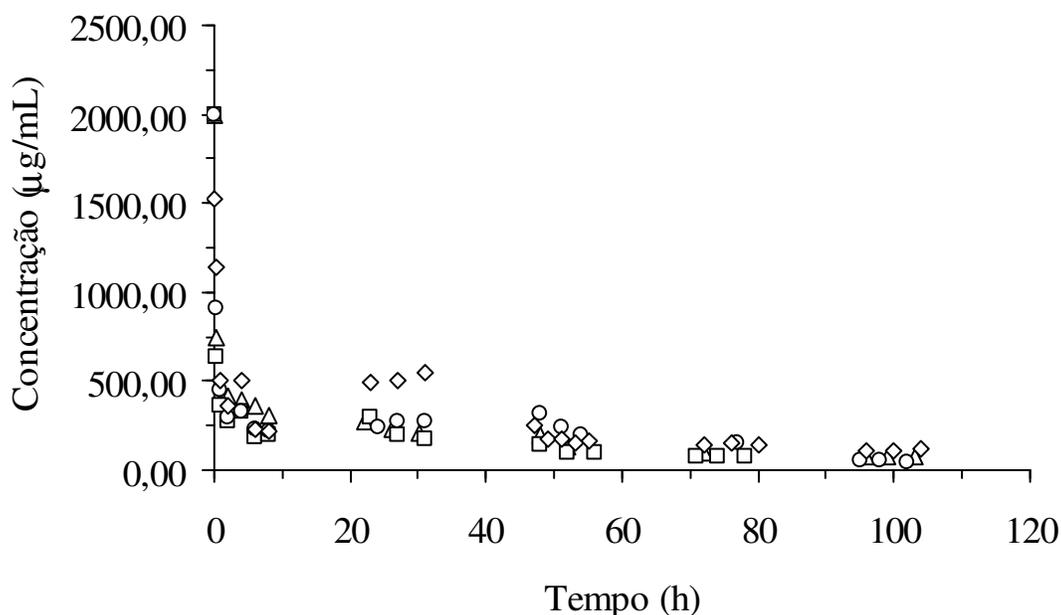


Figura 4.14 – Perfil de concentração da insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 15°C em diferentes valores de pH. Ensaios: (Δ) E1, pH 6,30; (\square) E2, pH 6,50; (\diamond) E3, pH 6,50; e (\circ) E4, pH 6,30. Concentrações iniciais em cerca de 2 mg/mL, exceto para o ensaio E3, 1,5 mg/mL.

Tabela 4.6 - Tamanho dos cristais de insulina em $\text{NaHCO}_3/\text{ZnCl}_2$ sob atmosfera de CO_2 durante os ensaios de cristalização para determinação da cinética de crescimento de cristais a 15°C (tamanhos obtidos pelo método de análise de imagem).

Tempo (h)	Ensaio				
	E1	E2	E3	E4	D1
L (μm)					
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22,00	13,58 \pm 3,73	-	-	-	-
23,00	-	-	-	13,31 \pm 5,24	15,88 \pm 5,26
24,00	15,22 \pm 5,26	-	-	-	-
25,00	-	-	-	15,11 \pm 6,15	-
26,00	17,32 \pm 6,58	-	-	-	-
27,00	-	-	-	17,30 \pm 5,29	9,33 \pm 4,20
28,00	19,64 \pm 6,21	-	-	-	-
29,00	-	-	-	18,43 \pm 6,53	-
30,00	21,11 \pm 5,53	-	-	-	10,61 \pm 4,08
31,00	-	-	-	15,54 \pm 4,02	-
47,00	-	-	8,65 \pm 2,88	-	-
48,00	21,77 \pm 5,97	-	-	18,40 \pm 5,19	11,14 \pm 5,08
49,00	-	-	7,97 \pm 2,39	-	-
51,00	-	-	8,08 \pm 2,24	-	-
52,00	-	-	-	-	13,05 \pm 3,87
53,00	-	-	9,35 \pm 2,91	-	-
54,00	-	6,79 \pm 1,47	-	-	-
55,00	-	-	12,18 \pm 3,83	-	-
56,00	-	-	-	-	12,78 \pm 4,24
72,00	-	-	-	-	10,67 \pm 4,33
77,00	-	8,53 \pm 1,25	-	-	-
95,00	-	9,12 \pm 1,21	-	-	-
100,00	-	-	-	-	14,61 \pm 3,66
102,00	-	9,21 \pm 1,35	-	-	-
103,00	23,00 \pm 5,96	-	-	-	-
104,00	-	-	8,31 \pm 3,47	-	-
Tamanho final ^a	26,12 \pm 1,29	10,37 \pm 0,91	11,49 \pm 1,60	24,79 \pm 1,75	-

a - Método de difração a laser.

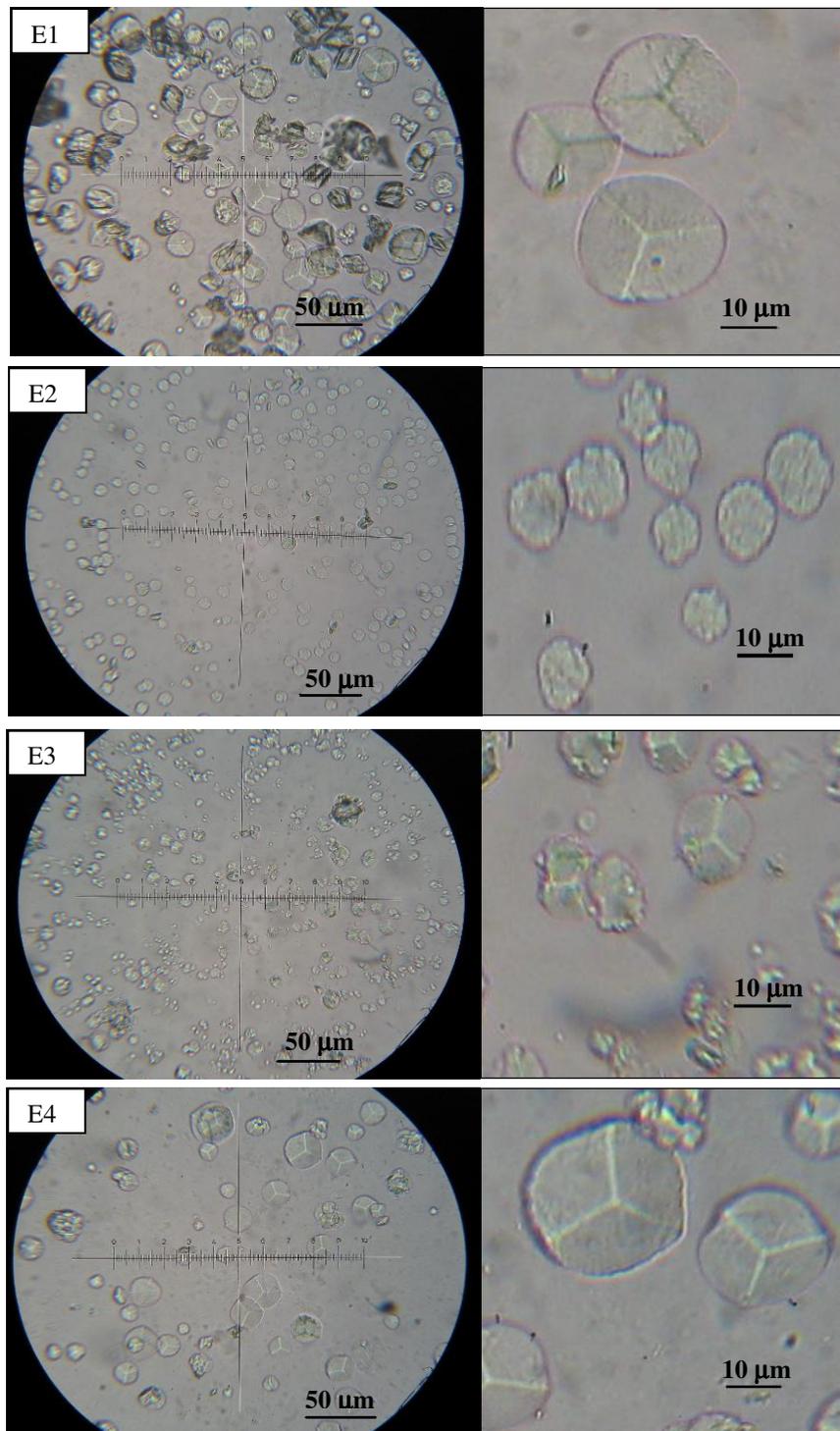


Figura 4.15 – Fotomicrografias dos cristais de insulina em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 15°C em diferentes valores de pH: E1, pH 6,30; E2, pH 6,50; E3, pH 6,50 e E4, pH 6,30. Concentrações iniciais em cerca de 2 mg/mL, exceto para o ensaio E3, 1,5 mg/mL.

Segundo a equação 2.8:

$$G = k_g \times \Delta C^g \quad (2.8)$$

a velocidade de crescimento linear, conhecida como G ou $\Delta L/\Delta t$, é definida como uma lei de potências em relação à supersaturação do sistema, ΔC . Um gráfico de $\log(G)$ em função de $\log(\Delta C)$ fornece, como a inclinação da reta, o valor do expoente “g” e, como intercepto com o eixo das ordenadas, o valor de $\log(k_g)$. Assim, para a determinação dos parâmetros k_g e g , calcularam-se os parâmetros ΔC e G , além de seus logaritmos, a partir da concentração da fase líquida medida experimentalmente, da solubilidade da insulina no pH específico (segundo curva de ajuste na Figura 4.7) e da diferença de tamanho dos cristais, também medida experimentalmente.

Este procedimento foi aplicado para os ensaios E1, E4 e D1 e os resultados encontram-se no Apêndice C.2 (ensaios E2 e E3 não geraram cristais bem definidos e, portanto, não foram utilizados). A partir das Tabelas do Apêndice C.2, a Tabela 4.7 foi elaborada descartando-se os pontos em que $\Delta L < 0$ e com ela se pode construir o gráfico da Figura 4.21 e determinar, com o auxílio do programa Excel (Microsoft, EUA), k_g igual a $1,0 \cdot 10^{-7}$ $\mu\text{m}/\text{h}$ e g igual a 3,0 através da linearização da equação 2.8.

Assim, tem-se que a cinética de crescimento da insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L/ ZnCl_2 0,4 mmol/L/ CO_2 a 15°C é igual a:

$$G = 1,0 \cdot 10^{-7} \frac{\mu\text{m}}{\text{h}} \times \Delta C^{3,0} \quad (4.3)$$

Em geral, $1 \leq g \leq 2$ e apenas para compostos pouco solúveis $g > 2$ (VAN ROSMALEN et al., 2004). A insulina suína é pouco solúvel no sistema solvente $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$, o que pode ser confirmado pela expressão obtida para a cinética de cristalização em que g é igual a 3,0. Assim, como a cinética de dissolução, a cinética de cristalização não é afetada para a faixa de pH estudada (provavelmente pela estreita variação de pH – 6,30 a 6,46), pois os dados dos ensaios se ajustaram a uma única reta (Figura 4.16).

Tabela 4.7 - Dados experimentais linearizados para a determinação da cinética de crescimento de insulina suína em $\text{NaHCO}_3/\text{ZnCl}_2/\text{CO}_2$ a 15°C .

Dados*	pH	log(G)	log(ΔC)
2	6,34	-0,086	2,370
3	6,33	0,021	2,339
4	6,33	0,064	2,319
5	6,32	-0,134	2,302
7	6,33	-1,650	1,836
9	6,32	-0,046	2,362
10	6,31	0,039	2,282
11	6,31	-0,248	2,252
13	6,30	-0,774	2,132
16	6,46	-0,370	2,236
18	6,45	-0,321	2,176
21	6,45	-0,852	1,988

* numeração de acordo com o Apêndice C.2.

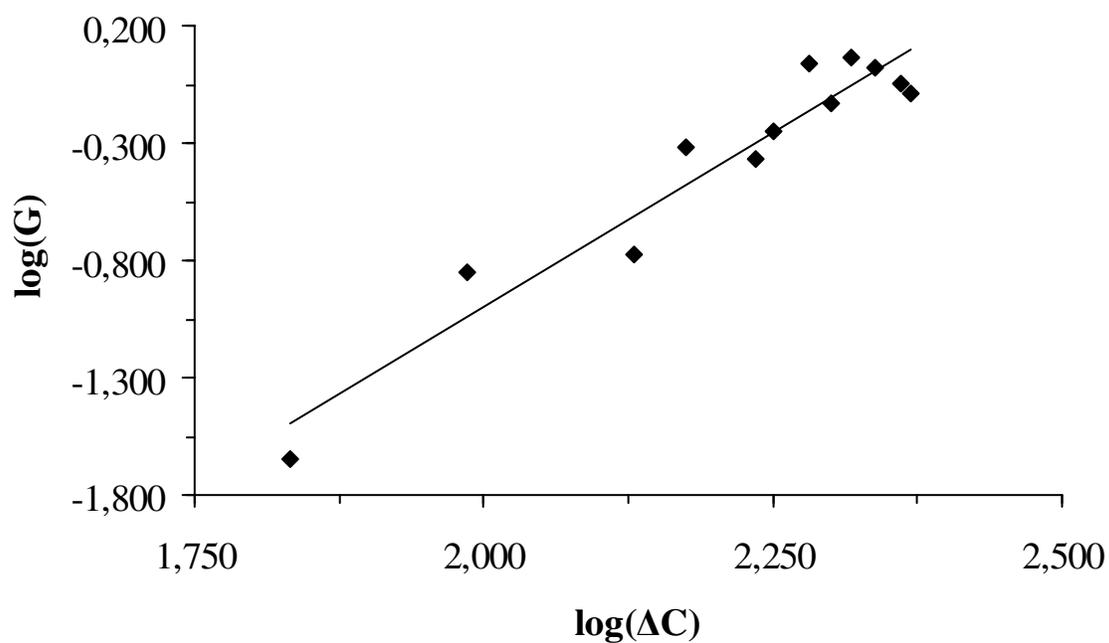


Figura 4.16 - Cinética de crescimento de cristais de insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 15°C . (◆) dados da Tabela 4.7 e (-) valor ajustado ($R^2 = 0,92$).

De acordo com Mullin (1993), a desintegração da superfície de um cristal é um processo significativamente mais rápido do que o crescimento. Comparando as equações das cinéticas de crescimento e dissolução (Figura 4.17), pode-se afirmar que, para uma mesma supersaturação, o processo de crescimento da insulina suína em $\text{NaHCO}_3/\text{ZnCl}_2/\text{CO}_2$ é mais lento do que a dissolução dos cristais da proteína.

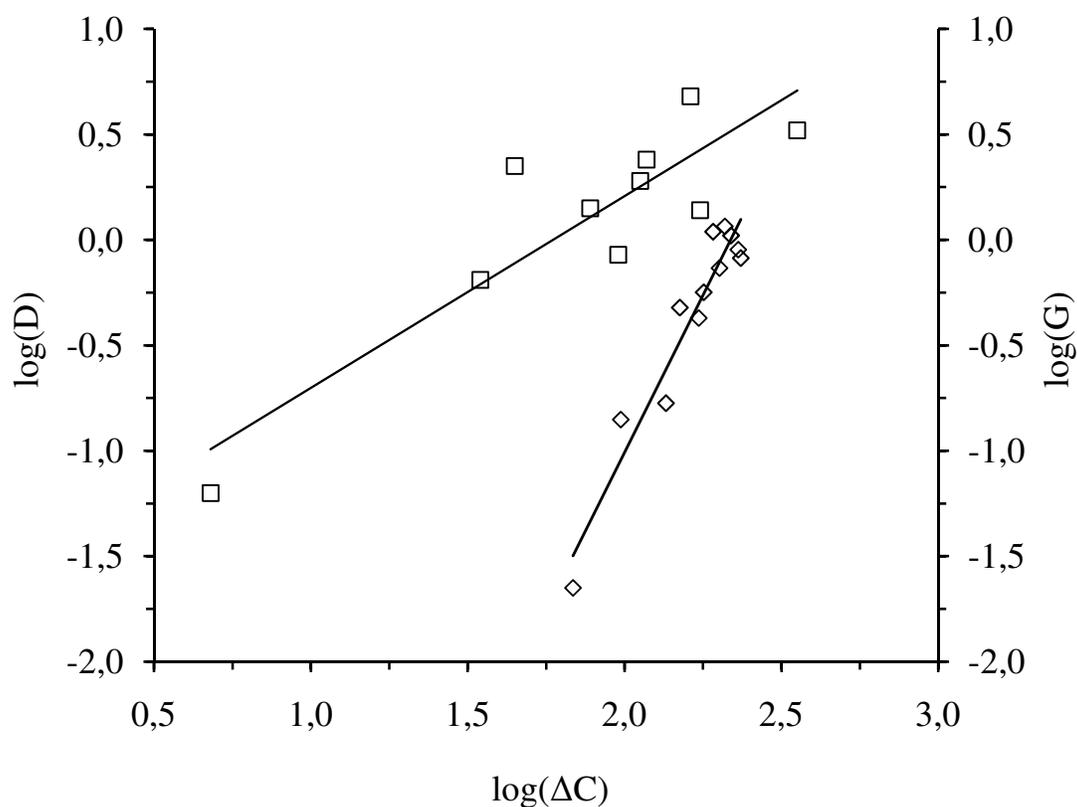


Figura 4.17 – Processos de dissolução e crescimento dos cristais de insulina: (□) cinética de dissolução (D) e (◇) cinética de crescimento (G).

4.6.3. Estimativa da taxa de nucleação

As distribuições de tamanho dos cristais, obtidos nos ensaios de cristalização realizados para a determinação da cinética de crescimento (E1, E2, E3 e E4), foram usadas para a estimativa da taxa de nucleação da insulina no sistema $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$.

O relatório de análise de distribuições de tamanho dos cristais, gerado pelo equipamento utilizado neste trabalho e apresentado no Apêndice C.3, fornece a percentagem volumétrica para determinadas faixas de tamanho de cristais. Na Tabela 4.8, estão apresentados os dados do ensaio E1 para exemplificar os cálculos de determinação da nucleação feitos também para os demais ensaios (E2, E3 e E4).

A partir do rearranjo da equação 2.4, já citada no item 2.2.2, o número de cristais de uma faixa de tamanho por grama de cristais totais, ΔN , é encontrada através da relação abaixo:

$$\Delta N = \frac{f}{\rho_C \times k_v \times L^3} \quad (2.4)$$

onde ρ_C é a densidade do cristal (0,741 g/mL, segundo Bernardo (2002)), k_v é o fator de forma volumétrico ($\pi/6$), L é o tamanho médio da faixa de tamanho considerado e f a fração mássica – a massa de cristal (de uma faixa de tamanho) por massa total de cristais – numericamente igual a percentagem volumétrica dividida por 100.

Somando ΔN de todas as faixas de tamanho e multiplicando pela concentração final de cristais em solução, M_T (dada pela diferença entre a concentração inicial C_i e final C_f de insulina), tem-se o número total de cristais por volume de solução (N_T):

$$N_T = M_T \times \sum \Delta N = (C_i - C_f) \times \sum \Delta N \quad (2.5)$$

que é apresentado na Tabela 4.9 para os ensaios E1 a E4, juntamente com outros parâmetros da cinética de nucleação.

Tabela 4.8 - Distribuição de tamanho dos cristais para a cristalização de insulina suína em NaHCO₃/ZnCl₂/CO₂ a 15°C e pH 6,30 - ensaio E1 (os dados similares dos experimentos E2, E3 e E4 estão no Apêndice C.4).

L (μm)	Volume (%)	f (g/gcristal)	ΔN (#/gcristal)
0,78	0,00	0,0000	-
0,91	0,02	0,0002	6,84. 10 ⁸
1,06	0,08	0,0006	1,30. 10 ⁹
1,24	0,21	0,0013	1,76. 10 ⁹
1,44	0,49	0,0028	2,42. 10 ⁹
1,68	0,96	0,0047	2,55. 10 ⁹
1,95	1,62	0,0066	2,29. 10 ⁹
2,28	2,51	0,0089	1,94. 10 ⁹
2,65	3,66	0,0115	1,59. 10 ⁹
3,09	5,08	0,0142	1,24. 10 ⁹
3,60	6,60	0,0152	8,40. 10 ⁸
4,19	7,94	0,0134	4,70. 10 ⁸
4,88	8,84	0,0090	2,00. 10 ⁸
5,69	9,29	0,0045	6,30. 10 ⁷
6,63	9,52	0,0023	2,03. 10 ⁷
7,72	9,62	0,0010	5,60. 10 ⁶
9,00	9,88	0,0026	9,19. 10 ⁶
10,48	10,54	0,0066	1,48. 10 ⁷
12,21	12,07	0,0153	2,17. 10 ⁷
14,22	15,22	0,0315	2,82. 10 ⁷
16,57	20,49	0,0527	2,99. 10 ⁷
19,31	28,33	0,0784	2,81. 10 ⁷
22,49	38,73	0,1040	2,36. 10 ⁷
26,20	51,39	0,1266	1,81. 10 ⁷
30,53	65,74	0,1435	1,30. 10 ⁷
35,56	78,63	0,1289	7,39. 10 ⁷
41,43	88,56	0,0993	3,60. 10 ⁶
48,27	95,13	0,0657	1,51. 10 ⁶
56,23	98,83	0,0370	5,36. 10 ⁵
65,51	100,00	0,0117	1,07. 10 ⁵

Tabela 4.9 - Estimativa do número de cristais de insulina suína em $\text{NaHCO}_3/\text{ZnCl}_2/\text{CO}_2$ a 15°C e da velocidade média da nucleação.

Ensaio	pH	C_i (mg/mL)	C_f (mg/mL)	Mc (g _{cristal})	\bar{L} (μm)	N_T (#/mL)	t_b (s)	N_T/t_b (#/mL.s)
E1	6,30	$2,00 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,009$	0,481	$26,12 \pm 1,29$	$3,38 \times 10^7$	370800	91,15
E4	6,30	$2,00 \pm 0,15$	$0,08 \pm 0,005$	0,481	$24,79 \pm 1,75$	$3,91 \times 10^7$	280800	139,25
E2	6,50	$2,00 \pm 0,17$	$0,05 \pm 0,001$	0,487	$10,37 \pm 0,91$	$8,33 \times 10^6$	367200	22,69
E3	6,50	$1,50 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,004$	0,352	$11,49 \pm 1,60$	$3,18 \times 10^7$	374400	84,94

C_i : concentração inicial de insulina

C_f : concentração final de insulina

Mc : massa final de cristal = $(C_i - C_f) \times V$

V : volume de solução, 250 mL

t_b : tempo de batelada

Analisando os dados da Tabela 4.9, observa-se que tanto a velocidade de nucleação média N_T/t_b quanto o tamanho variaram em função do pH. Os ensaios a pH 6,30 resultaram em \bar{L} maiores que para pH 6,50: valores menores para ensaios a 6,50 (N_T/t_b de 22,69 e 84,94 #/(mL.s) para E2 e E3 respectivamente) do que para ensaios a pH 6,30 (N_T/t_b de 91,15 e 139,25 #/(mL.s) para E1 e E4, respectivamente). Porém, a variação de N_T/t_b foi muito grande quando comparada entre valores iguais de pH.

Para os ensaios E1 e E4, em que as concentrações iniciais e finais dos ensaios são idênticas, aparentemente verifica-se um menor número de cristais por volume de suspensão para um tamanho médio maior dos cristais (N_T e \bar{L} de $3,38 \cdot 10^7$ #/mL e 26,12 μm de E1 para $3,91 \cdot 10^7$ #/mL e 24,79 μm de E4, respectivamente), o que é esperado uma vez que uma menor nucleação levaria a cristais maiores nesse caso. No entanto, os erros nas medidas são grandes o suficiente para que essa afirmação seja feita apenas com ressalvas.

Adicionando à comparação dos dados de E1 e E4 o ensaio E2, devido à sua concentração inicial de insulina ser também de 2 mg/ml e concentração de insulina final praticamente igual à dos ensaios E1 e E4, nota-se uma discrepância de valores. Para E2 o valor de N_T ($8,33 \cdot 10^6$ #/mL) foi bem abaixo do que para os outros dois ensaios, sendo que o tamanho médio de partículas foi também muito inferior. Admitindo-se que a supersaturação é praticamente a mesma para estes ensaios (solubilidade de 10,34 e 12,86 $\mu\text{g/mL}$ para pH 6,30 e 6,50, respectivamente) e levando-se em conta que as massas de cristais obtidas (M_c) também foram muito próximas, esperava-se para um número de cristais menor, tamanhos maiores, o que não aconteceu. No entanto, não só os parâmetros foram discrepantes, mas também a morfologia das partículas do ensaio E2, como já relatado, não foi a esperada: não se observou cristais do tipo romboédrico, mas partículas esféricas. Assim, este ensaio não foi levado em consideração quando da análise dos resultados do ensaio E3.

Para o ensaio E3, ensaio com menor concentração inicial de insulina (1,5 mg/mL), o valor de N_T foi menor que para os ensaios de maior concentração (E1 e E4, de 2 mg/ml), devido talvez à menor supersaturação; o menor tamanho do cristal deve ter sido função da menor massa disponível para a cristalização (0,35 g de cristal).

Observando todos os resultados, nota-se que para os ensaios realizados em pH 6,30, os cristais obtidos foram maiores e mais regulares para o sistema $\text{NaHCO}_3/\text{ZnCl}_2/\text{CO}_2$.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

Os estudos realizados demonstraram que o CO₂ como agente acidificante é capaz de cristalizar a insulina suína na presença de zinco – importante na formação da unidade cristalina, o hexâmero – podendo ser considerado nos processos de recuperação de proteínas. Porém, o uso de concentração elevada (5 mg/mL) para a insulina suína, pode levar a formação de gel, o que não é interessante em um processo industrial devido à difícil separação dos cristais da fase líquida. No entanto, mesmo com a formação de gel, houve presença de cristais.

A solubilidade da insulina suína em NaHCO₃ sob atmosfera de CO₂, apresenta o mesmo perfil encontrado para curvas de solubilidade de proteínas em função do pH obtidas por precipitação com ácidos convencionais. No entanto, o complexo zinco-insulina apresenta baixa solubilidade a 15°C, na faixa de pH de 6,0 a 7,0, para o sistema solvente empregado.

Os tipos de agitadores, magnético e hélice de pás inclinadas, levaram à formação de diferentes tamanhos de cristais, porém, cristais romboédricos se formaram nas diversas condições de cristalização utilizadas nesse trabalho. O tamanho dos cristais, provavelmente foi causado pela maior velocidade de agitação utilizada para o agitador magnético.

As análises de DSC comprovaram a existência de uma mudança na estrutura da insulina, de uma fase mais estável e menos estável, já evidenciado nos ensaios de dissolução.

As cinéticas de dissolução e cristalização se ajustaram à lei de potências em relação à supersaturação, mostrando que a dissolução é um processo mais rápido do que o crescimento dos cristais e também confirma a baixa solubilidade da insulina no sistema $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ em que g é maior que 2. Além disso, pode-se concluir que a abordagem empregada para obter dados cinéticos para proteínas é a mesma utilizada para moléculas menores. No entanto, no processo de cristalização de proteínas existem algumas particularidades que a difere da cristalização de moléculas menores e menos complexas.

Nos ensaios para determinação da taxa de nucleação, notou-se que os cristais obtidos em pH 6,30 foram maiores e apresentaram geometria mais regular que os cristais obtidos em pH 6,50. O tamanho dos cristais é função do N_T e para os processos em que houve maior N_T , o tamanho médio final dos cristais foi menor.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Sugere-se para trabalhos futuros:

- 1) Determinar curvas de solubilidade para a insulina em diferentes temperaturas, velocidades de agitação e concentrações iniciais de insulina e estudar a influência destes parâmetros na dissolução, velocidade de crescimento e na distribuição de tamanho dos cristais da insulina;
- 2) Realizar ensaios de cristalização convencional para comparar a cinética de crescimento, tipo e tamanho dos cristais com os resultados obtidos na cristalização da insulina com o CO_2 como agente acidificante;
- 3) Utilizar outras proteínas no processo de cristalização com o CO_2 para obter parâmetros cinéticos e termodinâmicos e verificar se a mesma abordagem empregada para pequenas moléculas se aplica a outras macromoléculas;
- 4) Cristalizar proteína na região alcalina utilizando carbamato de amônio como agente volátil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHERIE, N. Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, v. 34, p. 266-272, 2004.

BERNARDO, A., CALMANOVICI, C. E., MIRANDA, E. A. Observance of polymorphic behavior during dissolution of insulin and lysozyme. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, n. 3, p. 331-339, 2005.

BERNARDO, ANDRÉ. *Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a cristalização de proteínas a partir da dissolução e do tempo de indução*. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002, 93 p., Tese (Mestrado).

BLUNDELL, T., DODSON, G., HODGKIN, D. MERCOLA, D., Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Advances in Protein Chemistry*, v. 26, p. 279-402, 1972.

BOISTELLE, R., ASTIER, J. P. Solubility, phase transition, kinetic ripening and growth rates of porcine pancreatic α -amylase isoenzymes. *Journal of Crystal Growth*, v. 123, p. 109-120, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANGE, J., ANDERSEN, L., LAURSEN, E. D., MEYN, G., RASMUSSEN, E. Toward understanding insulin fibrillation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, n. 5, p. 517-525, 1997.

BROMBERG, L. RASHBA-STEP, J., SCOTT, T. Insulin particle formation in supersaturated aqueous solutions of poly(ethylene glycol). *Biophysical Journal*, v. 89, p. 3424-3433, 2005.

CHAYEN, N. E. Recent advances in methodology for the crystallization of biological macromolecules. *Journal of Crystal Growth*, v. 198/199, p. 649-655, 1999.

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

DODSON, E. J., DODSON, G.G., LEWITOVA, A. SABESAN, M. Zinc-free cubic pig insulin: crystallization and structure determination. *Journal of Molecular Biology*, v. 125, p. 387-396, 1978.

GEHLE, D., SCHUGERL, E. Protein recovery by continuous flotation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 133-138, 1984.

HARRISON, R. G., TODD, P., RUDGE, S. R., PETRIDES, D. P. *Bioseparations science and engineering*, Oxford University Press, Oxford, 432 p., 2003.

HOFLAND, G. W., VAN ES, M., VAN DER WIELEN, L. A. M., WITKAMP, G.-J. Isoelectric precipitation of casein using high-pressure CO₂. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 38, p. 4919-4927, 1999.

HOFLAND, G. W., DE RIJKE, A., THIERING, R., VAN DER WIELEN, L. A. M., WITKAMP, G. J. Isoelectric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p. 357-368, 2000.

HODGKIN, D. C. Insulin, its chemistry and biochemistry. *Proceedings of Royal Society London*, v. 338, p. 251-275, 1974.

HULBURT, H. M. KATZ, S., Some problems in particle technology, a statistical mechanical formulation. *Chemical Engineering Science*, v. 19, p. 555-574, 1964.

JACOBSEN, C., GARSIDE, J., HOARE, M. Nucleation and growth of microbial lipase crystals from clarified concentrated fermentation broths. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 57, p.666-675, 1998.

JEFFREY, P. D., COATES, J. H. An equilibrium ultracentrifuge study of the self-association of bovine insulin. *Biochemistry*, v. 5, p. 489-498, 1966.

JORDAN, P. J., LAY, K., NGAN, N., RODLEY, G. F. Casein precipitation using high pressure carbon dioxide. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, v. 22, p. 247-256, 1987.

KHORSHID, N., HOSSAIN, M. M., FARID, M. M. Precipitation of food protein using high pressure carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 1214-1220, 2007.

LADISCH, M. R. *Bioseparations engineering: Principles, practice, and economics*. Wiley-Interscience, New York, 735 p., 2001.

LITTLECHILD, J. A. Protein crystallization: magical or logical: can we establish some general rules? *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 24, p. 111-118, 1991.

LU, J., WANG, X. J., CHING, C. B. Batch crystallization of soluble proteins: effect of precipitant, temperature and additive. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, v. 45, p. 201-217, 2002.

MCPHERSON, A. *Preparation and analysis of protein crystals*, John Wiley & Sons, New York, 371 p., 1982.

MCPHERSON, A. *Crystallization of biological macromolecules*, Cold Spring Harbor, New York, 586 p., 1999.

MCPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. *Methods*, v. 34, p. 254-265, 2004.

MERSMANN, A. *Crystallization technology handbook*, edited by Mersmann A., Marcel Dekker, New York, 691 p., 1995.

MYERSON, A. S. *Handbook of industrial crystallization*, edited by Allan S. Myerson, 2nd edition, Butterworth, Woburn, 313 p., 2002.

MULLIN, J. W. *Crystallization*, 3rd edition, Butterworth, Oxford, 527 p., 1993.

NORRMAN, M., SCHLUCKEBIER, G. Crystallographic characterization of two novel crystal forms of human insulin induced by chaotropic agents and a shift in pH. *BMC Structural Biology*, v. 7, n. 83, p. 1-14, 2007.

NÝVLT, J., HOSTOMSKÝ, J., GIULIETTI, M. *Cristalização*, EdUFSCAR/IPT, São Carlos, 106 p., 2001.

O'DONOGHUE, S. I., CHANG, X., ABSEHER, R., NILGES, M., LED, J. J. Unraveling the symmetry ambiguity in a hexamer: calculation of the R6 human insulin structure. *Journal of Biomolecular NMR*, v. 16, p. 93-108, 2000.

PAUL, E. L., ATIEMO-OBENG, V. A., KRESTA, S. M. *Handbook of industrial mixing: Science and practice*, John Wiley & Sons, New Jersey, 1377 p., 2004.

QI, X. M., YAO, S. J., GUAN, Y. X. Novel isoelectric precipitation of proteins in a pressurized carbon dioxide–water–ethanol system, *Biotechnology Progress* v. 20, n. 4, p. 1176-1182, 2004.

RANDOLPH, A. D., LARSON, M. A. *Theory of particulate processes: Analysis and techniques of continuous crystallization*, 2nd edition, Academic Press, New York, 251 p., 1988.

SAKABE, N., SAKABE, K., SASAKI, K. X-ray studies of water structure in 2 Zn insulin crystal. *Journal of Biosciences*, v. 8, p. 45-55, 1985.

SAMADI, A., HUSSON, S. M. Towards the recovery of l-aspartic acid from aqueous solution: Exploiting pH-dependent solubility via carbon dioxide addition. *Separation Science and Technology*, v. 38, p. 2837-2850, 2003.

SCOPE, R. K. *Protein purification*, 2nd ed., New York, Springer-Verlag New York Inc., 41-71, 1988.

SCHMIDT, S., HAVEKOST, D., KAISER, K., KAULING, J., HENZLER, H. J. Crystallization for the downstream processing of proteins. *Engineering in Life Sciences*, v. 5, p. 273-276, 2005.

SCHLICHTKRULL, J. Insulin Crystals: II. Shape of rhombohedral Zn-insulin crystals in relation to species and crystallization media. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 10, p. 1459-1464, 1956.

SHEKUNOV, B. YU., YORK, P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. *Journal of Crystal Growth*, v. 211, p. 122-136, 2000.

TASHIMA, ALEXANDRE KEIJI, *Estudo da precipitação isoelétrica da insulina suína em soluções aquosas com o dióxido de carbono*. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007, 208 p., Tese (Doutorado).

TASHIMA, A. K., OTTENS, M., VAN DER WIELEN, L., CYNTRA, D. E., PAULI, J. R., PESSÔA FILHO, P. A., MIRANDA, E. A. Precipitation of porcine insulin with carbon dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, p. 909-9019, 2009.

THIERING, R., HOFLAND, G., FOSTER, N., WITKAMP, G. J., VAN DER WIELEN, L. Carbon dioxide induced soybean protein precipitation: protein fractionation, particle aggregation, and continuous operation. *Biotechnology Progress*, v. 17, p. 513-521, 2001.

THIERING, R., HOFLAND, G., FOSTER, N., WITKAMP, G.-J., VAN DER WIELEN, L. Fractionation of soybean proteins with pressurized carbon dioxide as a volatile electrolyte. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 73, p. 1-11, 2001.

VAN ROSMALEN, G. M., BERMINGHAM, S., BRUINSMA, D., KRAMER, H., DERENZO, S., SECKLER, M., RÉ, M. I., CEKINSKI, E., GIULIETTI, M. *TU Delft – IPT lectures on industrial crystallization and precipitation*, Curso de Cristalização Industrial, IPT, São Paulo, 2004.

VELEV, O. D., KALER, E. W., LENHOFF, A. M. Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen. *Biophysical Journal*, v. 75, p. 2682-2697, 1998.

VILELA, L. Comunicação pessoal.

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

YIP, C. M., DEFELIPPIS, M. R., FRANK, B. H., BRADER, M. L., WARD, M. D. Structural and morphological characterization of ultralente insulin crystals by atomic force microscopy: evidence of hydrophobically driven assembly. *Biophysical Journal*, v. 75, p. 1172-1179, 1998.

WALSH, G., HEADON, D. R. *Protein biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester, 371 p., 1994.

WINTERSTEINER, O., ABRAMSON, H. A. The isoelectric point of insulin: electrical properties of adsorbed and crystalline insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 99, p. 741-753, 1933.

WOOD, W. M. L. *Chirality in industry II*. John Wiley & Sons, 1997, Cap. 7: Crystal science techniques in the manufacture of chiral compounds, p. 119-156.

APÊNDICE A – Curvas padrão

A.1. Curva padrão de dosagem de proteína por absorvância a 280 nm e 320 nm

Para os ensaios de cristalização de insulina suína em solução de $\text{NaHCO}_3\text{-ZnCl}_2$ as medidas da concentração da proteína em solução foram determinadas por absorvância a 280 e 320 nm (usada para eliminar o efeito de turbidez da amostra) e calculadas de acordo com a equação da reta obtida pela curva de calibração para o sistema insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L (Figura A.1) e para o sistema insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e HCl 4 mmol/L (Figura A.2). A curva padrão determina o coeficiente de absorção específico da proteína em questão e correlaciona de forma linear a concentração da proteína com os valores de absorvância medidos.

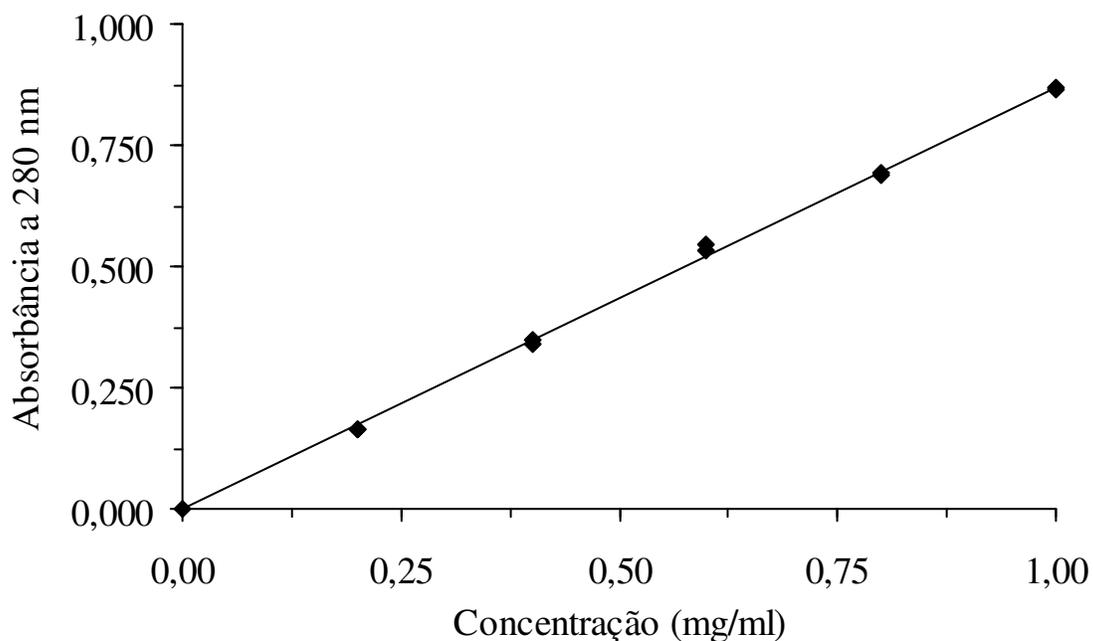


Figura A.1 – Curva padrão para medida de absorvância a 280 nm da solução de insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L, pH 9,38. Absorvância $_{(280\text{ nm})} = 0,87 \times$ Concentração de insulina, $R^2 = 0,99$.

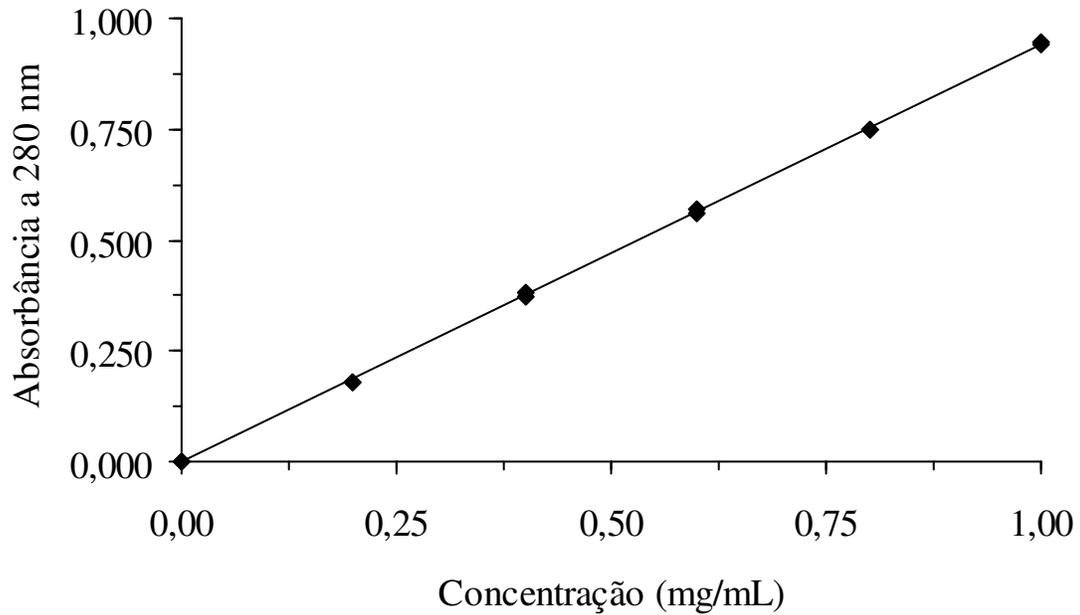


Figura A.2 – Curva padrão para medida de absorvância a 280 nm da solução de insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e HCl 4 mmol/L, pH 7,53. Absorvância ($_{280 \text{ nm}}$) = 0,94 x Concentração de insulina, $R^2 = 0,99$.

A.2. Curva padrão de dosagem de proteína por absorvância a 595 nm.

Para os ensaios de dissolução de insulina suína em solução de $\text{NaHCO}_3\text{-ZnCl}_2$ as medidas da concentração da proteína em solução foram determinadas pelo método de Bradford modificado (método de maior sensibilidade para valores menores de concentração encontrados nesses ensaios) e calculadas de acordo com a equação da reta obtida pela curva de calibração (Figura A.3) para o sistema insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e HCl 4 mmol/L.

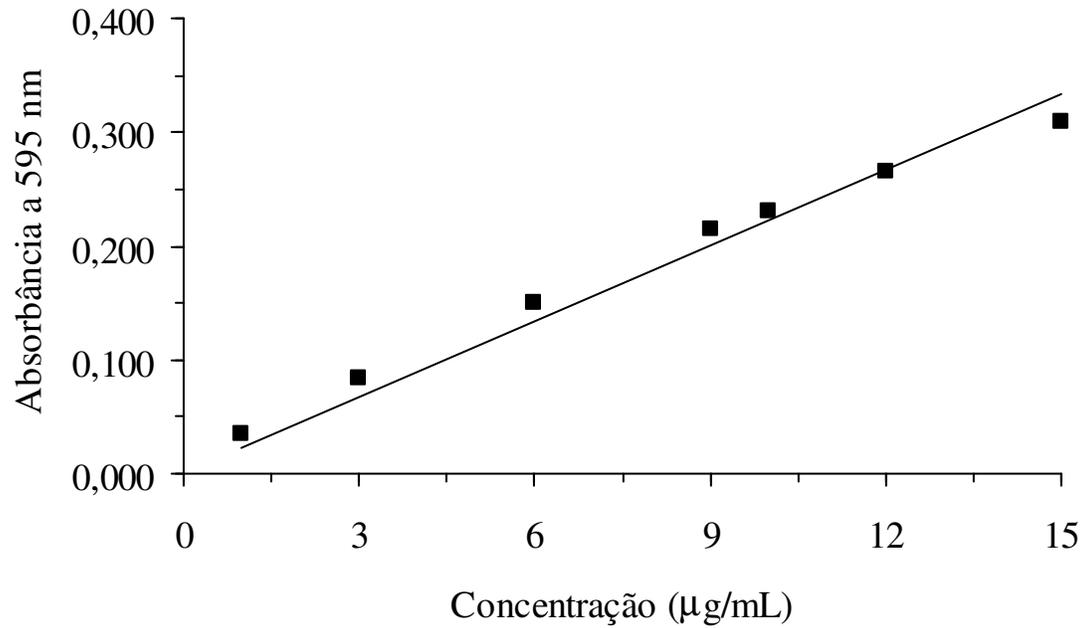
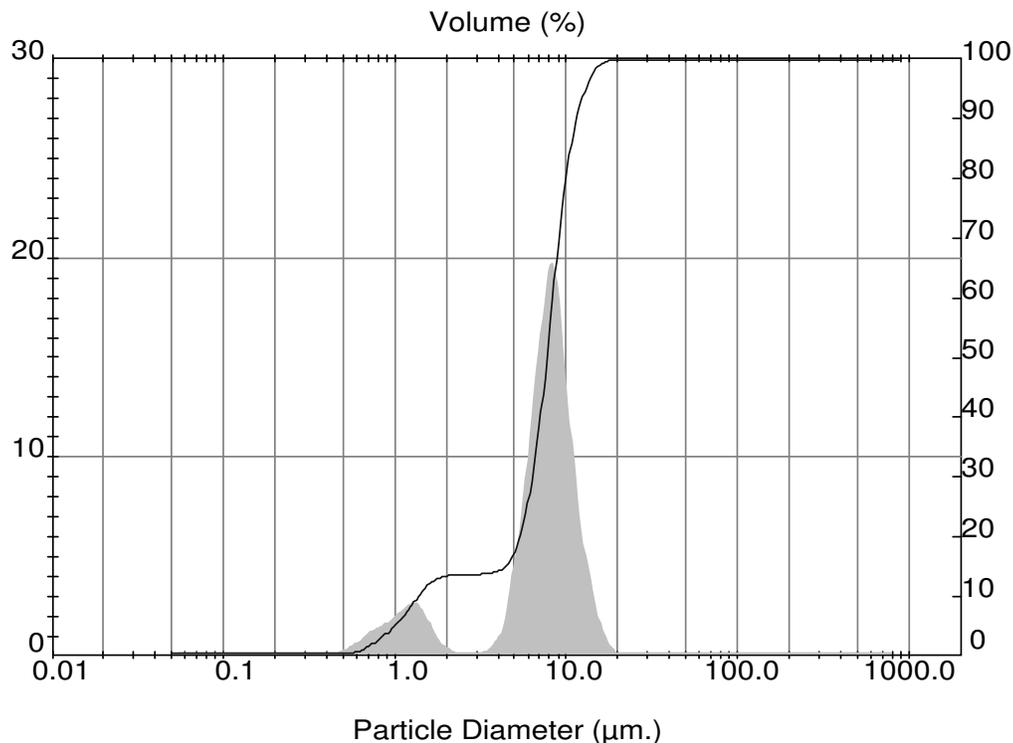


Figura A.3 - Curva padrão para determinação da concentração de insulina em NaHCO_3 50 mmol/L pH 7,50 através da medida de absorvância a 595 nm. $\text{Absorvância}_{(595 \text{ nm})} = 0,0223 \times \text{Concentração de insulina}$, $R^2 = 0,97$.

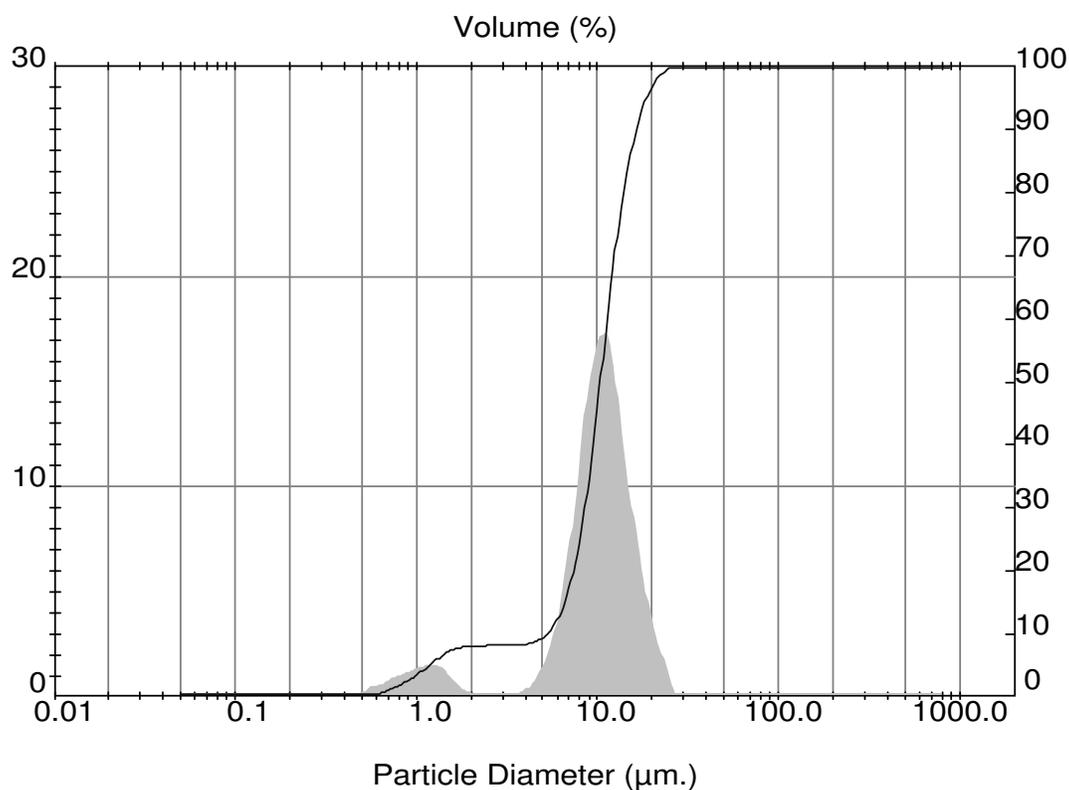
APÊNDICE B – Análise de distribuição do tamanho de cristais (Mastersizer S, Malvern) para os ensaios exploratórios de cristalização de insulina suína



Result: Analysis Table

ID: Insulina com tampao File: 270608 Path: C:\USUARIOS\GISELE\		Run No: 20 Rec. No: 120		Measured: 27/6/08 10:16 Analysed: 27/6/08 10:16 Source: Analysed			
Range: 300RF mm Presentation: 3OHD Modifications: None		Beam: 2.40 mm Analysis: Polydisperse		Sampler: MS14 Obs': 12.1 % Residual: 1.008 %			
Conc. = 0.0075 %Vol Distribution: Volume D(v, 0.1) = 1.38 µm Span = 1.306E+00		Density = 1.120 g/cm ³ D[4, 3] = 7.50 µm D(v, 0.5) = 7.74 µm Uniformity = 3.358E-01		S.S.A.= 1.2990 m ² /g D[3, 2] = 4.12 µm D(v, 0.9) = 11.49 µm			
Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	1.24	9.00	69.32	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	2.41	10.48	83.95	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	3.90	12.21	92.85	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	5.76	14.22	97.47	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	8.13	16.57	99.41	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	10.73	19.31	100.00	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	12.51	22.49	100.00	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	13.28	26.20	100.00	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	13.58	30.53	100.00	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	13.62	35.56	100.00	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	13.67	41.43	100.00	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	13.85	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	14.52	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	16.74	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	22.57	76.32	100.00		
0.49	0.14	6.63	33.54	88.91	100.00		
0.58	0.52	7.72	49.64	103.58	100.00		

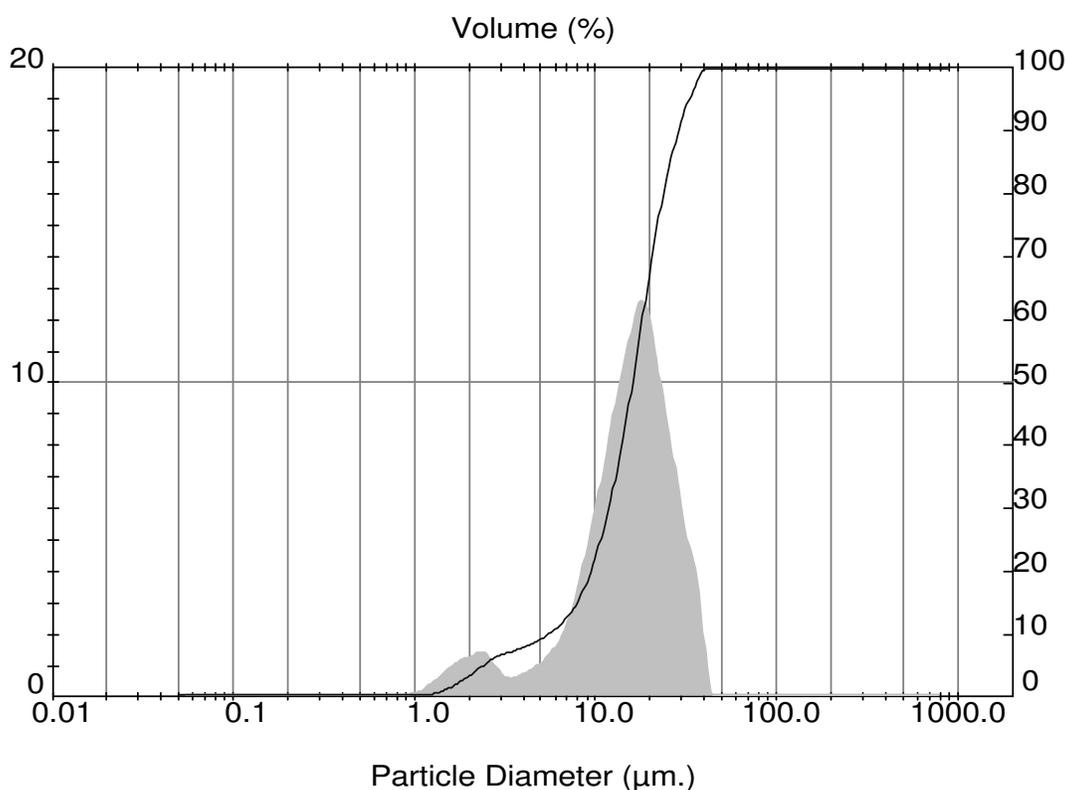
Figura B.1 – Ensaio C1: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 5°C e pH 6,50.



Result: Analysis Table

ID: Insulina R1		Run No: 1		Measured: 2/7/08 09:14			
File: 020708		Rec. No: 1		Analysed: 2/7/08 09:14			
Path: C:\USUARIOS\GISELE\				Source: Analysed			
Range: 300RF mm		Beam: 2.40 mm		Sampler: MS14			
Presentation: 3OHD		Analysis: Polydisperse		Obs: 14.7 %			
Modifications: None				Residual: 0.976 %			
Conc. = 0.0131 %Vol		Density = 1.120 g/cm ³		S.S.A.= 0.9214 m ² /g			
Distribution: Volume		D[4, 3] = 10.56 µm		D[3, 2] = 5.81 µm			
D(v, 0.1) = 5.31 µm		D(v, 0.5) = 10.39 µm		D(v, 0.9) = 16.43 µm			
Span = 1.070E+00		Uniformity = 3.410E-01					
Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	0.83	9.00	34.91	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	1.62	10.48	51.00	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	2.65	12.21	68.10	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	3.91	14.22	81.40	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	5.38	16.57	90.43	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	6.80	19.31	95.95	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	7.65	22.49	98.83	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	7.97	26.20	100.00	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	8.09	30.53	100.00	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	8.10	35.56	100.00	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	8.12	41.43	100.00	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	8.18	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	8.41	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	9.13	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	11.02	76.32	100.00		
0.49	0.00	6.63	15.00	88.91	100.00		
0.58	0.32	7.72	22.44	103.58	100.00		

Figura B.2 – Ensaio C2: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 5°C e pH 6,50.



Result: Analysis Table

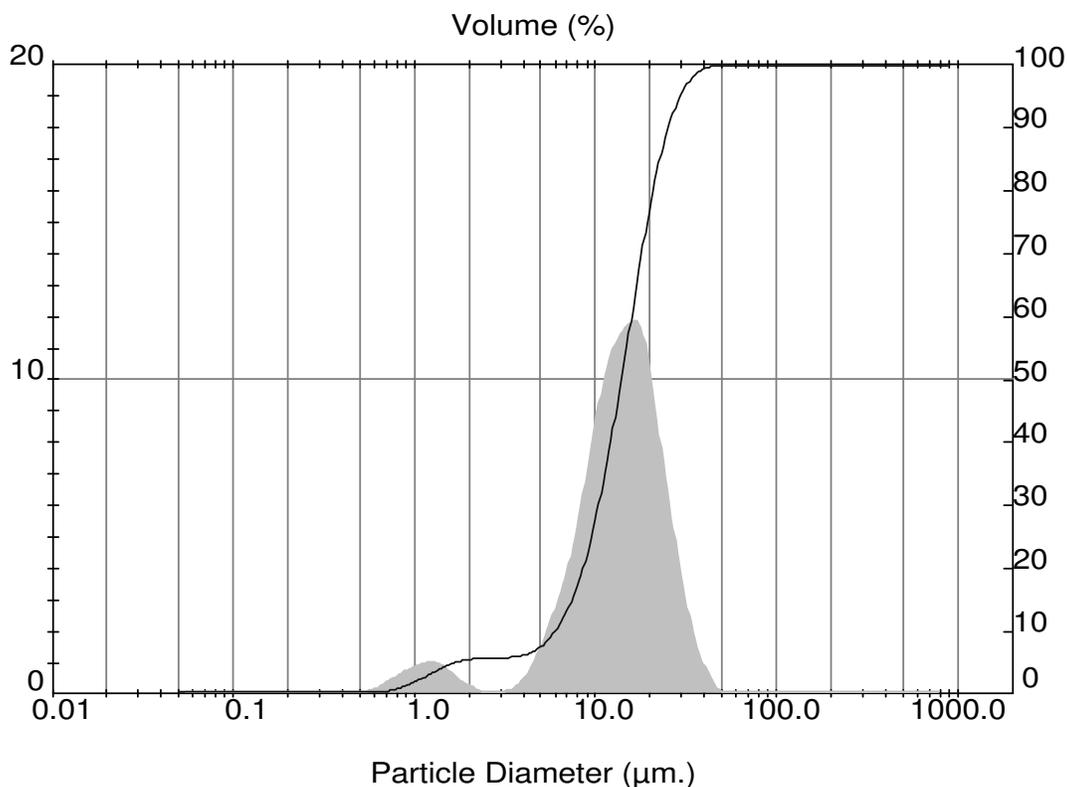
ID: Insulina R1 File: 230708 Path: C:\USUARIOS\GISELE\	Run No: 5 Rec. No: 5	Measured: 23/7/08 14:06 Analysed: 23/7/08 14:06 Source: Analysed
--	-------------------------	--

Range: 300RF mm Presentation: 3OHD Modifications: None	Beam: 2.40 mm Analysis: Polydisperse	Sampler: MS14 Obs': 11.3 % Residual: 0.943 %
--	---	--

Conc. = 0.0148 %Vol Distribution: Volume D(v, 0.1) = 5.50 µm Span = 1.447E+00	Density = 1.120 g/cm ³ D[4, 3] = 16.73 µm D(v, 0.5) = 16.07 µm Uniformity = 4.309E-01	S.S.A.= 0.5548 m ² /g D[3, 2] = 9.66 µm D(v, 0.9) = 28.75 µm
--	---	---

Size (µm)	Volume Under%						
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	18.42	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	24.05	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	0.04	12.21	31.55	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	0.17	14.22	41.15	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	0.46	16.57	52.42	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	1.06	19.31	64.99	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	2.00	22.49	76.44	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	3.17	26.20	85.55	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	4.51	30.53	92.43	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	5.91	35.56	97.20	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	6.83	41.43	100.00	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	7.44	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	8.16	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	9.07	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	10.30	76.32	100.00		
0.49	0.00	6.63	11.98	88.91	100.00		
0.58	0.00	7.72	14.48	103.58	100.00		

Figura B.3 – Ensaio C3: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 5°C e pH 6,37.



Result: Analysis Table

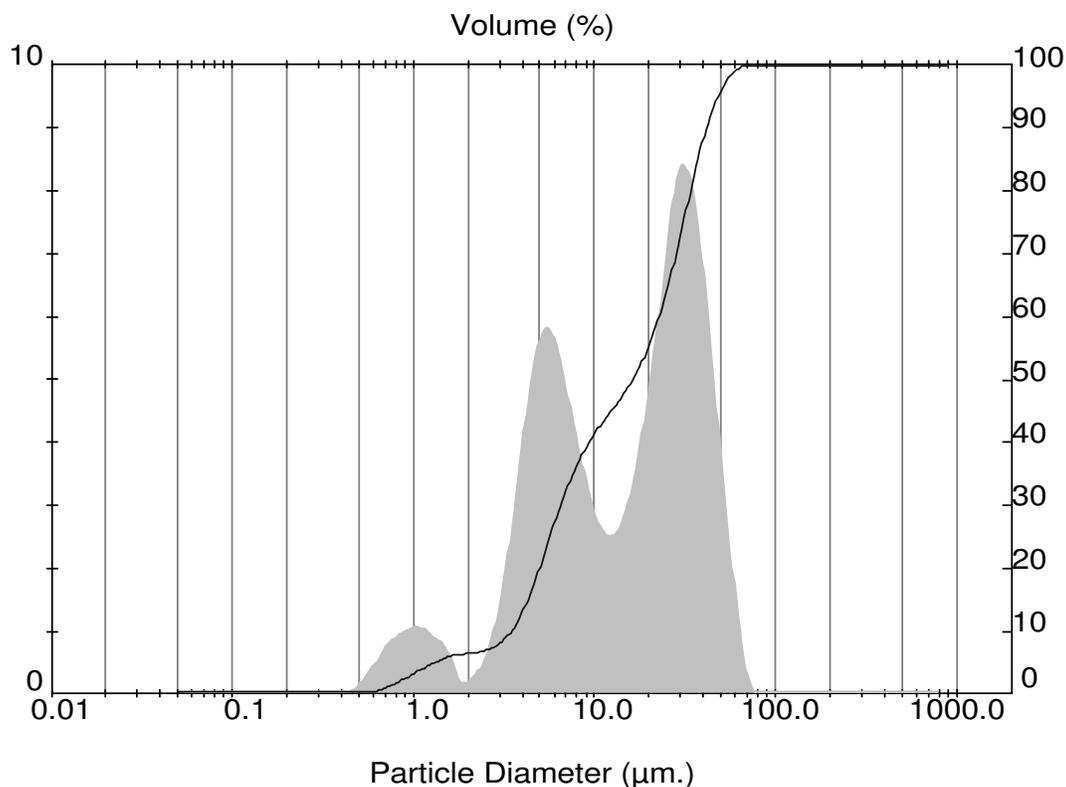
ID: Insulina R2 File: 250708 Path: C:\USUARIOS\GISELE\	Run No: 10 Rec. No: 20	Measured: 25/7/08 14:15 Analysed: 25/7/08 14:15 Source: Analysed
--	---------------------------	--

Range: 300RF mm Presentation: 3OHD Modifications: None	Beam: 2.40 mm Analysis: Polydisperse	Sampler: MS14 Obs': 12.5 % Residual: 1.915 %
--	---	--

Conc. = 0.0144 %Vol Distribution: Volume D(v, 0.1) = 5.98 µm Span = 1.384E+00	Density = 1.120 g/cm ³ D[4, 3] = 14.87 µm D(v, 0.5) = 13.91 µm Uniformity = 4.386E-01	S.S.A. = 0.6853 m ² /g D[3, 2] = 7.82 µm D(v, 0.9) = 25.23 µm
--	---	--

Size (µm)	Volume Under%						
0.05	0.00	0.67	0.31	9.00	22.19	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	0.75	10.48	30.37	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	1.42	12.21	40.46	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	2.27	14.22	51.69	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	3.27	16.57	63.41	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	4.27	19.31	75.02	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	5.04	22.49	84.54	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	5.48	26.20	91.50	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	5.70	30.53	95.97	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	5.75	35.56	98.45	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	5.81	41.43	99.59	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	5.95	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	6.34	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	7.30	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	9.17	76.32	100.00		
0.49	0.00	6.63	12.07	88.91	100.00		
0.58	0.09	7.72	16.20	103.58	100.00		

Figura B.4 – Ensaio C4: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 5°C e pH 6,35.



Result: Analysis Table

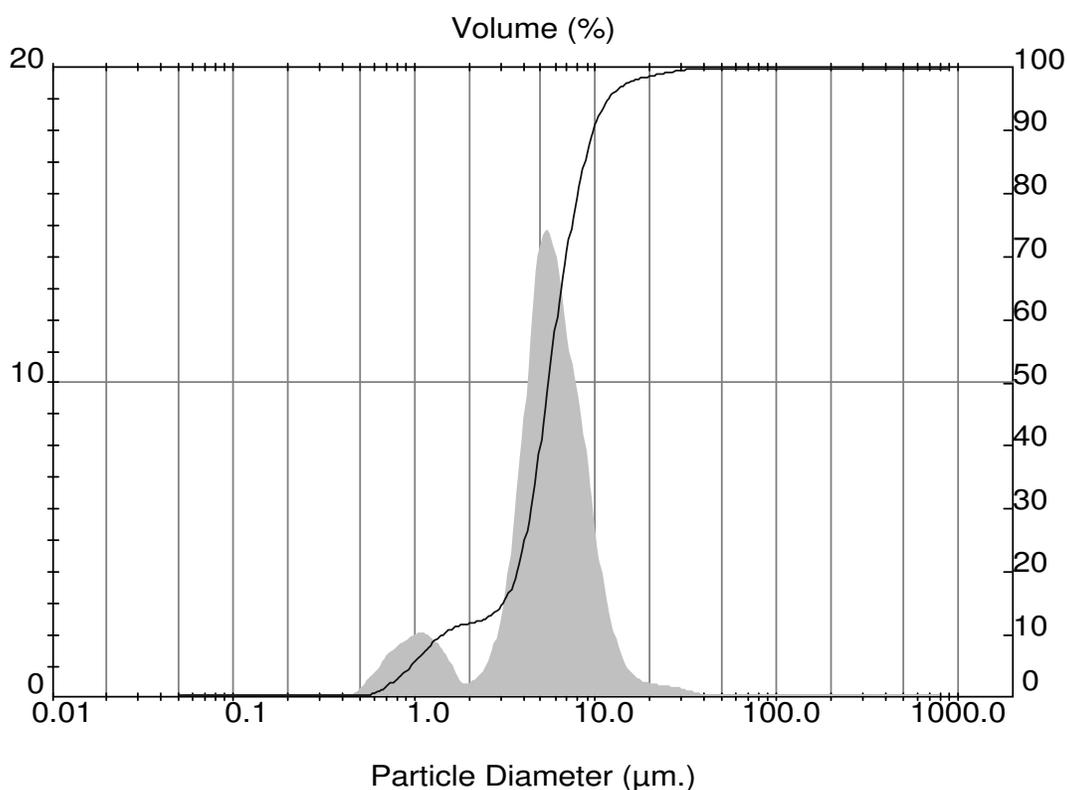
ID: Insulina R1 File: 300708 Path: C:\USUARIOS\GISELE\	Run No: 6 Rec. No: 6	Measured: 31/7/08 14:07 Analysed: 31/7/08 14:07 Source: Analysed
--	-------------------------	--

Range: 300RF mm Presentation: 3OHD Modifications: None	Beam: 2.40 mm Analysis: Polydisperse	Sampler: MS14 Obs': 11.6 % Residual: 2.334 %
--	---	--

Conc. = 0.0109 %Vol Distribution: Volume D(v, 0.1) = 3.48 µm Span = 2.347E+00	Density = 1.120 g/cm ³ D[4, 3] = 19.58 µm D(v, 0.5) = 16.29 µm Uniformity = 8.098E-01	S.S.A. = 0.8603 m ² /g D[3, 2] = 6.23 µm D(v, 0.9) = 41.72 µm
--	---	--

Size (µm)	Volume Under%						
0.05	0.00	0.67	0.83	9.00	39.19	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	1.63	10.48	42.21	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	2.58	12.21	44.77	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	3.63	14.22	47.34	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	4.67	16.57	50.37	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	5.55	19.31	54.31	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	6.23	22.49	59.49	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	6.44	26.20	66.11	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	6.70	30.53	74.25	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	7.23	35.56	82.52	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	8.38	41.43	89.72	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	10.60	48.27	95.01	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	14.27	56.23	98.24	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	19.33	65.51	99.74	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	25.12	76.32	100.00		
0.49	0.06	6.63	30.66	88.91	100.00		
0.58	0.32	7.72	35.39	103.58	100.00		

Figura B.5 – Ensaio C5: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 5°C e pH 6,46.



Result: Analysis Table

ID: Insulina F Rep.1 File: 060808 Path: C:\USUARIOS\GISELE\		Run No: 25 Rec. No: 25		Measured: 6/8/08 14:11 Analysed: 6/8/08 14:11 Source: Analysed			
Range: 300RF mm Presentation: 3OHD Modifications: None		Beam: 2.40 mm Analysis: Polydisperse		Sampler: MS14 Obs: 14.8 % Residual: 3.355 %			
Conc. = 0.0080 %Vol Distribution: Volume D(v, 0.1) = 1.43 µm Span = 1.511E+00		Density = 1.120 g/cm ³ D[4, 3] = 6.05 µm D(v, 0.5) = 5.50 µm Uniformity = 4.534E-01		S.S.A.= 1.5029 m ² /g D[3, 2] = 3.56 µm D(v, 0.9) = 9.74 µm			
Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	1.37	9.00	86.69	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	2.75	10.48	92.36	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	4.42	12.21	95.56	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	6.36	14.22	97.20	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	8.36	16.57	98.06	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	10.05	19.31	98.59	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	11.18	22.49	99.01	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	11.67	26.20	99.37	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	12.17	30.53	99.66	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	13.08	35.56	99.86	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	14.97	41.43	99.97	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	18.92	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	26.50	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	38.58	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	53.34	76.32	100.00		
0.49	0.10	6.63	66.93	88.91	100.00		
0.58	0.52	7.72	77.89	103.58	100.00		

Figura B.6 – Ensaio C6: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 5°C e pH 6,51.

APÊNDICE C – Dados para determinação das cinéticas de dissolução, crescimento dos cristais e taxa da nucleação

C.1. Cinética de dissolução

Com os dados da Tabela 4.4 foram determinados os parâmetros utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 15°C . Os dados calculados são mostrados nas Tabelas C.1, C.2, C.3, C.4.

Tabela C.1 - Dados utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em pH 6,30.

Dados	L (μm)	t (h)	pH	ΔL	Δt	$-\Delta L/\Delta t = D$	C_t ($\mu\text{g/mL}$)	S ($\mu\text{g/mL}$)	ΔC	$\log(D)$	$\log(\Delta C)$
-	14,24	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	19,05	0,33	6,66	4,81	0,33	-14,58	-	-	-	-	-
2	18,1	0,83	6,35	-0,95	0,50	1,90	122,36	9,25	113,11	0,28	2,05
3	15,3	2,00	6,18	-2,80	1,17	2,39	121,36	4,51	116,85	0,38	2,07
4	13,6	4,00	6,20	-1,70	2,00	0,85	100,00	4,90	95,10	-0,07	1,98
5	10,76	6,00	6,22	-2,84	2,00	1,42	83,41	5,34	78,07	0,15	1,89
6	11,57	8,00	6,23	0,81	2,00	-0,41	-	-	-	-	-
7	10,28	10,00	6,23	-1,29	2,00	0,65	39,91	5,57	34,34	-0,19	1,54
8	9,39	24,00	6,28	-0,89	14,00	0,06	11,71	6,88	4,83	-1,20	0,68

Tabela C.2 - Dados utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em pH 6,50.

Dados	L (µm)	t (h)	pH	ΔL	Δt	$-\Delta L/\Delta t = D$	C_t (µg/mL)	S (µg/mL)	ΔC	log(D)	log(ΔC)
-	14,24	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	16,14	0,33	6,75	1,90	0,33	-5,76	-	-	-	-	-
10	13,73	0,83	6,52	-2,41	0,50	4,82	181,0	18,99	162,01	0,68	2,21
11	13,46	2,00	6,49	-0,27	1,17	0,23	181,8	16,72	165,08	-0,64	2,22
12	10,73	4,00	6,48	-2,73	2,00	1,37	188,5	16,03	172,47	0,14	2,24
13	10,76	6,00	6,47	0,03	2,00	-0,01	-	-	-	-	-
14	10,15	8,00	6,47	-0,61	2,00	0,31	177,1	15,37	161,73	-0,52	2,21
15	10,25	24,00	6,47	0,10	16,00	-0,01	-	-	-	-	-

Tabela C.3 - Dados utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em pH 6,60.

Dados	L (µm)	t (h)	pH	ΔL	Δt	$-\Delta L/\Delta t = D$	C_t (µg/mL)	S (µg/mL)	ΔC	log(D)	log(ΔC)
-	14,24	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	16,30	0,33	6,60	2,06	0,33	-6,24	-	-	-	-	-
17	14,47	1,00	6,60	-1,83	0,67	2,73	58,95	26,65	32,30	0,44	1,53
18	11,60	2,00	6,56	-2,87	1,00	2,87	22,69	22,50	0,19	0,46	-0,72
19	12,42	5,00	6,55	0,82	3,00	-0,27	18,84	-21,55	-2,71	-	-
20	7,72	8,50	6,56	-4,70	3,50	1,34	15,58	22,49	-6,91	-	-
21	1,68	24,00	6,58	-0,04	15,50	0,003	11,41	24,47	-13,06	-	-

Tabela C.4 - Dados utilizados no cálculo da cinética de dissolução da insulina suína em pH 7,34.

Dados	L (µm)	t (h)	pH	ΔL	Δt	$-\Delta L/\Delta t = D$	C_t (µg/mL)	S (µg/mL)	ΔC	log(D)	log(ΔC)
-	14,24	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	15,14	0,33	7,10	0,90	0,33	-2,73	-	-	-	-	-
23	12,90	1,00	7,18	-2,24	0,67	3,34	663,2	309,86	353,57	0,52	2,55
24	14,77	3,00	7,29	1,87	2,00	-0,94	-	-	-	-	-
25	10,26	5,00	7,32	-4,51	2,00	2,26	605,2	560,21	44,99	0,35	1,65
26	7,88	7,00	7,34	-2,38	2,00	1,19	609,5	609,67	-0,17	-	-
27	8,69	24,00	7,34	0,81	17,00	-0,05	-	-	-	-	-

C.2. – Cinética de crescimento de cristais

Os dados calculados, para estimar a cinética de cristalização da insulina suína em NaHCO_3 50 mmol/L e ZnCl_2 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO_2 a 15°C , são apresentados nas Tabelas C.5, C.6 e C.7.

Tabela C.5 - Dados utilizados no cálculo da cinética de crescimento da insulina suína em pH 6,30 a 15°C .

Ensaio E1											
Dados	L (μm)	t (h)	pH	ΔL	Δt	$\Delta\text{L}/\Delta\text{t} = \text{G}$	C_t ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ΔC	log(G)	log(ΔC)
1	13,58	22	6,33	13,58	22,00	0,62	274,49	8,50	265,99	-0,210	2,425
2	15,22	24	6,34	1,64	2,00	0,82	243,29	8,87	234,42	-0,086	2,370
3	17,32	26	6,33	2,10	2,00	1,05	226,63	8,50	218,13	0,021	2,339
4	19,64	28	6,33	2,32	2,00	1,16	216,87	8,50	208,37	0,064	2,319
5	21,11	30	6,32	1,47	2,00	0,73	208,57	8,15	200,42	-0,134	2,302
6	21,77	48	6,31	0,66	18,00	0,04	192,65	7,81	184,84	-1,436	2,267
7	23,00	103	6,33	1,23	55,00	0,02	76,99	8,50	68,49	-1,650	1,836

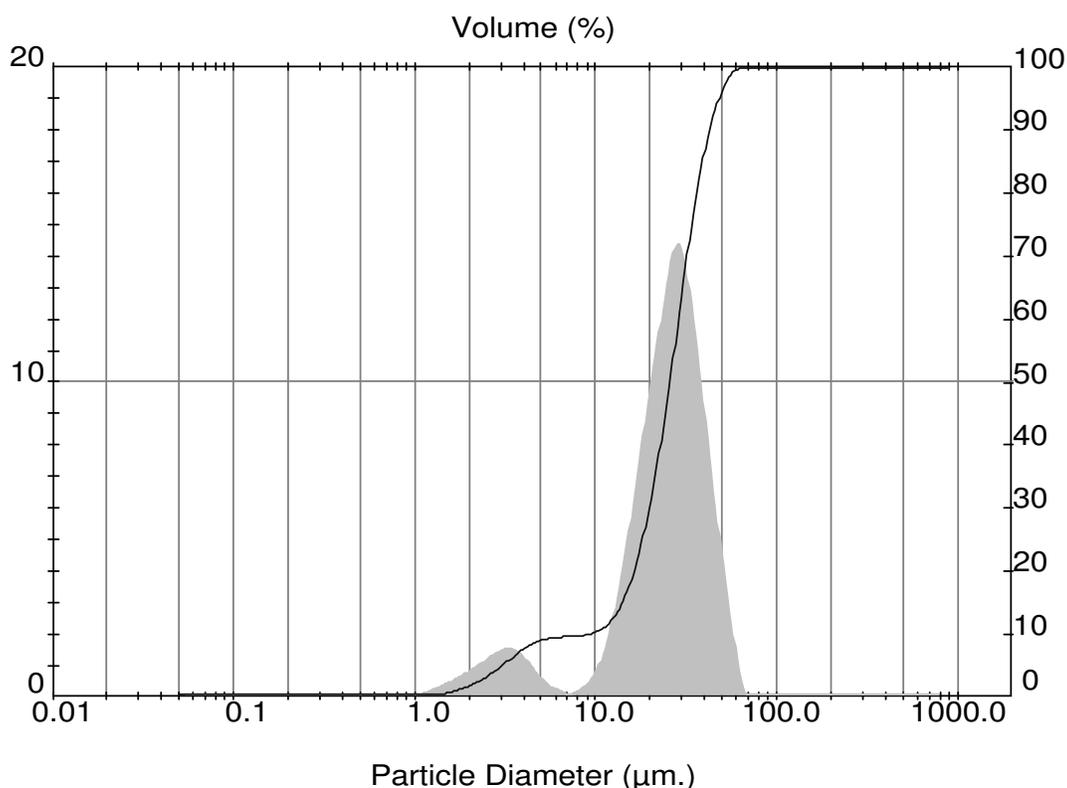
Tabela C.6 - Dados utilizados no cálculo da cinética de crescimento da insulina suína em pH 6,30 a 15°C.

Ensaio E4											
Dados	L (µm)	t (h)	pH	ΔL	Δt	ΔL/Δt = G	C_t (µg/mL)	S (µg/mL)	ΔC	log(G)	log(ΔC)
8	13,31	23	6,35	13,31	23,00	0,58	297,6	9,25	288,30	-0,238	2,460
9	15,11	25	6,32	1,80	2,00	0,90	238,3	8,15	230,12	-0,046	2,362
10	17,30	27	6,31	2,19	2,00	1,10	199,4	7,81	191,58	0,039	2,282
11	18,43	29	6,31	1,13	2,00	0,57	186,3	7,81	178,49	-0,248	2,252
12	15,54	31	6,30	- 2,89	2,00	- 1,45	-	-	-	-	-
13	18,40	48	6,30	2,86	17,00	0,17	143,0	7,49	135,47	- 0,774	2,132

Tabela C.7 - Dados utilizados no cálculo da cinética de crescimento da insulina suína em pH 6,45 a 15°C.

Ensaio D1											
Dados	L (µm)	t (h)	pH	ΔL	Δt	ΔL/Δt = G	C_t (µg/mL)	S (µg/mL)	ΔC	log(G)	log(ΔC)
14	15,88	23	6,42	15,88	23,00	0,69	446,14	12,44	433,70	-0,161	2,637
15	9,33	27	6,45	-6,55	4,00	-1,64	-	-	-	-	-
16	10,61	30	6,46	1,28	3,00	0,43	186,99	14,73	172,26	-0,370	2,236
17	11,14	48	6,44	0,53	18,00	0,03	159,26	13,53	145,73	-1,531	2,164
18	13,05	52	6,45	1,91	4,00	0,48	163,93	14,12	149,81	-0,321	2,176
19	12,78	56	6,44	-0,27	4,00	-0,07	-	-	-	-	-
20	10,67	72	6,44	-2,11	16,00	-0,13	-	-	-	-	-
21	14,61	100	6,45	3,94	28,00	0,14	111,29	14,12	97,17	-0,852	1,988

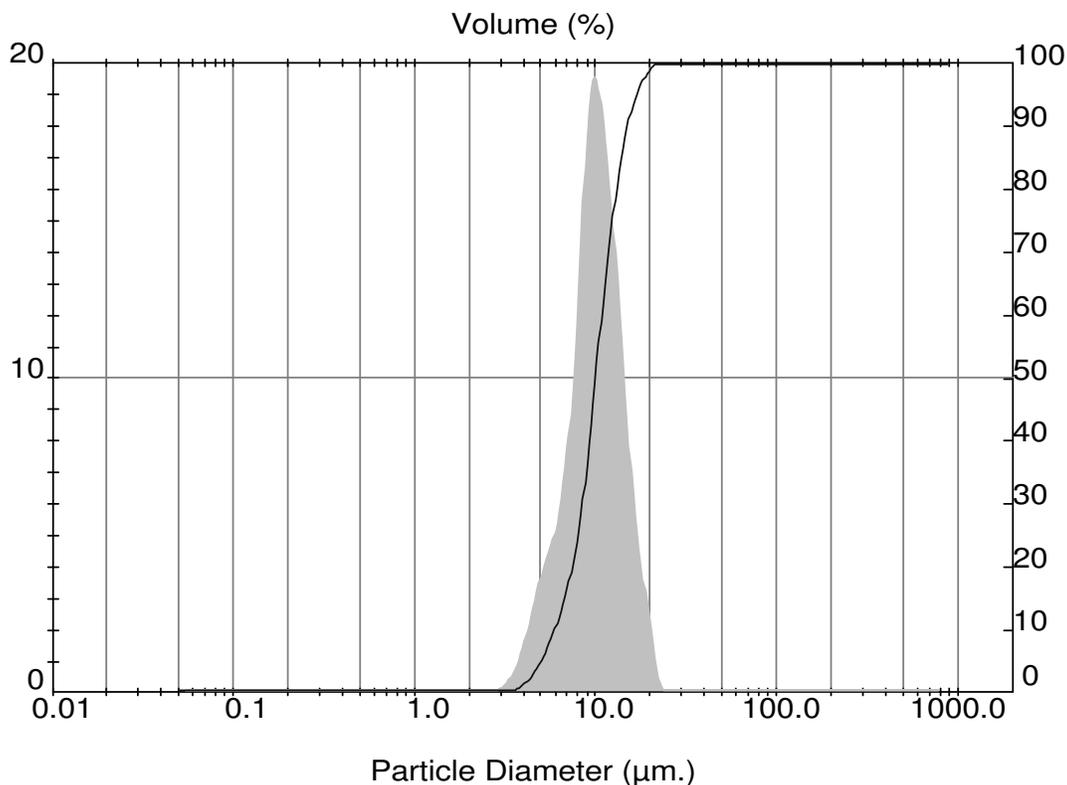
C.3. – Resultados das análises de distribuição do tamanho dos cristais (Mastersizer S, Malvern) utilizados no tratamento de dados



Result: Analysis Table

ID: 19/01 Rep.2 File: 090209 Path: C:\USUARIOS\GISELE\		Run No: 6 Rec. No: 16		Measured: 9/2/09 09:17 Analysed: 9/2/09 09:17 Source: Analysed			
Range: 300RF mm Presentation: 3OHD Modifications: None		Beam: 2.40 mm Analysis: Polydisperse		Sampler: MS14 Obs': 15.5 % Residual: 0.890 %			
Conc. = 0.0296 %Vol Distribution: Volume D(v, 0.1) = 9.36 µm Span = 1.288E+00		Density = 1.120 g/cm ³ D[4, 3] = 26.12 µm D(v, 0.5) = 25.80 µm Uniformity = 3.870E-01		S.S.A. = 0.3894 m ² /g D[3, 2] = 13.76 µm D(v, 0.9) = 42.60 µm			
Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	9.88	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	10.54	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	0.02	12.21	12.07	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	0.08	14.22	15.22	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	0.21	16.57	20.49	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	0.49	19.31	28.33	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	0.96	22.49	38.73	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	1.62	26.20	51.39	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	2.51	30.53	65.74	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	3.66	35.56	78.63	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	5.08	41.43	88.56	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	6.60	48.27	95.13	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	7.94	56.23	98.83	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	8.84	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	9.29	76.32	100.00		
0.49	0.00	6.63	9.52	88.91	100.00		
0.58	0.00	7.72	9.62	103.58	100.00		

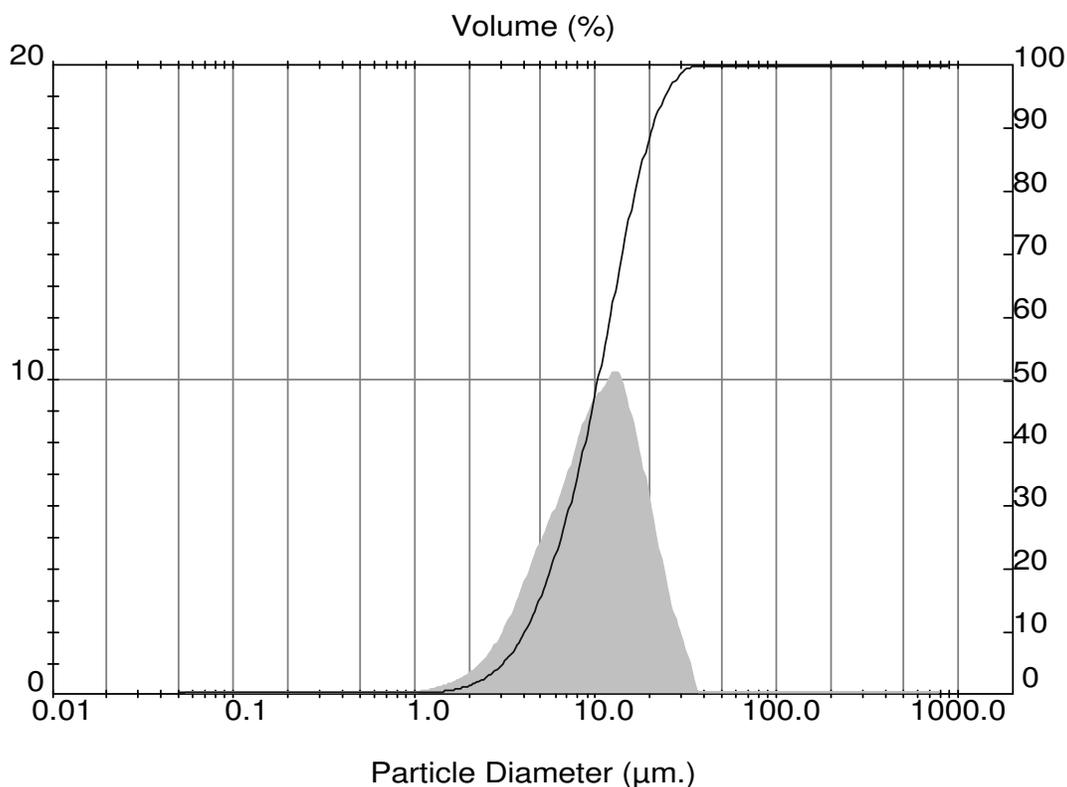
Figura C.1 – Ensaio E1: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 15°C e pH 6,30.



Result: Analysis Table

ID: 01/02 Rep.2		Run No: 1		Measured: 9/2/09 09:45			
File: 090209		Rec. No: 64		Analysed: 9/2/09 09:45			
Path: C:\USUARIOS\GISELE\				Source: Analysed			
Range: 300RF mm		Beam: 2.40 mm		Sampler: MS14			
Presentation: 3OHD		Analysis: Polydisperse		Obs': 19.1 %			
Modifications: None				Residual: 0.775 %			
Conc. = 0.0253 %Vol		Density = 1.120 g/cm ³		S.S.A= 0.5870 m ² /g			
Distribution: Volume		D[4, 3] = 10.37 µm		D[3, 2] = 9.13 µm			
D(v, 0.1) = 5.95 µm		D(v, 0.5) = 10.02 µm		D(v, 0.9) = 15.05 µm			
Span = 9.082E-01		Uniformity = 2.746E-01					
Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	36.39	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	55.83	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	0.00	12.21	73.31	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	0.00	14.22	86.53	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	0.00	16.57	94.37	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	0.00	19.31	98.41	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	0.00	22.49	100.00	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	0.00	26.20	100.00	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	0.01	30.53	100.00	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	0.03	35.56	100.00	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	0.14	41.43	100.00	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	0.55	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	1.78	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	4.45	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	8.59	76.32	100.00		
0.49	0.00	6.63	13.98	88.91	100.00		
0.58	0.00	7.72	22.13	103.58	100.00		

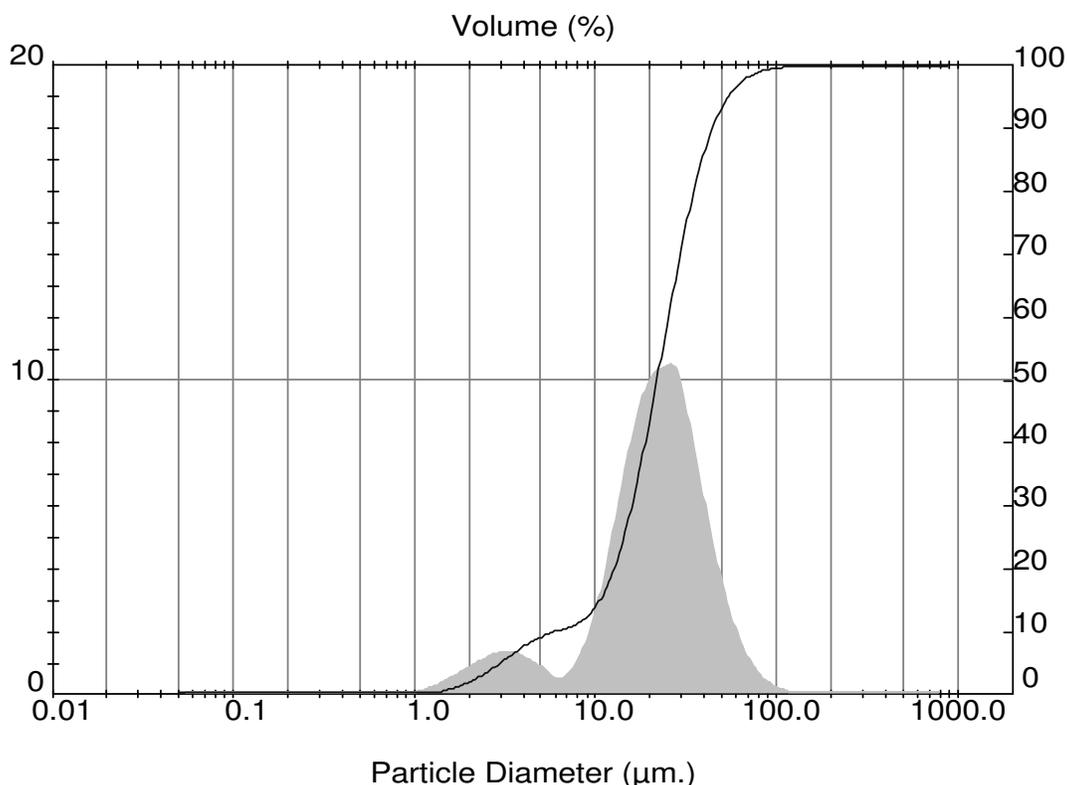
Figura C.2 – Ensaio E2: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 15°C e pH 6,50.



Result: Analysis Table

ID: 16/02 R2		Run No: 4		Measured: 17/2/09 13:36			
File: 170209		Rec. No: 14		Analysed: 17/2/09 13:36			
Path: C:\USUARIOS\GISELE\				Source: Analysed			
Range: 300RF mm		Beam: 2.40 mm		Sampler: MS14			
Presentation: 3OHD		Analysis: Polydisperse		Obs: 12.5 %			
Modifications: None				Residual: 0.977 %			
Conc. = 0.0132 %Vol		Density = 1.120 g/cm ³		S.S.A. = 0.6954 m ² /g			
Distribution: Volume		D[4, 3] = 11.49 µm		D[3, 2] = 7.70 µm			
D(v, 0.1) = 4.08 µm		D(v, 0.5) = 10.35 µm		D(v, 0.9) = 20.59 µm			
Span = 1.595E+00		Uniformity = 4.969E-01					
Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%	Size (µm)	Volume Under%
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	41.53	120.67	100.00
0.06	0.00	0.78	0.02	10.48	50.79	140.58	100.00
0.07	0.00	0.91	0.06	12.21	60.59	163.77	100.00
0.08	0.00	1.06	0.15	14.22	70.82	190.80	100.00
0.09	0.00	1.24	0.29	16.57	79.94	222.28	100.00
0.11	0.00	1.44	0.52	19.31	87.42	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	0.87	22.49	93.01	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	1.38	26.20	96.76	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	2.16	30.53	98.95	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	3.31	35.56	100.00	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	4.97	41.43	100.00	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	7.35	48.27	100.00	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	10.63	56.23	100.00	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	14.88	65.51	100.00	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	20.06	76.32	100.00		
0.49	0.00	6.63	26.09	88.91	100.00		
0.58	0.00	7.72	33.18	103.58	100.00		

Figura C.3 – Ensaio E3: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 15°C e pH 6,48.



Result: Analysis Table

ID: 23/01 Rep.1 File: 090209 Path: C:\USUARIOS\GISELE\	Run No: 10 Rec. No: 31	Measured: 9/2/09 09:23 Analysed: 9/2/09 09:23 Source: Analysed
--	---------------------------	--

Range: 300RF mm Presentation: 3OHD Modifications: None	Beam: 2.40 mm	Sampler: MS14 Analysis: Polydisperse	Obs': 13.1 % Residual: 1.020 %
--	---------------	---	-----------------------------------

Conc. = 0.0221 %Vol Distribution: Volume D(v, 0.1) = 5.88 µm Span = 1.753E+00	Density = 1.120 g/cm ³ D[4, 3] = 24.79 µm D(v, 0.5) = 21.92 µm Uniformity = 5.355E-01	S.S.A. = 0.4362 m ² /g D[3, 2] = 12.28 µm D(v, 0.9) = 44.31 µm
--	---	---

Size (µm)	Volume Under%						
0.05	0.00	0.67	0.00	9.00	12.43	120.67	99.82
0.06	0.00	0.78	0.00	10.48	14.81	140.58	99.89
0.07	0.00	0.91	0.03	12.21	18.70	163.77	99.93
0.08	0.00	1.06	0.11	14.22	24.55	190.80	99.96
0.09	0.00	1.24	0.29	16.57	32.29	222.28	99.99
0.11	0.00	1.44	0.62	19.31	41.57	258.95	100.00
0.13	0.00	1.68	1.15	22.49	51.73	301.68	100.00
0.15	0.00	1.95	1.89	26.20	62.15	351.46	100.00
0.17	0.00	2.28	2.85	30.53	72.41	409.45	100.00
0.20	0.00	2.65	4.02	35.56	81.02	477.01	100.00
0.23	0.00	3.09	5.36	41.43	87.68	555.71	100.00
0.27	0.00	3.60	6.74	48.27	92.46	647.41	100.00
0.31	0.00	4.19	8.02	56.23	95.64	754.23	100.00
0.36	0.00	4.88	9.06	65.51	97.61	878.67	100.00
0.42	0.00	5.69	9.88	76.32	98.75		
0.49	0.00	6.63	10.39	88.91	99.36		
0.58	0.00	7.72	11.10	103.58	99.67		

Figura C.4 – Ensaio E4: Distribuição de tamanho dos cristais de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L e ZnCl₂ 0,4 mmol/L sob atmosfera de CO₂ a 15°C e pH 6,30.

C.4. – Dados para estimativa da taxa da nucleação

Tabela C.8 - Dados da distribuição de tamanho dos cristais para a cristalização de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L, ZnCl₂ 0,4 mmol/L e CO₂ a 15°C e pH 6,50 (ensaio E2).

L (µm)	Volume %	f (g/gcristal)	ΔN (#/gcristal)
2,28	0,01	0,0001	2,17. 10 ⁷
2,65	0,03	0,0002	2,77. 10 ⁷
3,09	0,14	0,0011	9,61. 10 ⁷
3,60	0,55	0,0041	2,26. 10 ⁸
4,19	1,78	0,0123	4,31. 10 ⁸
4,88	4,45	0,0267	5,92. 10 ⁸
5,69	8,59	0,0414	5,79. 10 ⁸
6,63	13,98	0,0539	4,77. 10 ⁸
7,72	22,13	0,0815	4,57. 10 ⁸
9,00	36,39	0,1426	5,04. 10 ⁸
10,48	55,83	0,1944	4,35. 10 ⁸
12,21	73,31	0,1748	2,48. 10 ⁸
14,22	86,53	0,1322	1,18. 10 ⁸
16,57	94,37	0,0784	4,44. 10 ⁷
19,31	98,41	0,0404	1,45. 10 ⁷
22,49	100,00	0,0159	3,60. 10 ⁶

Tabela C.9 - Dados da distribuição de tamanho dos cristais para a cristalização de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L, ZnCl₂ 0,4 mmol/L e CO₂ a 15°C e pH 6,50 (ensaio E3).

L (μm)	Volume %	f (g/gcristal)	ΔN (#/gcristal)
0,78	0,02	0,0002	1,09. 10 ⁹
0,91	0,06	0,0004	1,37. 10 ⁹
1,06	0,15	0,0009	1,95. 10 ⁹
1,24	0,29	0,0014	1,89. 10 ⁹
1,44	0,52	0,0023	1,99. 10 ⁹
1,68	0,87	0,0035	1,90. 10 ⁹
1,95	1,38	0,0051	1,77. 10 ⁹
2,28	2,16	0,0078	1,70. 10 ⁹
2,65	3,31	0,0115	1,59. 10 ⁹
3,09	4,97	0,0166	1,45. 10 ⁹
3,60	7,35	0,0238	1,31. 10 ⁹
4,19	10,63	0,0328	1,15. 10 ⁹
4,88	14,88	0,0425	9,43. 10 ⁸
5,69	20,06	0,0518	7,25. 10 ⁸
6,63	26,09	0,0603	5,33. 10 ⁸
7,72	33,18	0,0709	3,97. 10 ⁸
9,00	41,53	0,0835	2,95. 10 ⁸
10,48	50,79	0,0926	2,07. 10 ⁸
12,21	60,59	0,0980	1,39. 10 ⁸
14,22	70,82	0,1023	9,17. 10 ⁷
16,57	79,92	0,0910	5,16. 10 ⁷
19,31	87,42	0,0750	2,68. 10 ⁷
22,49	93,01	0,0559	1,27. 10 ⁷
26,20	96,76	0,0375	5,37. 10 ⁶
30,53	98,95	0,0219	1,98. 10 ⁶
35,56	100,00	0,0105	6,02. 10 ⁵

Tabela C.10 - Dados da distribuição de tamanho dos cristais para a cristalização de insulina suína em NaHCO₃ 50 mmol/L, ZnCl₂ 0,4 mmol/L e CO₂ a 15°C e pH 6,30 (ensaio E4).

L (µm)	Volume %	f (g/gcristal)	ΔN (#/gcristal)
0,91	0,03	0,0003	1,03. 10 ⁹
1,06	0,11	0,0008	1,73. 10 ⁹
1,24	0,29	0,0018	2,43. 10 ⁹
1,44	0,62	0,0033	2,85. 10 ⁹
1,68	1,15	0,0053	2,88. 10 ⁹
1,95	1,89	0,0074	2,57. 10 ⁹
2,28	2,85	0,0096	2,09. 10 ⁹
2,65	4,02	0,0117	1,62. 10 ⁹
3,09	5,36	0,0134	1,17. 10 ⁹
3,60	6,74	0,0138	7,62. 10 ⁸
4,19	8,02	0,0128	4,48. 10 ⁸
4,88	9,06	0,0104	2,31. 10 ⁸
5,69	9,88	0,0082	1,15. 10 ⁸
6,63	10,39	0,0051	4,51. 10 ⁷
7,72	11,10	0,0071	3,98. 10 ⁷
9,00	12,43	0,0133	4,70. 10 ⁷
10,48	14,81	0,0238	5,33. 10 ⁷
12,21	18,70	0,0389	5,51. 10 ⁷
14,22	24,55	0,0585	5,24. 10 ⁷
16,57	32,29	0,0774	4,38. 10 ⁷
19,31	41,57	0,0928	3,32. 10 ⁷
22,49	51,73	0,1016	2,30. 10 ⁷
26,20	62,15	0,1042	1,49. 10 ⁷
30,53	72,41	0,1026	9,29. 10 ⁶
35,56	81,02	0,0861	4,94. 10 ⁶
41,43	87,68	0,0666	2,41. 10 ⁶
48,27	92,46	0,0478	1,10. 10 ⁶
56,23	95,64	0,0318	4,61. 10 ⁵

Tabela C.10– Continuação.

L (µm)	Volume %	f (g/gcristal)	ΔN (#/gcristal)
65,51	97,61	0,0197	1,81. 10 ⁵
76,32	98,75	0,0114	6,61. 10 ⁴
88,91	99,36	0,0061	2,24. 10 ⁴
103,58	99,67	0,0031	7,19. 10 ³
120,67	99,82	0,0015	2,20. 10 ³
140,58	99,89	0,0007	6,49. 10 ²
163,77	99,93	0,0004	2,35. 10 ²
190,80	99,96	0,0003	1,11. 10 ²
222,28	99,99	0,0003	7,04. 10 ¹
258,95	100,00	0,0001	1,48. 10 ¹