



**UNICAMP**



1150065950



IQ

T/UNICAMP L881e

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

Dissertação de Mestrado

**EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS DE PLASMA  
SANGUÍNEO BASEADA NO PROCEDIMENTO DO PONTO NUVEM**

**Aline Soriano Lopes**

**Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda**

**Campinas – SP**

**Agosto/2005**

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | IQ                                  |
| Nº CHAMADA | T/UNICAMP                           |
|            | L881e                               |
| V          | EX                                  |
| TOMBO BC/  | 65950                               |
| PROC.      | 10-P-0002-05                        |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | 11,00                               |
| DATA       | 05/10/05                            |
| Nº CPD     |                                     |

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
DA UNICAMP**

BIBID - 365966

L881e      Lopes, Aline Soriano.  
               Extração e fracionamento de proteínas de plasma  
               sanguíneo baseada no procedimento do ponto nuvem /  
               Aline Soriano Lopes. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.

Dissertação – Universidade Estadual de Campinas,  
 Instituto de Química.

1. Proteína. 2. Plasma. 3. Fracionamento. 4. Ponto  
 nuvem. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Instituto de  
 Química. III. Título.

**Título em inglês:** Extraction and fractionation of blood plasma proteins based on cloud point procedure

**Palavras-chave em inglês:** Protein, Plasma, Fractionation, Cloud point

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química Analítica

**Banca examinadora:** Marco Aurelio Zezzi Arruda, Pedro Vitoriano de Oliveira, Fabio Augusto

**Data de defesa:** 15/07/2005

*Dedico esta dissertação aos meus pais Joves e Maria, e aos meus irmãos João Paulo e Adriano pelos momentos de aconchego e carinho.*  
*Ao meu namorado Adair pelo amor e paciência.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por dar sabedoria ao homem e a oportunidade de mergulhar um pouquinho nos seus mistérios.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química pela oportunidade de realizar o projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda pela orientação e as “dores de cabeça” compartilhadas na realização do projeto.

Ao Prof. Dr. João Carlos de Andrade pelo convívio agradável.

Aos amigos do grupo GEPAM: Alessandra, Aline, Américo, Araceli, Cristiana, Eduardo, Geraldo, Luciana, Marcelo e Nathália pelo convívio agradável, e, em especial a Jerusa pelas conversas e discussões sobre química de proteínas e ao Marcel pelo auxílio na configuração das figuras.

Aos colegas e amigos do laboratório B 200-204, em especial ao André, Audrey, Gyda, Janaína, Joselito e Terezinha pela amizade.

As amigos, Cris, Gisele, Mari e Cado, Regiane, Rubia e Silvana pela amizade e carinho.

Aos amigos do Grupo de Partilha e Perseverança (GPP) de Campinas pelos conselhos e orações.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial aos funcionários da Coordenadoria de Pós-Graduação, a Regina e a Miriam do laboratório de ensino e ao Fontana (hialotecnica) pela ajuda.

Enfim, a todas as pessoas que eu inconscientemente, esqueci de mencionar e que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

## Dados pessoais

## Formação acadêmica

## Produção Científica

## Iniciação científica

Título: Química?! Você decide, nós auxiliamos. Responsável: Prof. Msc. Luiz Satoru Aida. Universidade Estadual de Maringá, processo nº 1673/99, 01/09/1999 a 24/02/2003, 440 horas, sem financiamento.

## Resumos dos trabalhos apresentados em eventos

LOPES, A. S.; MONTEIRO, L. S.; CLEMENTE, E. Atividade de enzimas oxidativas e teor de minerais em brócolos. XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 04 a 07 de agosto de 2002. Porto alegre/RS. Anais divulgados em CD-ROM.

AIDA, L. S.; LOPES, A. S.; FIGUEIREDO, A. Obtenção de tensoativos e sua aplicação na elucidação de teorias químicas. 21º Encontro de Debates sobre o Ensino de Química, 18 a 20 de outubro de 2001, Santa Maria/RS. Livro de resumos, página 104.

LOPES, A. S.; ROSADO, F. R.; GOMES-DA-COSTA, S. M.; CLEMENTE, E. Composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murrill). VII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimento, 03 a 05 de outubro de 2001, Curitiba/PR. Livro de resumos, ref. AQB5-11.

BRAIDOTTI, F. S.; DAMETTO, J.; LOPES, A. S.; MOURA, M. R.; NAZARI, A. S.; ROMÃO, V. S.; SANTOS, L. V.; AIDA, L. S. Princípios químicos envolvidos na formulação de agentes tensoativos e sua aplicabilidade na elucidação de teorias químicas, por meio de experimentos didático-pedagógicos. IV Fórum de Políticas de Ensino da UEM, novembro de 2000, Maringá/PR. Livro de resumos, página 108.

## **Publicação**

### **Artigo publicado e submetido**

LOPES, A. S.; CLEMENTE, E. Minerais e enzimas oxidativas em brócolos (*Brassica oleracea* L. Cv. Italica) minimamente processado. *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 6, p. 1615-1618, 2002.

COELHO, L. M.; LOPES, A. S.; ARRUDA, M. A. Z. Detergentes: uma abordagem prática em química analítica. *Química Nova na Escola*. Código QNEsc 20/05.

LOPES, A. S.; ARRUDA, M. A. Z. Fractionation of human plasma proteins using the cloud point method. *Journal of Chromatography B*.

### **Patente**

LOPES, A. S.; ARRUDA, M. A. Z. Processo de semipurificação e extração de proteínas de plasma sanguíneo humano e animal e kit para marcador de peso molecular protéico, baseado em sistema de duas fases empregando surfactante. UNICAMP. PI 0501967-2.

### **Experiência didática e técnica**

1. Monitoria em Química II (QA-213-Engenharia de Alimentos). Atividade supervisionada de apoio à docência. UNICAMP. 19/08/2004 a 08/01/2005.
2. Monitoria em Química Analítica Qualitativa. UEM. 02/09/2002 a 19/05/2003.
3. Monitoria junto ao projeto “Emprego do ponto nuvem na pré-concentração de metais e na extração de proteínas em amostras biológicas”. Terceira edição do programa *Ciência & Arte nas Férias*. UNICAMP. 05/01 a 04/02/2005.
4. Supervisionamento de prática no V Workshop sobre preparo de amostras. Instituto de Química da USP e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo/SP. 18 a 22/10/2004.
5. Estágio em laboratório de controle de qualidade. Steviafarma Industrial S/A. Maringá/PR. 07/01 a 20/02/2002.

### **Participação em eventos**

- Visita à UEM divulgar para integrar, integrar para conhecer. UEM, 31/06 a 02/08/2002.
- XVII Semana de Química. UEM - Departamento de Química, 18 a 22/06/2001.
- XVI Semana de Química. UEM - Departamento de Química, 27/11 a 01/12/2000.
- XV Semana de Química. UEM - Departamento de Química, 14 a 18/06/1999.

## **RESUMO**

### **EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS DE PLASMA SANGUÍNEO BASEADA NO PROCEDIMENTO DO PONTO NUVEM**

Autora: Aline Soriano Lopes

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Esta dissertação visa fracionar proteínas do plasma sanguíneo humano empregando a separação de fases por meio da formação de micelas utilizando o Triton X-114 como surfactante e NaCl como eletrólito. São avaliadas as principais variáveis responsáveis pela separação de fases: concentração do Triton X-114 (2 - 15% m/v), volume de amostra (50 - 2000  $\mu$ L), concentração de NaCl (6 - 12% m/v), tempo de contato entre as proteínas e os agregados micelares (0 - 30 min) e pH (6,4 - 7,4). As proteínas totais presentes nas fases rica e pobre em surfactante são quantificadas pelo método de Bradford. Anteriormente a quantificação, é realizada a remoção do surfactante da fase rica utilizando acetona resfriada. Neste procedimento, as proteínas precipitam e o surfactante é extraído para a fase orgânica. A separação de fases é realizada a temperatura ambiente (25 °C) e as variáveis otimizadas foram: 5% (m/v) de Triton X-114, 100  $\mu$ L de amostra, 10% (m/v) de NaCl, tempo de contato quase instantâneo e pH 6,8. A caracterização das proteínas é realizada por meio da eletroforese 1D. O software Gel-Pro Analyzer 3.1 é utilizado para analisar as bandas e o banco de dados de proteínas ExPASy é utilizado para identificar as possíveis frações protéicas. Duas bandas com concentrações mensuráveis são observadas por SDS-PAGE na fase rica em surfactante. Uma delas pode ser atribuída à albumina, proteína de alta concentração no plasma sanguíneo, e a outra banda a uma apolipoproteína D ou a uma cadeia leve de imunoglobulina. Um padrão de albumina do soro bovino é utilizado como referência para apontar

possíveis mudanças na estrutura secundária por dicroísmo circular. Por meio do resultado observam-se mudanças na conformação da albumina quando esta é submetida à separação de fases com Triton X-114.



## **ABSTRACT**

### **EXTRACTION AND FRACTIONATION OF BLOOD PLASMA PROTEINS BASED ON CLOUD POINT PROCEDURE**

Author: Aline Soriano Lopes

Adviser: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

The goal of the present work is to fractionate the human blood plasma proteins using micelle-mediated phase separation with Triton X-114 as surfactant and NaCl as electrolyte. Some parameters that affect the phase separation are evaluated, such as Triton X-114 concentration (2 - 15% w/v), sample volume (50 - 2000  $\mu$ L), NaCl concentration (6 - 12% w/v), contact time between proteins and micelles aggregation (0 - 30 min) and pH (6.4 - 7.4). The total proteins are quantified in both surfactant-rich and -poor phases by using the Bradford method. The surfactant present in the rich phase is removed with ice-cold acetone before the protein determination, in which the proteins are precipitated and the surfactant is removed to the organic phase. The separation is carried out at room temperature (25 °C) and the optimized parameters were 5% (w/v) Triton X-114, 100  $\mu$ L of sample volume, 10% (w/v) NaCl, contact time almost instantaneous and pH as 6.8. Protein characterization is made through 1D electrophoresis. The software Gel-Pro Analyzer 3.1 is used for analyzing the bands as well as the protein data bank Expasy is used for identifies the possible protein fractions. Two bands are observed in the surfactant-rich phase with measurable concentrations. One of them may be attributed to albumin, which is present at highest concentration in blood plasma, and the other one may be attributed to apolipoprotein D or immunoglobulin light chain. Bovine serum albumin standard is used as reference for emphasizing possible changes on the secondary structure of proteins by circular dichroism.

Changes were observed in the albumin conformation when the protein is submitted to phase separation with Triton X-114.

## SUMÁRIO

|                                                            |            |
|------------------------------------------------------------|------------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS .....</b>             | <b>xiv</b> |
| <b>LISTA DE QUADROS .....</b>                              | <b>xvi</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                               | <b>xvi</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                              | <b>xvi</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                  | <b>1</b>   |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                   | <b>2</b>   |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                      | <b>2</b>   |
| 3.1. Surfactantes .....                                    | 2          |
| 3.1.1. O fenômeno da separação de fases .....              | 4          |
| 3.1.2. Aplicação analítica.....                            | 6          |
| 3.1.3. Aplicação a biomoléculas .....                      | 8          |
| 3.1.4. Vantagens e limitações da extração ponto nuvem..... | 11         |
| 3.2. Proteínas .....                                       | 12         |
| 3.2.1. Aspecto geral .....                                 | 12         |
| 3.2.2. Plasma: proteínas plasmáticas .....                 | 13         |
| 3.2.3. Métodos de determinação de proteínas totais.....    | 14         |
| 3.2.4. Dicroísmo circular .....                            | 16         |
| 3.3. Eletroforese .....                                    | 17         |
| 3.3.1. Aspectos gerais .....                               | 17         |
| 3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida .....         | 20         |
| <b>4. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>                         | <b>22</b>  |
| 4.1. Equipamentos e acessórios.....                        | 22         |
| 4.2. Reagentes.....                                        | 22         |
| 4.3. Limpeza de materiais .....                            | 23         |
| 4.4. Amostras.....                                         | 23         |
| 4.5. Metodologia .....                                     | 24         |

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5.1. Determinação da temperatura do ponto nuvem .....                                     | 24        |
| 4.5.2. Separação das fases.....                                                             | 24        |
| 4.5.3. Remoção do surfactante.....                                                          | 25        |
| 4.5.4. Razão de distribuição.....                                                           | 26        |
| 4.5.5. Determinação de proteínas totais: Método de Bradford.....                            | 27        |
| 4.5.6. Preparo das amostras para a obtenção do gel .....                                    | 27        |
| 4.5.7. Caracterização das proteínas por eletroforese descontínua com SDS<br>(SDS-PAGE)..... | 28        |
| 4.5.8. Eletroforese descontínua nativa em gel de poliacrilamida.....                        | 30        |
| 4.5.9. Tratamento da imagem .....                                                           | 30        |
| 4.5.10. Dicroísmo circular .....                                                            | 31        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                       | <b>32</b> |
| 5.1. Temperatura do ponto nuvem .....                                                       | 32        |
| 5.2. Remoção do surfactante.....                                                            | 34        |
| 5.3. Otimização da separação de fases.....                                                  | 36        |
| 5.3.1. Concentração do surfactante.....                                                     | 36        |
| 5.3.2. Volume de amostra .....                                                              | 39        |
| 5.3.3. Concentração do eletrólito (NaCl).....                                               | 40        |
| 5.3.4. Tempo de contato.....                                                                | 41        |
| 5.3.5. pH de extração .....                                                                 | 43        |
| 5.4. Eletroforese nativa descontínua em gel de poliacrilamida .....                         | 44        |
| 5.5. Caracterização das proteínas por SDS-PAGE .....                                        | 46        |
| 5.6. Dicroísmo circular.....                                                                | 49        |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>                                                                  | <b>53</b> |
| <b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>                                                        | <b>54</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                   | <b>55</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

Aerosol OT, bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio

Aliquat-336, cloreto de tricaprililmetilamônio

ASB, albumina do soro bovino

ATP, adenosina trifosfato

Br-PADAP, 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol

Brij 35, polioxietileno(23) dodecanol

CBB, do inglês Coomassie Brilliant Blue

c.m.c., concentração micelar crítica

C<sub>n</sub>TAB, brometo de alquiltrimetilamônio

C<sub>9</sub>-APSO<sub>4</sub>, sulfato de 3-(nonil dimetilamônio) propil

C<sub>10</sub>E<sub>4</sub>, *n*-decil tetra(etileno óxido)

C<sub>10</sub>E<sub>6</sub>, hexaetenoglicol mono *n*-tetradecil éter

DAB, 4-(dodecildimetil amônio) butirato de sódio

DC, dicroísmo circular

2D PAGE, do inglês two-dimensional gel electrophoresis

DDTP, O,O-dietilditiofosfato

DISC-PAGE, do inglês discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis

DTT, ditioneitol

Genapol X-080, oligoetileno glicol monoalquil éter

G6PD, glucose-6-fosfato desidrogenase

HDTB, brometo de hexadeciltrimetil amônio

$\lambda$ , comprimento de onda

MM, massa molar

PAHs, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

PCDDs, dibenzeno-*p*-dioxinas policlorados

P.E., ponto de ebulição

PEG, polietilenoglicol

PGE, do inglês pore gradient electrophoresis

p.I., ponto isoelétrico

R<sub>D</sub>, razão de distribuição

SB-12, 3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato de sódio

SDS, do inglês sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE, do inglês sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TEMED, *N,N',N,N'* tetrametiletilenodiamina

Tris, tri-(hidroximetil) aminometano

Triton X-114, polioxietileno(8) isooctilfenil éter

Triton X-100, polioxietileno(10) isooctilfenil éter

Triton X-405, polioxietileno(40) isooctilfenil éter

## LISTA DE QUADROS

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1. Classificação dos surfactantes.....               | 3  |
| Quadro 2. Composição do gel concentrador e fracionador..... | 29 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Volume das fases rica e pobre obtido em diferentes concentrações de Triton X-114 (N = 1), utilizando no sistema de separação de fases 2000 µL de amostra, 10% (m/v) de NaCl, 20 min de tempo de contato e pH 7,2. ....                  | 37 |
| Tabela 2. Volume das fases rica e pobre em surfactante (N = 3) para as diferentes concentrações do eletrólito, utilizando no sistema de separação de fases 5% (m/v) de Triton X-114, 100 µL de amostra, 20 min de tempo de contato e pH 7,2. .... | 41 |
| Tabela 3. Estimativa das massas molares (kDa) relativa à Figura 14. Coluna 1 = material de partida; coluna 2 = padrão protéico; coluna 3 = fase rica em surfactante; coluna 4 = fase pobre em surfactante. ....                                   | 47 |
| Tabela 4. Identificação das possíveis proteínas da amostra de partida (coluna 1) e da fase pobre em surfactante (coluna 2) após o ponto nuvem. MM = massa molar....                                                                               | 49 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representação esquemática da formação de um agregado micelar.....                                                                                                                                                                                                              | 4  |
| Figura 2. Esquema ilustrativo após a separação de fases utilizando surfactante e uma mistura protéica. ....                                                                                                                                                                              | 9  |
| Figura 3. Estrutura do azul brilhante de coomassie G-250. ....                                                                                                                                                                                                                           | 15 |
| Figura 4. Efeito da adição de NaCl na temperatura de formação do ponto nuvem em diferentes concentrações de Triton X-114 ( $T \pm 1$ °C). ....                                                                                                                                           | 33 |
| Figura 5. Corrida eletroforética para diferentes proporções de amostra (fase rica em surfactante) e acetona, onde p.p. são proteínas de massas molares conhecidas (padrão protéico) e 1:5, 1:4, 1:3, 1:2 e 1:1 são as proporções entre o volume da fase rica e o volume de acetona. .... | 35 |
| Figura 6. Estrutura do polioxietileno(8) isooctilfenil éter (Triton X-114).....                                                                                                                                                                                                          | 36 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 7. Razão de distribuição em função da concentração de Triton X-114 (N = 3), utilizando 2000 µL de amostra, 10% (m/v) de NaCl, 20 min de tempo de contato e pH 7,2.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 37 |
| Figura 8. Sequência de fotos obtidas durante a separação de fases. (a) 10 min, (b) 20 min, (c) 30 min, (d) após a centrifugação a 1780 g durante 10 min. A fase superior do tubo (em amarelo) é a fase rica em surfactante. A fase inferior é a fase pobre em surfactante.....                                                                                                                                                 | 39 |
| Figura 9. Razão de distribuição em função do volume de amostra (N = 3), utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 10% (m/v) de NaCl, 20 min de tempo de contato e pH 7,2.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 40 |
| Figura 10. Razão de distribuição em função da concentração de NaCl (N = 3), utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 100 µL de amostra, 20 min de tempo de contato e pH 7,2.....                                                                                                                                                                                                                                                   | 41 |
| Figura 11. Razão de distribuição em função do tempo de contato (N = 3), utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 100 µL de amostra, 10% (m/v) de NaCl e pH 7,2. ....                                                                                                                                                                                                                                                               | 42 |
| Figura 12. Razão de distribuição em função do pH (N = 3), utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 100 µL de amostra, 10% (m/v) de NaCl e tempo de contato instantâneo.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 44 |
| Figura 13. Eletroforese nativa descontínua em gel de poliacrilamida para as proteínas com pI na faixa de pH < 7. (a) fases pobre (FP) e rica (FR) em surfactante após a separação de fases (b) material de partida (MP).....                                                                                                                                                                                                   | 45 |
| Figura 14. Corrida eletroforética SDS-PAGE nas condições de extração otimizadas. MM = massa molar (kDa); MP = material de partida; pp = padrão protéico de massa molar conhecida (de cima para baixo: 116; 66,2; 45,0; 35,0 e 25,0 kDa); FR = fase rica em surfactante; FP = fase pobre em surfactante. As descrições R1, R2, R3, etc., correspondem as bandas as quais as massas molares foram estimadas (vide Tabela 3)..... | 46 |
| Figura 15. Espectros originais de dicroísmo circular. (a) ASB padrão $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L (b) ASB $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L (em preto) e ASB $0,34 \times 10^{-6}$ mol/L extraída para a fase rica em surfactante (em vermelho). ....                                                                                                                                                                                   | 50 |
| Figura 16. Espectros originais de dicroísmo circular para diferentes concentrações de Triton X-114 dissolvido em solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 mol/L / NaOH 0,1                                                                                                                                                                                                                                                  |    |



mol/L pH 6,8. (a)  $1 \times 10^{-6}$  mol/L; (b)  $1 \times 10^{-5}$  mol/L; (c)  $1 \times 10^{-4}$  mol/L; (d)  $1 \times 10^{-3}$  mol/L; (e)  $2 \times 10^{-3}$  mol/L.....51

Figura 17. Espectros de dicroísmo circular em elipticidade molar entre 200-250 nm para uma solução de ASB padrão (em preto) e para a ASB extraída para a fase rica em surfactante (em vermelho).....52

## 1. INTRODUÇÃO

A preparação, a purificação e o isolamento de uma proteína de interesse consistem de etapas laboriosas. O tempo e as etapas envolvidas no processo de purificação dependem da proteína de interesse, do material de partida e da finalidade do processo<sup>1</sup>.

Os métodos mais rotineiramente usados na purificação são os cromatográficos, os quais podem incluir cromatografia líquida de alta eficiência, de filtração em gel, de troca-iônica, de afinidade e de fase reversa. Esses métodos substituíram os métodos de precipitação e fracionamento utilizando soluções saturadas de sais inorgânicos (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou solventes miscíveis em água (metanol, etanol, butanol e acetona) no decorrer dos anos. À medida que novas técnicas para a separação e a purificação foram sendo desenvolvidas, o custo dos processos foi tornando-se maior<sup>2</sup>. Dois grandes desafios atualmente são baratear, o tanto quanto possível esses processos, e diminuir o tempo e as etapas analíticas visando obter proteínas purificadas de forma mais rápida.

Um processo muito estudado nos últimos anos é a extração visando à separação de fases utilizando surfactantes. A extração se baseia na propriedade da maioria das soluções aquosas micelares dos surfactantes não-iônicos tornarem-se turvas quando aquecidas a uma temperatura conhecida como ponto nuvem. Embora a extração ponto nuvem apresente condições brandas para as bioseparações, a temperatura envolvida no processo pode desnaturar as proteínas. A fim de diminuir a temperatura do ponto nuvem, o uso de aditivos como sais inorgânicos vem sendo rotineiramente utilizado nos processos.

Entre as vantagens da extração ponto nuvem aplicável a várias espécies, como será detalhado posteriormente neste trabalho, são citados a alta versatilidade, rapidez, simplicidade e baixo custo. Além dessas vantagens, o processo envolvendo

biomoléculas é capaz de obter proteínas de forma semipurificada e/ou fracionada em larga escala. Assim, o processo pode oferecer uma alternativa a uma das etapas incluídas no processo de purificação convencional de uma proteína, além de outros interesses, como, por exemplo, a pré-concentração.

A amostra estudada nesta dissertação é o plasma sanguíneo humano. Há um crescente interesse na produção em larga escala de drogas de proteínas terapêuticas por meio do fracionamento de plasma humano ou animal<sup>3</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

- Desenvolver uma metodologia rápida, simples e de baixo custo para a extração e o fracionamento de proteínas de plasma sanguíneo baseada na separação de fases utilizando o surfactante não-iônico Triton X-114;
- Induzir o sistema de separação de fases a temperatura ambiente pelo efeito do eletrólito NaCl;
- Caracterizar as proteínas presentes nas duas fases, após a otimização, por meio de processos eletroforéticos.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### ***3.1. Surfactantes***

A palavra surfactante é baseada na contração da frase em inglês que descreve “*surface active agents*”. Entre as características dos agentes ativos de superfície (surfactante ou tensoativo) podem-se citar: diminuição das tensões interfacial e de superfície em soluções muito diluídas, formação de micela acima de uma certa

concentração devido à diminuição da energia livre do sistema, e solubilização de substâncias insolúveis em água<sup>4</sup>.

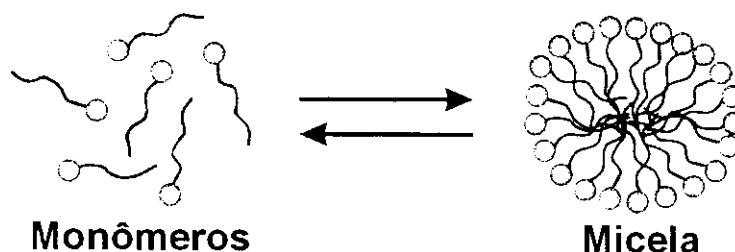
A estrutura empírica do surfactante pode ser representada como R-X, onde R é a cadeia hidrocarbônica (hidrofóbica) composta por 8 – 18 átomos e X é o grupo polar (hidrofílico)<sup>5</sup>. Os surfactantes são geralmente classificados de acordo com a cabeça polar, nas categorias descritas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Classificação dos surfactantes.

| <b>Tipo de surfactante</b> | <b>Carga</b>        | <b>Exemplos</b>                                                                                                       | <b>Estruturas</b>                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Não-iônico                 | Sem carga           | - Polioxietileno(10) isooctilfenil éter (Triton X-100)<br>- Polioxietileno(23) dodecanol (Brij 35)                    | - $(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$<br>- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$ |
| Aniônico                   | Negativa            | - Dodecil sulfato de sódio (SDS)<br>- Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (Aerosol OT)                           | - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$<br>- $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{OCO}]_2\text{CHSO}_3^-\text{Na}^+$                          |
| Catiônico                  | Positiva            | - Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)<br>- Brometo de hexadeciltrimetil amônio (HDTB)                              | - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$<br>- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$                                                         |
| Anfótero                   | Positiva e negativa | - 4-(dodecildimetil amônio) butirato de sódio (DAB)<br>- 3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato de sódio (SB-12) | - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-\text{Na}^+$<br>- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$ |

Essa característica antagônica (hidrofílica e hidrofóbica) associada a uma mesma molécula conduz a um fenômeno de agregação espontâneo, a partir de uma determinada concentração do surfactante, conhecida como concentração micelar crítica (c.m.c.). A c.m.c. depende da estrutura do surfactante (quanto mais longa é a cadeia hidrocarbônica, menor será a c.m.c.) e das condições experimentais (força iônica, contra-íon, temperatura)<sup>4,5</sup>.

Acima da c.m.c. os monômeros do surfactante se organizam em estruturas conhecidas como micelas. O fenômeno pode ser observado por meio da Figura 1.



**Figura 1.** Representação esquemática da formação de um agregado micelar.

A figura acima mostra a formação de um agregado conhecido como micela normal que se auto-organiza em soluções aquosas (ou polares). Dependendo da estrutura dos monômeros do surfactante e da natureza do meio onde ele se encontra, podem ser formados diferentes agregados, tais como: micela reversa (formadas em solventes apolares), micro-emulsões, monocamadas, bicamadas e vesículas<sup>5</sup>.

Além dessa característica de formar ambientes altamente organizados, as micelas podem se agregar conduzindo a uma separação de fases em determinadas condições, como temperatura e força iônica.

### ***3.1.1. O fenômeno da separação de fases***

Soluções micelares tornam-se turvas quando aquecidas a uma temperatura específica conhecida como temperatura do ponto nuvem ou ponto de névoa. Acima desta temperatura, a solução micelar separa-se em duas fases isotrópicas: uma rica em surfactante e de pequeno volume, e uma aquosa ou fase pobre em surfactante, na qual a concentração do tensoativo é próxima à concentração micelar crítica. Este

fenômeno é reversível e quando a temperatura torna-se inferior a temperatura do ponto nuvem, uma única fase é obtida novamente.

O fenômeno da separação de fases é mais freqüentemente observado com surfactantes do tipo não-iônico, embora ele também possa ocorrer com surfactantes anfóteros e, em casos especiais com surfactantes iônicos.

Entre os surfactantes não-iônicos, os polioxietilenos representam um amplo grupo, onde a estrutura é normalmente abreviada como  $C_nE_m$ , em que  $C_n$  representa o comprimento do grupo alquil e  $E_m$  o número de unidades de oxietileno. Esses surfactantes são solubilizados em água por hidratação do oxigênio dos polioxietilenos<sup>1</sup>. A temperatura de formação da separação de fases (ponto nuvem) depende do comprimento das unidades de oxietileno (cadeia hidrofílica) e dos grupos alquil (cadeia hidrofóbica). Entre os surfactantes desta série podemos citar o Triton X-100, Triton X-114 e Triton X-405.

Existem muitas discussões sobre os fenômenos químicos e físicos envolvidos na separação de fases. Na série dos polioxietilenos, por exemplo, Corti *et al.*<sup>6</sup> observaram que para cadeias pequenas o comportamento observado é devido a flutuações na concentração crítica e que a transição de fases é devido a interações entre micelas globulares pequenas; para cadeias maiores pode haver um crescimento micelar com o aumento da temperatura. Além disso, observa-se que o fenômeno da separação de fases é baseado na solubilidade dos surfactantes em água, a qual é inversamente proporcional a temperatura, isto é, quanto maior é a temperatura, menos solúvel torna-se o surfactante<sup>7</sup>. Uma vez que os surfactantes iônicos apresentam elevada solubilidade em água, a temperatura do ponto nuvem é maior.

Alguns aditivos podem alterar a temperatura de formação da separação de fases dos surfactantes, tais como sais inorgânicos, ácidos e glicerol. Eles neutralizam a carga superficial da micela facilitando a aproximação e, assim,

diminui a temperatura do ponto nuvem. Misturas compostas por dois surfactantes geralmente separam fases a uma temperatura intermediária aos surfactantes em estudo<sup>8</sup>. Quando um surfactante iônico, por exemplo, é adicionado a uma solução de um surfactante não-iônico, a temperatura de formação da separação de fases aumenta devido ao fato do surfactante iônico inserir carga na estrutura da micela e, assim, dificultar a aproximação entre as mesmas.

Essa propriedade de separação de fases permitiu várias aplicações dos surfactantes na química analítica por meio da técnica conhecida como extração ponto nuvem.

### ***3.1.2. Aplicação analítica***

A utilização de surfactantes na química analítica vem crescendo nos últimos anos sob diversos pontos de vista<sup>9,10</sup>. Sistemas micelares aquosos usando surfactante têm sido empregados com sucesso em vários ramos, envolvendo aplicações em espectroscopia, biotecnologia e eletroanalítica<sup>8</sup>.

A técnica baseada na separação de fases com surfactantes (extração ponto nuvem) é um dos métodos mais simples e versáteis para a extração e a pré-concentração de vários analitos. Algumas espécies podem interagir com o sistema micelar diretamente (geralmente espécies hidrofóbicas como compostos orgânicos) ou após uma prévia reação de derivatização (como a complexação de íons metálicos com um ligante hidrofóbico).

Watanabe e Tanaka<sup>11</sup> foram os primeiros a desenvolver a extração baseada no ponto nuvem para concentrar íons metálicos quelatos insolúveis em água. Os complexos metálicos foram efetivamente solubilizados na solução micelar aquosa dentro do pequeno volume da fase rica em surfactante. Desde então, extrações baseadas no ponto nuvem vêm sendo freqüentemente utilizadas para aumentar a

sensibilidade de métodos analíticos convencionais na determinação de íons metálicos.

Bezerra *et al.*<sup>12</sup> empregaram a extração ponto nuvem utilizando Triton X-114 na pré-concentração de níquel após derivatização com 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (Br-PADAP) em resíduo aquoso. O fator de pré-concentração obtido foi de 74, com faixas de recuperação entre 95 e 104%.

Borges *et al.*<sup>13</sup> extraíram Cd, Pb e Pd de amostras de sangue digeridas empregando o surfactante Triton X-114 e *O,O*-dietilditiofosfato (DDTP) como agente complexante. Os fatores de enriquecimento foram de 71, 34 e 100, para Cd, Pb e Pd respectivamente, e as faixas de recuperação estavam entre 101 e 105%.

Empregando um sistema micelar misto constituído por Triton X-100 e SDS, Nascentes e Arruda<sup>14</sup> pré-concentraram cobalto anteriormente complexado com Br-PADAP. Boas recuperações foram obtidas (98 – 102%) utilizando NaCl na indução da formação da separação de fases. Segundo os autores, o método pode ser aplicado com sucesso na determinação de cobalto em amostras farmacêuticas.

Surimanne *et al.*<sup>15</sup> empregaram a extração ponto nuvem para pré-concentrar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e dibenzeno-*p*-dioxinas policlorados (PCDDs) de soro humano utilizando Triton X-100. Os métodos para quantificar estes compostos a níveis baixíssimos geralmente envolvem extração com solvente e preparo de amostra exaustivo. A extração líquido-líquido baseada na separação de fases utilizando surfactante oferece muitas vantagens em relação à extração líquido-líquido convencional (solvente orgânico), entre as quais podem-se citar o custo relativamente baixo e a baixa quantidade de amostra utilizada nos processos. Além disso, os tensoativos empregados não são tóxicos, voláteis ou inflamáveis e são de menores periculosidades quando comparados aos solventes orgânicos<sup>16</sup>.



Há um grande número de trabalhos na literatura envolvendo a extração e a pré-concentração de íons metálicos quelatos<sup>17,18</sup> e compostos orgânicos<sup>19,20</sup>. Todavia, um dos grandes interesses da química analítica atual envolve a extração, a pré-concentração ou, ainda, a purificação de biomoléculas, como proteínas, toxinas e vitaminas.

### ***3.1.3. Aplicação a biomoléculas***

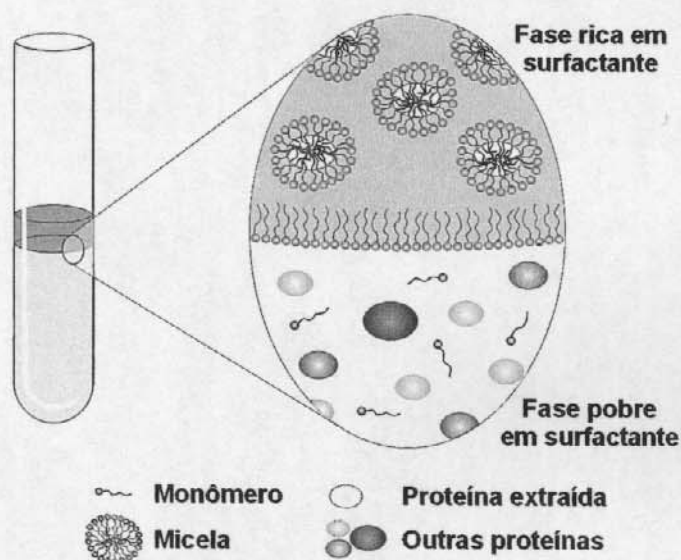
Nas últimas décadas a biotecnologia tem recebido muita atenção devido aos rápidos avanços ocorridos na engenharia genética. Esses avanços são importantes para a produção de novas proteínas. No entanto, embora a tecnologia para a clonagem de genes para essas proteínas desenvolveu-se rapidamente, a tecnologia para a purificação do produto do gene expressado está avançando vagarosamente<sup>21</sup>. Devido a esse fato, há um grande interesse, atualmente, no desenvolvimento e aprimoramento de novas tecnologias para a purificação e/ou a pré-concentração de proteínas, a fim de melhorar o desempenho analítico em muitos processos industriais.

Os sistemas de duas fases mais comumente explorados na extração de proteínas são baseados em sistemas compostos por polímeros<sup>22</sup> e surfactantes. Os sistemas compostos por surfactantes parecem ser mais simples, uma vez que apenas um sistema binário (surfactante / água) é necessário para gerar duas fases, enquanto que para polímeros são necessários sistemas ternários (polímero1 / polímero2 / água ou polímero / sal / água) mais complexos<sup>23</sup>.

O primeiro trabalho envolvendo a aplicação do fenômeno do ponto nuvem com surfactantes na separação de proteínas foi realizado por Bordier<sup>24</sup>. Segundo o autor, proteínas de membrana (entre elas a acetilcolinesterase e a bacteriorrodopsina), proteínas consideradas hidrofóbicas, foram extraídas na fase

rica no surfactante Triton X-114, enquanto proteínas consideradas hidrofílicas (soroalbumina, catalase, ovalbumina, concanavalina A, mioglobulina e citocromo c) permaneceram na fase aquosa. Desde então, há um interesse crescente na separação de biomoléculas empregando sistemas aquosos de duas fases a base de surfactante devido à simplicidade e rapidez do processo. A Figura 2 mostra um esquema ilustrativo da extração de proteínas utilizando surfactante.

Tiruppathi *et al.*<sup>25</sup>, cinco anos após o trabalho de Bordier, utilizaram o mesmo surfactante (Triton X-114) para extrair polipeptídios de membrana intestinal de rato. Quatro enzimas (alcalina fosfatase, leucina aminopeptidase,  $\gamma$ -glutamil transpeptidase e  $\text{Ca}^{2+}$  -  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase) foram extraídas exclusivamente para a fase rica em surfactante, enquanto as dissacaridases (glucoamilase, sucrase-isomaltase, trehalase e lactase) e o receptor do complexo fator-cobalamina foram encontradas na fase aquosa.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo após a separação de fases utilizando surfactante e uma mistura protéica.

O detergente não-iônico  $C_{10}E_6$  (hexaetilenoglicol mono *n*-tetradecil éter) foi empregado para extrair e isolar lipases extracelulares<sup>26</sup>. Aproximadamente 76% de lipase foram extraídas na fase rica em surfactante em apenas uma única etapa.

Rukhadze *et al.*<sup>27</sup> empregaram o fenômeno do ponto nuvem utilizando Triton X-114 para determinar frações livres das drogas fenobarbital e carbamazepina (as quais permanecem na fase aquosa) em plasma sanguíneo e saliva, enquanto as drogas ligadas a proteínas são extraídas para a fase rica em surfactante.

Rangel-Yagui *et al.*<sup>28</sup> investigaram sistemas micelares mistos, constituído pelos surfactantes não-iônico  $C_{10}E_4$  (*n*-decil tetra(etileno óxido)) e catiônico  $C_nTAB$  (brometo de alquiltrimetilamônio,  $n = 8, 10$ , ou  $12$ ), para purificar a enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Os autores investigaram o efeito do comprimento da cadeia do surfactante catiônico sobre a desnaturação e sobre o coeficiente de partição da enzima. No sistema  $C_{10}E_4 / C_{10}TAB$  foram obtidos os maiores valores do coeficiente de partição (7,7), um rendimento de 71% e forneceu um balanço ótimo entre o efeito desnaturante e as atrações eletrostáticas, em relação aos outros sistemas.

Na maioria dos sistemas de duas fases, os surfactantes do tipo não-iônicos têm atração preferencialmente por biomoléculas hidrofóbicas. Moléculas hidrofílicas não são extraídas e concentradas na fase rica em surfactante. Ligantes de afinidade em conjunto com surfactantes não-iônicos podem ser utilizados na extração de biomoléculas hidrofílicas. Saitoh e Hinze<sup>29</sup> estudaram o uso dos ligantes R-biotina e octilglucosídeo em conjunto com os surfactantes Triton X-114 e  $C9-APSO_4$  (sulfato de 3-(nonil dimetilamônio)propil) na extração de proteínas hidrofílicas. Segundo os autores mais que 50% da hexoquinase foi extraída usando o surfactante  $C9-APSO_4$  e octilglucosídeo.

Existem poucas investigações sobre os mecanismos da distribuição de proteínas na extração a base de micelas. Nikas *et al.*<sup>30</sup> propuseram um modelo

teórico para a distribuição de proteínas, baseado na interação do volume excluído entre proteínas globulares hidrofílicas e micelas não carregadas. Neste modelo, as micelas crescem dentro de uma estrutura cilíndrica alongada e, assim, formam uma configuração de rede emaranhada sobre a separação em soluções aquosas micelares. Em resumo, proteínas hidrofílicas são excluídas da rede dependendo do seu tamanho, e distribuídas dentro da fase aquosa.

Além de proteínas, outras biomoléculas podem ser extraídas e/ou pré-concentradas utilizando um sistema de duas fases a base de surfactante. Sirimanne *et al.*<sup>31</sup> utilizaram o surfactante não-iônico Genapol X-080 e NaCl, para induzir a separação de fases, na extração de vitaminas A e E em sangue e soro humano. A recuperação encontrada foi de  $85,6 \pm 0,4$  e  $82,6 \pm 5,2\%$  para as vitaminas A e E, respectivamente, em amostras de soro. Empregando o surfactante catiônico Aliquat-336 (cloreto de tricaprililmetilamônio) Man *et al.*<sup>32</sup> extraíram e pré-concentraram toxinas de cianobactérias de águas naturais obtendo taxas de recuperação de  $113,9 \pm 9\%$  e  $87,1 \pm 7\%$  para duas variações de toxinas. Devido a suas propriedades aniônicas, alta seletividade foi obtida a essas duas variações.

#### ***3.1.4. Vantagens e limitações da extração ponto nuvem***

A extração ponto nuvem surgiu como um processo versátil (podendo ser aplicada a diferentes analitos), simples, rápido e de baixo custo. Para a extração e/ou a pré-concentração de pesticidas e vitaminas, por exemplo, em que, a extração líquido-líquido convencional utiliza solvente orgânico tóxico, a técnica oferece uma alternativa a qual pode-se chamar de “química limpa”. Em muitos casos, o processo também oferece altos fatores de concentração devido ao pequeno volume da fase rica em surfactante obtida após a separação de fases.

Em relação às proteínas, os sistemas de duas fases oferecem outras vantagens. Entre elas pode-se citar a alta biocompatibilidade, devido ao elevado teor de água presente nas duas fases (cerca de 90% m/m)<sup>23</sup>, em muitos casos o alto rendimento, devido ao fato de fornecer um produto puro com a máxima recuperação da atividade biológica, e a utilização em larga escala, devido a simplicidade do processo. Entre as limitações inclui a possível alteração da bioatividade dos analitos de interesse, com a utilização, principalmente dos surfactantes iônicos no sistema de separação, e a posterior remoção do surfactante da fase rica.

### **3.2. Proteínas**

#### **3.2.1. Aspecto geral**

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes na maioria dos processos biológicos. Elas estão entre as moléculas biológicas mais abundantes e são extremamente versáteis, podendo ser classificadas de acordo com a função que exercem em enzimas, proteínas transportadoras, proteínas nutrientes e de armazenamento, proteínas contráteis ou de mobilidade, proteínas estruturais, proteínas de defesa, proteínas reguladoras, etc<sup>33</sup>.

Embora as proteínas apresentem propriedades e funções tão diferentes, elas são construídas com o mesmo grupo de 20 aminoácidos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, triptofano, serina, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, cisteína, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico e ácido glutâmico).

Algumas proteínas consistem de uma única cadeia polipeptídica. Entretanto, em várias proteínas muitas cadeias se agrupam para formar agregados maiores, com cada cadeia polipeptídica constituinte sendo considerada uma subunidade, as

quais podem ser idênticas ou diferentes. A enzima ribonuclease tem uma cadeia polipeptídica, a hemoglobina tem quatro: duas cadeias  $\alpha$  idênticas entre si e duas cadeias  $\beta$  idênticas entre si, todas as quatro mantidas unidas por interações não-covalentes. As subunidades ou cadeias polipeptídicas podem ser unidas por ligações dissulfeto ou por meio de interações não-covalentes, como no caso da hemoglobulina<sup>34</sup>.

As proteínas que contêm apenas aminoácidos na sua constituição são consideradas proteínas simples. Entretanto, algumas proteínas, conhecidas como proteínas conjugadas, contêm certos grupamentos químicos denominados de grupo prostético. Essas proteínas são classificadas com base na natureza química desses grupos: lipoproteínas contêm lipídios, glicoproteínas contêm moléculas de açúcares e metaloproteínas contêm metais. O grupo prostético desempenha um papel importante na função biológica da proteína, como será relatado.

### ***3.2.2. Plasma: proteínas plasmáticas***

O sangue pode ser dividido em duas grandes porções: as células e o plasma sanguíneo, os quais podem ser separados um do outro por centrifugação. Existem três tipos de células: os eritrócitos, células vermelhas do sangue, ricas em hemoglobina e responsáveis pelo transporte de  $O_2$  e  $CO_2$ ; em uma porção menor os leucócitos, células brancas e responsáveis pela defesa do organismo; e as plaquetas, responsáveis pela coagulação sanguínea.

O plasma é constituído por 90% de água e 10% de soluto<sup>33</sup>, e é muito complexo em relação a sua composição química. Nele se encontram dissolvidos componentes inorgânicos, tais como: NaCl, KCl,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ , etc., os quais constituem 10% do soluto do plasma; metabólitos orgânicos e produtos de

excreção, como uréia, glicose, ácido úrico, etc., que constituem 20% do soluto do plasma; e as proteínas plasmáticas que constituem 70% do soluto do plasma.

Entre as proteínas do plasma sanguíneo citam-se a soroalbumina (aproximadamente 59% das proteínas totais), muitas espécies de imunoglobulinas (anticorpos circulantes), apolipoproteínas (proteínas responsáveis pelo transporte de lipídios como HDL e LDL), tranferrina (responsável pelo transporte de ferro), fibrinogênio e protombina (ambos responsáveis pela coagulação sanguínea), etc. A concentração de proteína total no plasma varia entre 60 e 80 g/L<sup>35</sup> de indivíduo para indivíduo.

O plasma humano é um fluido corpóreo que pode ser utilizado para monitorar a direção de doenças. Informações sobre a magnitude de mudanças em proteínas identificadas a certas doenças específicas podem ser diagnosticadas, prognosticadas ou de significância terapêutica<sup>36</sup>.

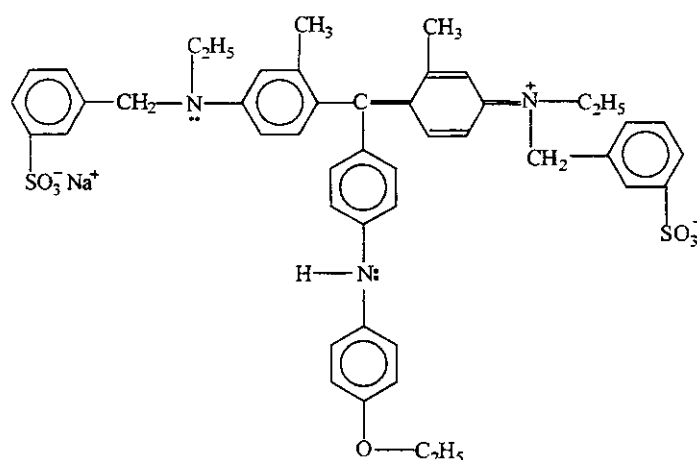
### ***3.2.3. Métodos de determinação de proteínas totais***

Existem vários métodos para a determinação da concentração de proteínas totais. No entanto, as metodologias mais utilizadas são as espectrofotométricas no ultravioleta e no visível (UV-Vis).

No decorrer dos anos, muitos métodos espectrofotométricos têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todas as matrizes<sup>37</sup>. Entre os métodos mais comumente utilizados estão o do biureto<sup>38</sup>, de Lowry<sup>39</sup>, de Bradford<sup>40</sup>, de Smith<sup>41</sup> e o da absorção no ultravioleta<sup>42</sup>. Neste trabalho será abordado apenas o método de Bradford. Uma revisão detalhada sobre os outros métodos pode ser encontrada em literatura pertinente<sup>43</sup>.

O princípio do método de Bradford baseia-se na interação entre o corante azul brilhante de coomassie (*Coomassie Brilliant Blue - CBB*) G-250 e moléculas de proteínas. O complexo formado absorve fortemente em 595 nm. Existem muitas discussões na literatura sobre a forma de como ocorre a interação.

Antes mesmo do método de Bradford ser popularizado, Fazejas de St. Groth *et al.*<sup>44</sup> estudaram a interação entre proteínas e o corante. Os autores propuseram que a interação é devido a atração eletrostática entre os grupos sulfônicos do corante (Figura 3) com os grupos de aminas primárias protonadas, tais como lisina, e os grupos *N*-terminal.



**Figura 3.** Estrutura do azul brilhante de coomassie G-250.

Sedmak e Grossberg<sup>45</sup> demonstraram que peptídios com massas molares menores que 3000 Da não formam complexo com o corante. Além disso, os autores sugeriram que a interação entre o corante e a proteína é realizada por meio de grupos amino protonados da proteína. Anos mais tarde, a importância de grupos amino foi demonstrada por Demoreno *et al.*<sup>46</sup>, sugerindo a importância dos grupos sulfônicos do corante e a formação do par iônico com resíduos de lisina e arginina.

Segundo Compton e Jones<sup>47</sup> entre as três formas existentes do corante (catiônica, neutra e aniônica), é a forma aniônica que se complexa a proteína. De



acordo com os autores, a interação requer cadeias polipeptídicas longas, isto é, o método não apresenta resposta positiva para uma única cadeia peptídica. Além disso, a reação ocorre com proteínas que contêm aminoácidos de cadeia lateral básicas (histidina, lisina e arginina, principalmente com a ariginina), e aromáticas (triptofano, tirosina e fenilalanina). Fountoulakis *et al.*<sup>48</sup> também notaram a importância da hidrofobicidade da proteína na interação com o corante.

Apesar do método de Bradford ser rápido, simples e estar sujeito a um número pequeno de interferentes, duas das grandes desvantagens é a menor sensibilidade, para amostras que contêm proteínas de baixa massa molar e o fornecimento de resultados nem sempre reprodutíveis, devido ao grau de pureza do corante que varia conforme a procedência.

#### **3.2.4. Dicroísmo circular**

A espectroscopia de dicroísmo circular utiliza a luz polarizada circularmente à direita e à esquerda para estudar moléculas assimétricas, tais como proteínas, carboidratos, dendrímeros, etc. A absorção é fortemente influenciada pela morfologia da molécula produzindo um espectro característico<sup>49</sup>.

Desde a introdução do primeiro instrumento comercial na década de 60, a espectroscopia de dicroísmo circular tornou-se uma técnica valiosa para estudar a estrutura de peptídeos e proteínas em solução. O espectro de DC pode ser obtido na região do ultravioleta próximo (240-340 nm), a qual detecta mudanças na estrutura terciária ao redor dos resíduos aromáticos e das ligações dissulfeto, e no ultravioleta distante (190-240 nm), relatando informações sobre a estrutura secundária<sup>50</sup>. Mudanças na estrutura secundária pode ser um indício para indicar a estabilidade da conformação da proteína.

Há quatro níveis de complexidade da estrutura protéica. A estrutura primária é a seqüência de aminoácidos específica para cada proteína. A forma da cadeia polipeptídica determina a estrutura secundária da proteína: alfa hélice, folha beta pregueada paralela ou antiparalela, torção beta e randômica. A estrutura terciária é o enovelamento e a torção das estruturas secundárias e a estrutura quaternária é definida como a agregação de duas ou mais cadeias polipeptídicas<sup>51</sup>.

O espectro de DC obtido na região do ultravioleta distante representa o espectro médio de todas as estruturas secundárias, as quais produz sozinhas um componente espectral distinto. Mudanças nas estruturas secundárias monitoradas por DC podem ser comparadas com espectros de referência bem definidos de elementos (proteínas, peptídeos) estruturais padrão para determinar a porcentagem de cada estrutura secundária.

### ***3.3. Eletroforese***

#### ***3.3.1. Aspectos gerais***

O termo eletroforese foi criado por Michaelis, em 1909, para descrever a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico<sup>52</sup>. Atualmente, a eletroforese se refere ao fenômeno para descrever a migração de qualquer partícula carregada<sup>53,54</sup>.

A eletroforese é uma técnica de análise qualitativa e quantitativa para substâncias que apresentam cargas elétricas e, na maioria das vezes, permite distinguir moléculas que apresentam mínimas diferenças em suas propriedades.

Historicamente, a eletroforese foi introduzida por Tiselius<sup>55</sup> em 1937, para a separação de frações protéicas do soro por meio do método da fronteira móvel em meio líquido, denominada eletroforese livre. No sistema, as proteínas eram

separadas por uma solução tampão na ausência de qualquer sistema estabilizante. A câmara eletroforética em forma de U continha na parte superior de cada um de seus compartimentos um eletrodo, anodo e catodo, sendo que as proteínas migravam a partir da parte central de cada um destes compartimentos laterais, ascendente ou descendente. O fracionamento era acompanhado por um sistema ótico colocado na vizinhança de cada ramo lateral desta câmara. O perfil eletroforético era determinado pelo gradiente do índice de refração ao longo do tubo, pois este variava diretamente proporcional ao gradiente da concentração das proteínas migrantes.

De uma maneira geral, a eletroforese estabilizada pode ser dividida em dois tipos: as estabilizadas por um suporte sólido ou gelatinoso, e aquelas realizadas em um meio líquido estabilizado por um gradiente, como por exemplo, de sacarose<sup>56</sup>. Esta última é baseada no princípio proposto por Tiselius, como descrito anteriormente. A eletroforese em suporte sólido será abordada posteriormente, dando ênfase à eletroforese em gel de poliacrilamida, técnica muito utilizada nos processos analíticos envolvendo proteínas.

Um dos parâmetros importantes na eletroforese é a mobilidade. A mobilidade de um íon em um campo elétrico segue a equação<sup>57</sup>:

$$\mu = \frac{qD}{kT}$$

Em que:

$\mu$  = mobilidade da molécula;  
 $q$  = carga líquida da molécula;  
 $D$  = coeficiente de difusão;  
 $k$  = constante de Boltzmann;  
 $T$  = temperatura absoluta.

Esta equação independe do tamanho e da conformação da molécula e, não leva em consideração a sua interação com o meio de suporte.

Os fatores que afetam a eletroforese tais como pH, força iônica, temperatura e condições elétricas são aplicáveis a todas as formas de eletroforese. Entretanto, quando um meio de suporte é usado, fatores adicionais também podem influenciar a mobilidade e a separação. Nestes incluem efeitos de adsorção sobre o suporte, material suporte não homogêneo, troca-iônica com grupos carregados das moléculas do suporte e eletroendosmose<sup>58</sup>.

A eletroforese é rotineiramente aplicada na separação e caracterização de aminoácidos, peptídeos, proteínas, incluindo lipo e glicoproteínas, nucleotídeos, ácidos carboxílicos e outras substâncias de relevância biológica, que podem apresentar cargas em função do pH do meio<sup>56</sup>. A carga preponderante de uma molécula protéica é função dos seus aminoácidos. Em pH neutro, por exemplo, a componente lisina, arginina e histidina contribuem com carga positiva, enquanto os radicais de ácido glutâmico e ácido aspártico com carga negativa. Sendo substâncias anfólicas, as proteínas adquirem carga positiva ou negativa em função do pH.

A eletroforese é uma técnica relativamente barata, rápida, reprodutível, de instrumentação simples e fornece uma boa confiabilidade nos resultados para uma ampla faixa de proteínas. Por estas razões, este é o método de escolha para a separação de proteínas em muitos sistemas, e é na maioria das vezes, incluído em estudos de caracterização. Eletroforese em gel na presença de SDS é o método mais utilizado para estimar a massa molar de cadeias polipeptídicas desnaturadas.

Entre as várias modalidades de eletroforese pode-se citar a isofocussão ou focalização isoeletrica, imuno eletroforese, eletroforese capilar, SDS-PAGE, 2D PAGE, entre outras.

### ***3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida***

A eletroforese pode ser desenvolvida em vários meios de suporte como papel-filtro, sílica gel, membranas de acetato de celulose e géis de agarose, de amido e de poliacrilamida<sup>59</sup>. O melhor suporte define-se como aquele que se apresenta quimicamente inerte, estável sobre uma ampla faixa de pH, temperatura e força iônica, e é transparente. Além de todas essas características, os géis de poliacrilamida apresentam uma enorme vantagem frente aos outros meios de suporte: maior poder de resolução devido ao controle do diâmetro dos poros. Além disso, pequenas massas de amostra (10 - 50 µg) podem ser empregadas, e seus componentes claramente visualizados no gel<sup>60</sup>.

Géis de poliacrilamida são formados por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de persulfato de amônio e tetrametiletenodiamina (TEMED). Este último catalisa a liberação de radicais livres do persulfato, que por sua vez geram radicais livres de acrilamida. Por meio de reações em cadeia, o radical livre de acrilamida reage com outras moléculas de acrilamida, resultando na formação de uma longa cadeia de poliacrilamida. A bis-acrilamida, por copolimerização, causa reticulação entre as cadeias de poliacrilamida. O diâmetro dos poros do gel é função das concentrações de acrilamida e bis-acrilamida.

Entre as técnicas eletroforéticas que empregam gel de poliacrilamida pode-se citar a eletroforese em gel de poliacrilamida descontínua (DISC-PAGE, do inglês discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis), eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE, do inglês sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), eletroforese em gradiente de gel (PGE, do inglês pore gradient electrophoresis) e eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D PAGE, do inglês two-dimensional gel electrophoresis)<sup>61</sup>.

Os sistemas descontínuos foram desenvolvidos por Davis e Ornstein em 1964 devido ao inconveniente dos géis de porosidade uniforme muitas vezes ofuscarem a distinção entre as várias espécies de proteínas<sup>52</sup>. Neste tipo de eletroforese, o gel de poliacrilamida consiste de duas partes físicas: a fase de empilhamento próximo ao catodo, de alta porosidade, e a fase de separação de baixa porosidade. Para uma boa resolução é essencial que os valores de pHs das duas fases sejam bem diferentes (preferivelmente  $\Delta\text{pH} \geq 2$ ). Além das características já citadas, o sistema descontínuo se difere do sistema contínuo, pela composição das soluções tampão do gel e dos reservatórios da cuba eletroforética, que são diferentes no primeiro e iguais no segundo. A amostra protéica, no sistema descontínuo, é aplicada nas cavidades do gel empilhador. Sob eletroforese, as moléculas migram da parte mais porosa (gel empilhador) para a menos porosa (gel separador). Conseqüentemente, as moléculas de proteína concentram-se numa faixa estreita e compacta entre o gel empilhador e o separador, produzindo melhor resolução que no sistema contínuo, devido ao empilhamento permitir elevada concentração das proteínas em análise. Assim, grandes volumes de amostras diluídas sem concentração prévia podem ser aplicados nos géis, obtendo boa resolução.

Atualmente, os sistemas de eletroforese descontínua na presença de SDS são muito utilizados na separação de cadeias polipeptídicas. Na técnica, a proteína é desnaturada por aquecimento, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT), os quais reduzem as ligações dissulfídicas (S-S)<sup>2</sup> por ruptura. As cadeias polipeptídicas na presença de SDS (a maioria se liga a uma razão de 1,4 g de SDS por grama de polipeptídio<sup>62</sup>) adquirem a carga negativa do surfactante, anulando o efeito de cargas das moléculas nativas. Todavia, a migração é conseqüência das cargas negativas do SDS, e o complexo formado SDS-proteína migra no gel de poliacrilamida segundo o seu raio molecular, o qual se aproxima do tamanho molecular. As proteínas migram com velocidades definidas apenas por diferenças

de seus tamanhos moleculares, causando o efeito de peneiramento molecular. Devido a alta resolução (bandas bem definidas no gel), a reprodutibilidade (por causa do controle da concentração de poliacrilamida no gel) e a relação linear existente entre o logaritmo da massa molar e a mobilidade relativa (distância migrada pelo complexo SDS-proteína), a técnica é rotineiramente aplicada para estimar a massa molar de uma ampla faixa de proteínas.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. Equipamentos e acessórios**

- Balança Analítica Mettler modelo AE200 (Bradford, EUA);
- Banho de ultra-som Neytech modelo 28H, frequência de 44-48 kHz (Yucaipa, EUA);
- Centrífuga Nova Técnica modelo NT 811 (Piracicaba, Brasil);
- Cubas eletroforéticas Permatron (Joinville, Brasil);
- Espectrofotômetro Micronal modelo B582 (São Paulo, Brasil);
- Espectropolarímetro JASCO modelo J-720 (Tokyo, Japan);
- Fonte de corrente contínua Pharmacia modelo 1001 (Piscataway, EUA);
- Misturador Vórtex Thermolyne modelo 37600 (Duduque, EUA);
- Potenciômetro Digimed modelo DM20 (São Paulo, Brasil).

### **4.2. Reagentes**

- Acetona P. A., ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), MM = 58,08 g/mol (Synth, Diadema, Brasil);
- Ácido acético glacial,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , MM = 60,05 g/mol (J.T.Baker, Xalostoc, México);
- Ácido fosfórico 85%,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Acrilamida, MM = 71,08 g/mol (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Albumina de soro bovino (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Azul brilhante de coomassie G-250,  $\text{C}_{47}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$  (J.T.Baker, Phillipsburg, EUA);

- Azul de bromofenol,  $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$ , MM = 691,94 g/mol (BioAgency, São Paulo, Brasil);
- Cloreto de sódio, NaCl, MM = 58,44 g/mol (Synth, Diadema, Brasil);
- Dodecilsulfato de sódio, SDS,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$ , MM = 288,28 g/mol (Synth, Diadema, Brasil);
- Etanol 95%,  $C_2H_6O$ , MM = 46,07 g/mol (Mallinckrodt, Xalostoc, México);
- Dihidrogênio fosfato de potássio,  $KH_2PO_4$ , MM = 136,09 g/mol (Merck, Rio de Janeiro, Brasil);
- Hidróxido de sódio, NaOH, MM = 40 g/mol (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Hidroximetil amino metano ( $\beta$ -mercaptoetanol),  $HSCH_2CH_2OH$ , MM = 75,13 g/mol (J.T.Baker, Phillipsburg, EUA);
- Metanol P. A.,  $CH_3OH$ , MM = 32,04 g/mol (Ecibra, Santo Amaro, Brasil);
- *N,N',N,N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED) (J.T.Baker, Phillipsburg, EUA);
- *N,N'*-metileno-bisacrilamida, MM = 154,17 g/mol (Promega, Madison, EUA);
- Persulfato de amônio,  $(NH_4)_2S_2O_8$ , MM = 228,20 g/mol (Mallinckrodt, Paris, França);
- Polioxietileno(8) isooctilfenil éter (Triton X-114) (Sigma-Aldrick, Steinheim, Alemanha).

#### ***4.3. Limpeza de materiais***

Todas as soluções foram preparadas usando água desionizada e armazenadas em frascos de polipropileno anteriormente descontaminados com solução de HCl 10% (v/v). As vidrarias utilizadas também foram colocadas em solução de HCl 10% (v/v) durante 24 horas para a descontaminação.

#### ***4.4. Amostras***

Bolsas de plasma sanguíneo humano monitoradas e, portanto, de indivíduos saudáveis, foram obtidas do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Unicamp. Para garantir homogeneização, o plasma era descongelado e colocado no banho de ultra-som durante 15 min. Alíquotas de plasma eram retiradas e colocadas em frascos de polipropileno com volume igual a 15 mL. Em seguida, os frascos



contendo as respectivas amostras eram congelados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para evitar possíveis perdas da atividade biológica das proteínas devido ao congelamento e descongelamento durante o experimento, as alíquotas descongeladas e não usadas eram descartadas. Os resíduos das amostras bem como os materiais utilizados (ponteiras, agulhas, seringas, etc.) eram descartados em frascos apropriados e enviados à estação de tratamento de resíduos biológicos do Hemocentro da Unicamp. As bolsas de plasma possuíam a validade de um ano.

#### ***4.5. Metodologia***

##### ***4.5.1. Determinação da temperatura do ponto nuvem***

Estudou-se a influência da concentração do cloreto de sódio (0,5 a 10,0% m/v) e da concentração de Triton X-114 (2 a 15% m/v) na temperatura de formação do ponto nuvem.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 10 mL de surfactante a quantidades apropriadas de cristais de cloreto de sódio para a obtenção de concentrações finais variando entre 0,5 e 10,0% (m/v). O comportamento da solução foi observado durante 30 min. Os tubos, em que não foi observada a separação de fases na temperatura ambiente, foram aquecidos até que ocorresse a turvação da solução. A temperatura de turvação foi determinada como sendo a temperatura do ponto nuvem.

##### ***4.5.2. Separação das fases***

Em tubos de ensaio (130 mm de comprimento x 12 mm de diâmetro interno) dissolveram-se quantidades apropriadas de NaCl em 8 mL da solução do surfactante e 200  $\mu\text{L}$  de solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol/L / NaOH 0,1 mol/L,

utilizando um misturador do tipo vórtex. Imediatamente após, foi adicionado o plasma sanguíneo. As massas dos reagentes Triton X-114 e NaCl foram adicionadas de modo a obter concentrações finais como especificadas adiante. A solução foi homogeneizada manualmente e deixada repousar para permitir um tempo de contato entre a proteína e os agregados micelares do surfactante. Os tubos de ensaio foram centrifugados a 1780 g durante 10 min.

As variáveis otimizadas no procedimento e seus respectivos intervalos foram:

- Concentração do surfactante Triton X-114 (2 - 15% m/v);
- Volume de amostra (50 - 2000  $\mu$ L);
- Concentração de NaCl (60 - 12 % m/v);
- Tempo de contato (0 - 30 min);
- pH (6,4 - 7,4).

Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### ***4.5.3. Remoção do surfactante***

Em vários métodos espectrofotométricos, incluindo o método de Bradford, altas concentrações de alguns surfactantes não-iônicos podem interferir na determinação de proteínas totais<sup>40</sup>. Assim, após a separação de fases durante o percurso da otimização, todo o volume da fase rica (fase superior) foi conduzido à remoção do surfactante anteriormente a análise, utilizando acetona resfriada. A acetona em contato com a fase rica em surfactante precipita as proteínas presentes no meio e extrai o surfactante para a fase orgânica. Antes de iniciar a otimização do sistema, foi escolhida uma condição inicial no processo de separação de fases, como mostrado abaixo, e avaliado o volume de acetona necessário para precipitar as proteínas e remover o surfactante.

Pesaram-se 1,02 g de NaCl em tubos de ensaio e dissolveram-no em 8 mL de solução de Triton X-114 6,38% (m/v) e 200  $\mu$ L de solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1

mol/L) / NaOH (0,1 mol/L) pH 7,2. As concentrações finais dos reagentes são: 10% (m/v) de NaCl e 5% (m/v) de Triton X-114. Imediatamente após a dissolução, adicionaram-se 2 mL de plasma sanguíneo. A solução foi homogeneizada e após a separação de fases (em torno de 20 min) centrifugou-se o tubo durante 10 min a 1780 g. Em banho de gelo, à 1 mL da fase rica foram adicionados volumes diferentes de acetona resfriada nas proporções 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5 (volume da fase rica : volume de acetona). Para a estabilização das duas fases (precipitado e sobrenadante), a mistura foi mantida em repouso a 0 °C durante 1 h. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente. Após a secagem, o precipitado foi dissolvido em 1 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 mol/L pH 6,8 contendo aproximadamente 13,6% (m/v) de glicerol, 2,7% (m/v) de SDS e 5,4% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol. Esta solução é denominada nesta dissertação como solução tampão de amostra.

Finalmente, a amostra contendo as proteínas da fase rica precipitadas com acetona e dissolvidas (no mesmo volume) com solução tampão de amostra foram aplicadas em uma corrida eletroforética utilizando gel de poliacrilamida do tipo 1D PAGE. A resolução das bandas foi analisada visualmente para avaliar a remoção do surfactante para os diferentes volumes de acetona.

#### ***4.5.4. Razão de distribuição***

O parâmetro avaliado para a otimização do experimento foi a razão de distribuição ( $R_D$ ):

$$R_D = \frac{C_{\text{superior}}}{C_{\text{inferior}}},$$

em que  $C_{\text{superior}}$  corresponde a concentração protéica na fase rica em surfactante e  $C_{\text{inferior}}$  corresponde a concentração protéica na fase pobre em surfactante. Assim,

quanto menor for  $C_{\text{inferior}}$ , maior será o valor de  $R_D$  e melhor será a condição do sistema.

#### ***4.5.5. Determinação de proteínas totais: Método de Bradford***

A determinação da concentração de proteínas totais presentes nas fases rica e pobre em surfactante foi realizada utilizando o método de Bradford<sup>40</sup>.

O método consiste em dissolver 100 mg de CBB G-250 em 50 mL de etanol 95% (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85% (v/v). Em seguida, a solução é diluída para 1 L. As concentrações finais dos reagentes são: 0,01% (m/v) de CBB, 4,75% (v/v) de etanol e 8,50% (v/v) de ácido fosfórico. A solução é filtrada duas vezes em papel de filtro qualitativo e estocada à 20 °C durante, no máximo, duas semanas. Esta solução é denominada nesta dissertação como reagente de Bradford.

A concentração protéica total foi expressa utilizando albumina de soro bovino (ASB) na faixa de concentração de 5,0 a 50,0 µg/mL. A ASB foi dissolvida em solução tampão adequada para cada etapa da otimização.

Para as medidas espectrofotométricas, pipetou-se 200 µL da amostra em cubetas de plástico de 3 mL e adicionou-se 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 5 min de reação, mediu-se a absorbância em 595 nm.

#### ***4.5.6. Preparo das amostras para a obtenção do gel***

Para o sistema já otimizado, as proteínas que migraram para a fase rica e aquelas que permaneceram na fase pobre, foram separadas por eletroforese. Após a separação de fases, a 1 mL da fase rica em surfactante foram adicionados 4 mL de acetona, em banho de gelo. Para alcançar o equilíbrio, a mistura foi mantida a 0 °C durante 1 h. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, após seco a temperatura

ambiente, foi dissolvido em 1 mL de solução tampão de amostra (Tris-HCl 0,05 mol/L pH 6,8 contendo 13,6% (m/v) de glicerol, 2,7% (m/v) de SDS e 5,4% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol). Para a fase pobre, 500  $\mu$ L de amostra foram adicionados a 500  $\mu$ L de solução tampão de amostra (diluição 1:1). Antes da aplicação no gel, as misturas foram aquecidas a 100 °C durante 1 min. Para as fases rica e pobre foram aplicados 15 e 30  $\mu$ L de amostra, respectivamente, pois, após a diluição, a concentração protéica na fase pobre era metade da concentração protéica na fase rica.

O material de partida (plasma sanguíneo na ausência da separação de fases) foi condicionado a mesma situação da separação de fases, mas na ausência do surfactante. Para a aplicação no gel, foi seguido passo semelhante à fase pobre.

#### ***4.5.7. Caracterização das proteínas por eletroforese descontínua com SDS (SDS-PAGE)***

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida seguindo o método de Laemmli<sup>63</sup>. O método consiste na preparação de dois géis em concentrações distintas que são polimerizados consecutivamente entre placas de vidro. Os géis são denominados de concentrador ou empilhador (gel superior) e fracionador ou separador (gel inferior). A relação e a concentração dos reagentes que compõem o gel (173 mm de largura x 173 mm de comprimento x 1 mm de espessura) podem ser visualizadas no Quadro 2.

O gel concentrador possuía uma altura de 35 mm e os reservatórios da cuba eletroforética foram preenchidos com solução tampão Tris-base 0,06 mol/L / glicina 0,5 mol/L pH 8,3 contendo 1% (m/v) de SDS (solução tampão de corrida). A cuba eletroforética foi interligada a uma fonte de corrente contínua, sendo

fixados os seguintes parâmetros: 200 V, 30 mA e 6 W. A corrida foi realizada sob refrigeração (10-15 °C) e durou aproximadamente 8,5 h.

**Quadro 2.** Composição do gel concentrador e fracionador<sup>52</sup>.

| Reagentes                                                                             | Função                                                                      | Gel concentrador<br>T = 3,5% (m/v)<br>pH 6,8 | Gel fracionador<br>T = 10% (m/v)<br>pH 8,8 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Acrilamida+Bis-acrilamida<br>(T <sup>*1</sup> = 30% m/v,<br>C <sup>*2</sup> = 3% m/m) | Acrilamida: monômero<br>Bis-acrilamida:<br>porogênico (origina os<br>poros) | 1,20 mL                                      | 3,30 mL                                    |
| Solução tampão<br>Tris-HCl                                                            | Estabiliza o pH do meio<br>e permite a passagem de<br>corrente elétrica     | 1,25 mL<br>(1,0 mol/L)                       | 2,50 mL<br>(1,5 mol/L)                     |
| SDS 10% (m/v)                                                                         | Anula o efeito de cargas<br>das moléculas protéicas                         | 1,00 mL                                      | 1,00 mL                                    |
| Água desionizada                                                                      | Solvente                                                                    | 6,55 mL                                      | 3,20 mL                                    |
| TEMED                                                                                 | Catalisador                                                                 | 10 µL                                        | 10 µL                                      |
| Persulfato de<br>Amônio 10% (m/v)                                                     | Gerador de radicais<br>livres                                               | 50 µL                                        | 50 µL                                      |

$$^{*1} T(\text{conc.somatória}) = \frac{\text{acrilamida} + \text{bis - acrilamida}}{\text{volume}} \times 100 ; \quad ^{*2} C(\text{relação}) = \frac{\text{bis - acrilamida}}{\text{acrilamida} + \text{bis - acrilamida}} \times 100$$

Ao término da corrida eletroforética o gel foi lavado sob leve agitação durante 5 min com água desionizada para retirar o excesso de SDS. Em seguida, o gel foi corado durante 2 h com uma solução de 1% (m/v) de CBB contendo 45% (v/v) de metanol, 45% (v/v) de água desionizada e 10% (v/v) de ácido acético glacial, sob leve agitação. O gel foi descorado com a mesma solução, mas sem o corante, até perfeita diferenciação entre as bandas.

A fim de estimar a massa molar das cadeias polipeptídicas da amostra, 30  $\mu$ L do padrão protéico (MB1 Fermentas, Hanover, Estados Unidos) foram aplicados juntamente com as amostras na separação eletroforética. A mistura continha as seguintes proteínas:  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (66,2 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), lactato desidrogenase (35,0 kDa) e endonuclease de restrição *Bsp98I* (25,0 kDa). Anteriormente a aplicação no gel, o padrão protéico foi aquecido a 100 °C durante 5 min.

#### ***4.5.8. Eletroforese descontínua nativa em gel de poliacrilamida***

A fim de separar as proteínas do plasma sanguíneo por diferentes modos ou técnicas eletroforéticas para melhor caracterizar a amostra, foi realizada a eletroforese nativa descontínua em gel de poliacrilamida para as proteínas com pI na faixa de pH < 7. A preparação dos géis e dos reagentes na eletroforese nativa foi semelhante à eletroforese descontínua na presença de SDS, como descrito anteriormente. No entanto, o SDS foi substituído por água desionizada na composição do gel. Além disso, a amostra é preparada com solução tampão Tris-HCl 0,05 mol/L pH 6,8 contendo 10% (m/v) de glicerol e 0,01% (m/v) de azul de bromofenol. A preparação da amostra e a aplicação no gel foram semelhantes ao item 4.5.6., mas, o aquecimento da amostra não foi efetuado.

Esta caracterização também foi realizada por meio do processo de separação por ponto nuvem otimizado.

#### ***4.5.9. Tratamento da imagem***

As massas molares das frações protéicas foram estimadas utilizando o software Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics, Maryland 20910, Estados

Unidos), bem como os padrões protéicos de massas molares conhecidas.

#### **4.5.10. Dicroísmo circular**

Adotou-se uma estratégia para apontar a ocorrência de possíveis modificações na estrutura secundária das proteínas extraídas para a fase rica em surfactante. Uma solução padrão de ASB foi condicionada à metodologia otimizada: 5% (m/v) de Triton X-114, 100 µL de amostra (ASB 10 g/L), 10% (m/v) de NaCl, tempo de contato instantâneo e pH 6,8. Em banho de gelo, a fase rica foi removida (cerca de 2 mL) e acrescentou-se acetona resfriada (cerca de 8 mL) para favorecer a precipitação das proteínas e a remoção do surfactante. Para a estabilização das duas fases (precipitado e sobrenadante) a mistura foi mantida a 0 °C durante 1h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, após seco a temperatura ambiente, foi dissolvido em 2 mL de solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol/L / NaOH 0,1 mol/L pH 6,8. Mediu-se a concentração da proteína por meio do método de Bradford e, em seguida, a solução foi conduzida ao espectropolarímetro.

Uma solução de ASB padrão  $1 \times 10^{-6}$  mol/L dissolvida em solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol/L / NaOH 0,1 mol/L pH 6,8 foi utilizada como referência para avaliar as mudanças na estrutura da ASB extraída pela metodologia apresentada.

Os espectros de dicroísmo circular foram realizados a 22,5 °C. As varreduras foram realizadas entre 187 – 275 nm com resolução de 0,2 nm, tempo de integração 1s e largura da banda de 1 nm. Celas de 0,1 cm foram usadas. Os dados originais do espectro são expressos em elipticidade ( $\theta$  mdeg) e as conversões para a elipticidade molar ( $[\theta]$ ) foram realizadas no próprio equipamento conforme a equação:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 C l}$$



em que C corresponde a concentração (mol/L) e l ao comprimento da cela (cm).

Para estimar a porcentagem de  $\alpha$ -hélice da albumina foi utilizado o programa Model SSE-338 (Protein Secondary Structure Estimation Program JASCO J-700 for Windows) em que as proteínas de referência foram: lisozima, papaína, citocromo C, hemoglobina e quimotripsina A.

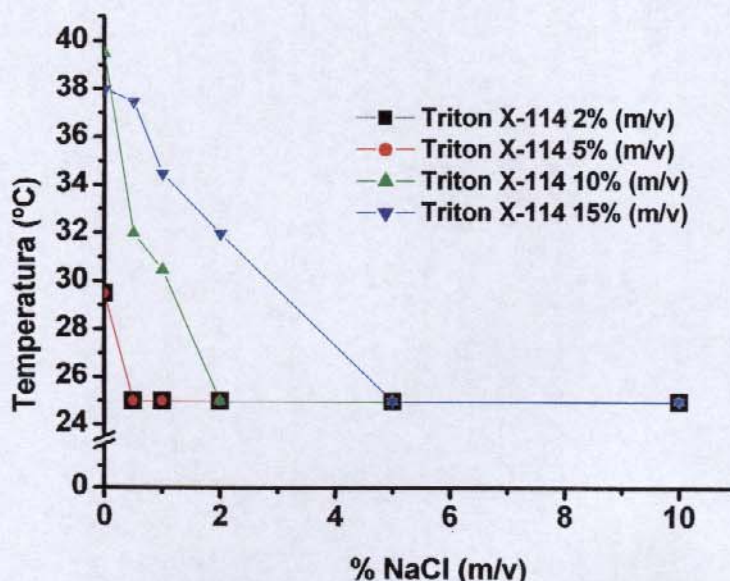
## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***5.1. Temperatura do ponto nuvem***

As causas do fenômeno do ponto nuvem parecem ser resultado de mudanças no balanço de interações entre as micelas. A formação do ponto nuvem usando surfactantes não-iônicos não ocorre em condições atmosféricas usuais<sup>64</sup>. A temperatura é o principal fator que afeta a separação de fases. Infelizmente, há a possibilidade de ocorrer a desnaturação de proteínas em soluções de surfactante altamente concentradas a altas temperaturas<sup>29</sup>. Há muitos fatores que podem tanto aumentar quanto diminuir a temperatura de formação do ponto nuvem de surfactantes não-iônicos. Entre eles podemos citar a adição de ácidos<sup>65</sup>, sais inorgânicos<sup>66</sup>, glicerol<sup>67</sup> e surfactantes iônicos<sup>68</sup>. Os três primeiros tendem a diminuir, enquanto o último tende a aumentar a temperatura do ponto nuvem. Por esse motivo foi estudada a influência do NaCl na separação de fases de modo que temperaturas de extração mais baixas ajudam a prevenir ou minimizar a desnaturação de proteínas<sup>69</sup>.

A Figura 4 apresenta as variações da temperatura de formação do ponto nuvem para diferentes concentrações de Triton X-114 e de cloreto de sódio. Observa-se que quando o cloreto de sódio é adicionado à solução contendo Triton X-114, o ponto nuvem diminui em relação à solução de surfactante puro, isto é,

sem a adição do eletrólito. O fato indica que é necessário considerar o efeito secundário do eletrólito, o efeito “salting-out”<sup>70</sup>. Quanto maior a concentração de Triton X-114, maior a quantidade de cloreto de sódio necessário para a formação do ponto nuvem a temperatura ambiente. Isso se deve ao fato de que na presença de eletrólitos a carga superficial micelar é neutralizada e a temperatura do ponto nuvem diminui. Outro efeito para a diminuição da temperatura do ponto nuvem é a competição entre as moléculas de sais e as moléculas do surfactante pelas moléculas de água, promovendo a agregação das micelas<sup>71</sup>.



**Figura 4.** Efeito da adição de NaCl na temperatura de formação do ponto nuvem em diferentes concentrações de Triton X-114 ( $T \pm 1$  °C).

Os intervalos das variáveis avaliadas no trabalho foram escolhidos de tal forma, que a formação da separação de fases ocorresse à temperatura ambiente. Assim, durante o percurso da otimização a separação de fases foi induzida à temperatura ambiente.

## **5.2. Remoção do surfactante**

Para a remoção do surfactante utilizou-se um solvente orgânico (acetona) com o intuito de precipitar as proteínas presentes no meio e solubilizar as moléculas do surfactante.

Os solventes comumente usados na precipitação de proteínas são: metanol (P.E.= 64,5 °C), etanol (P.E.= 78,3 °C), butanol (P.E. = 117,7 °C) e acetona (P.E. = 56,4 °C). A acetona foi escolhida devido ao fato desta apresentar o menor ponto de ebulição e assim, facilitar a secagem das proteínas precipitadas.

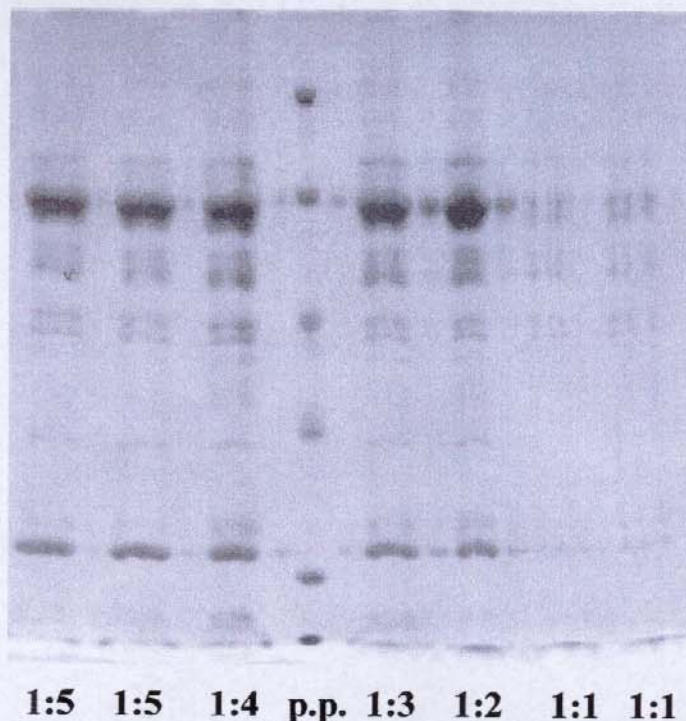
Todos os solventes citados apresentam domínios hidrofílicos e hidrofóbicos. O fenômeno que induz a uma explicação pelo fato das proteínas precipitarem na presença de solventes orgânicos pode estar relacionado a estas propriedades. Os grupos polares desses solventes interagem com os grupos polares da proteína competindo com outros solventes, como, por exemplo, a água<sup>34</sup>. Além disso, grandes volumes de solventes orgânicos podem reduzir a concentração efetiva da água levando a uma menor hidratação das moléculas protéicas. Todos esses fatores podem causar uma diminuição na solubilidade da proteína na presença do solvente orgânico e, conseqüentemente, conduzir a uma precipitação.

Diferentes volumes de acetona foram avaliados para a remoção do surfactante. Por meio da Figura 5 é possível visualizar os resultados da adição desses volumes na corrida eletroforética. Foram aplicados 25 µL de cada amostra no gel, assim como do padrão protéico.

A partir da proporção 1:2 (volume da fase rica : volume de acetona) observa-se melhor resolução das bandas. O comportamento não é observado na proporção 1:1, na qual, possivelmente, o volume de acetona é insuficiente para remover todo o surfactante. Na literatura recomendam-se, no mínimo, três vezes o volume de acetona em relação ao volume de amostra, pois volumes menores não garantem a



precipitação quantitativa das proteínas<sup>36,72</sup>. Assim, a proporção entre o volume da fase rica e o volume de acetona foi fixada em 1:4 (fase rica : acetona).



**Figura 5.** Corrida eletroforética para diferentes proporções de amostra (fase rica em surfactante) e acetona, onde p.p. são proteínas de massas molares conhecidas (padrão protéico) e 1:5, 1:4, 1:3, 1:2 e 1:1 são as proporções entre o volume da fase rica e o volume de acetona.

Durante toda a otimização foi utilizada a proporção 1:4 para a remoção do surfactante da fase superior.

Na tentativa de remover o surfactante da fase rica também foi testado o método proposto por Terstappen e Kula<sup>73</sup> baseado na extração com 1,2-dicloroetano. Segundo os autores, as proteínas são recuperadas na fase aquosa (fase superior), onde são encontradas baixas concentrações do tensoativo. Aplicando este método para a remoção do surfactante presente na fase rica, após a separação de proteínas do plasma sanguíneo por ponto nuvem, observou-se a precipitação das

proteínas na interface das fases, conduzindo assim, a perdas das mesmas. Assim, o método não apresentou eficiência na recuperação das proteínas.

### 5.3. Otimização da separação de fases

A separação de fases, bem como a razão de distribuição, são dependentes do tipo de surfactante usado. É desejável em sistemas a base de micelas, a escolha de um surfactante que forneça bons rendimentos de extração, caráter não desnaturante, no caso de proteínas, e que tenha, muitas vezes, alta seletividade.

Os surfactantes não-iônicos são menos efetivos na desnaturação de proteínas quando comparados com os surfactantes iônicos<sup>74</sup>. Entre os surfactantes não-iônicos, o Triton X-114 (Figura 6) foi escolhido para realizar a extração de proteínas devido a sua habilidade em produzir sistemas de duas fases em uma faixa de temperatura biocompatível (4-30 °C), dependendo da concentração e do efeito de aditivos<sup>1</sup>.

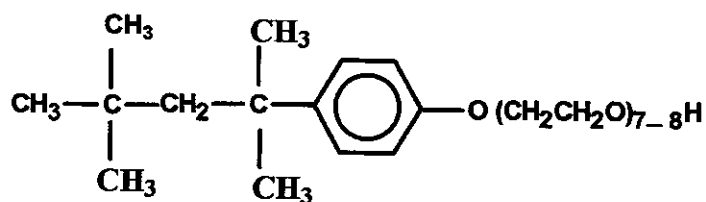


Figura 6. Estrutura do polioxietileno(8) isooctilfenil éter (Triton X-114).

#### 5.3.1. Concentração do surfactante

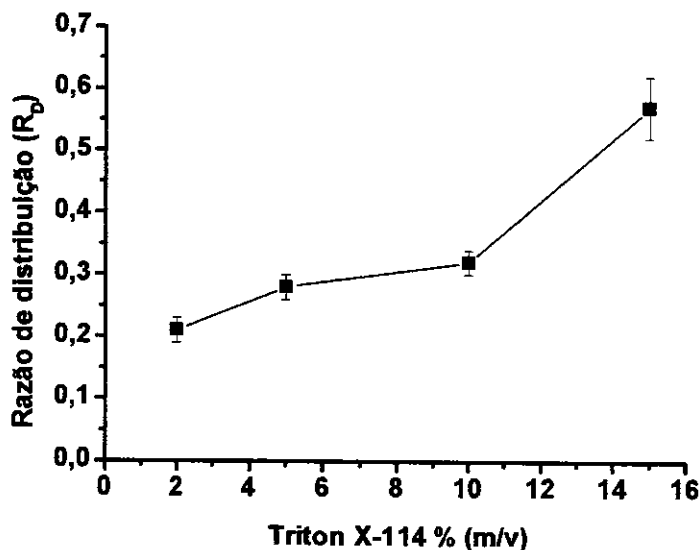
A Tabela 1 apresenta a relação entre as diferentes concentrações do surfactante e o volume das fases rica e pobre. Quanto menor a concentração do surfactante, menor o volume da fase rica formada. Se a eficiência de extração

estiver relacionada ao volume da fase rica, o valor desta aumentaria com a diminuição do volume.

**Tabela 1.** Volume das fases rica e pobre obtido em diferentes concentrações de Triton X-114 (N = 1), utilizando no sistema de separação de fases 2000  $\mu\text{L}$  de amostra, 10% (m/v) de NaCl, 20 min de tempo de contato e pH 7,2.

| Triton X-114 % (m/v) | Volume da fase rica (mL) | Volume da fase pobre (mL) |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|
| 0,8                  | 0,1                      | 9,7                       |
| 1,0                  | 0,2                      | 9,7                       |
| 2,0                  | 0,6                      | 9,1                       |
| 5,0                  | 1,7                      | 8,1                       |
| 10,0                 | 3,2                      | 6,6                       |
| 15,0                 | 4,3                      | 5,2                       |

A Figura 7 apresenta a razão de distribuição na faixa de 2-15% (m/v) de Triton X-114.



**Figura 7.** Razão de distribuição em função da concentração de Triton X-114 (N = 3), utilizando 2000  $\mu\text{L}$  de amostra, 10% (m/v) de NaCl, 20 min de tempo de contato e pH 7,2.

A faixa de concentração estudada foi relativamente ampla e esperava-se grandes variações na razão de distribuição com a diminuição da concentração do

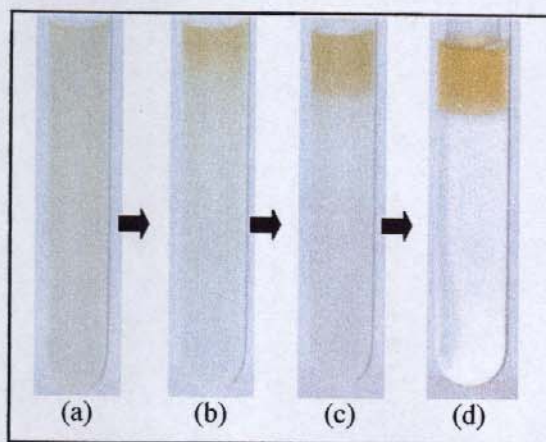
surfactante devido ao volume da fase rica formada, observado na Tabela 1. Porém, a razão aumentou progressivamente com o aumento da concentração de Triton X-114. Isto pode indicar quantidades insuficientes de tensoativo para extrair altas concentrações protéicas presentes na solução.

Segundo Morén e Khan<sup>75</sup> baixas concentrações do surfactante implicam em uma ligação específica e altas concentrações implicam em uma ligação não específica. A origem da ligação específica é uma combinação de interações entre as partes hidrofóbicas da proteína e a cadeia apolar do surfactante, e, entre resíduos de aminoácidos carregados da proteína e a cabeça polar do surfactante. A origem da ligação não específica é devida, principalmente, a interação entre a região apolar do surfactante e as regiões não polares da proteína, bem como as interações surfactante-surfactante, que é de caráter similar às forças que dirigem a formação da micela. Segundo os autores<sup>75</sup>, assume-se que os agregados micelares sobre a proteína não estão presentes no sistema até que a ligação não específica tenha iniciado. Assim, nas condições estudadas, as ligações podem ser não específicas, o que implica em baixa seletividade e extração de uma variedade de proteínas, aumentando a razão de distribuição com o aumento da concentração do surfactante, isto é, aumentado a concentração do surfactante há uma migração maior das proteínas presentes na solução para a fase rica em surfactante.

As razões de distribuição se situaram entre 0,21 e 0,57 para 2 e 15% (m/v) de Triton X-114, respectivamente. Embora para a concentração de 15% (m/v) de surfactante obteve-se uma razão maior, existe uma dificuldade em se trabalhar com altas concentrações devido à viscosidade. Concentrações menores que 2% (m/v) dificultavam a retirada da micela dos tubos, e por isso não foram estudadas. A razão de distribuição foi praticamente constante entre 5 e 10% (m/v) de surfactante e, assim, a concentração do mesmo foi fixada em 5% (m/v).



A Figura 8 apresenta a formação da separação de fases utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 2000  $\mu$ L de amostra, 10% (m/v) de NaCl e pH 7,2.



**Figura 8.** Sequência de fotos obtidas durante a separação de fases. (a) 10 min, (b) 20 min, (c) 30 min, (d) após a centrifugação a 1780 g durante 10 min. A fase superior do tubo (em amarelo) é a fase rica em surfactante. A fase inferior é a fase pobre em surfactante.

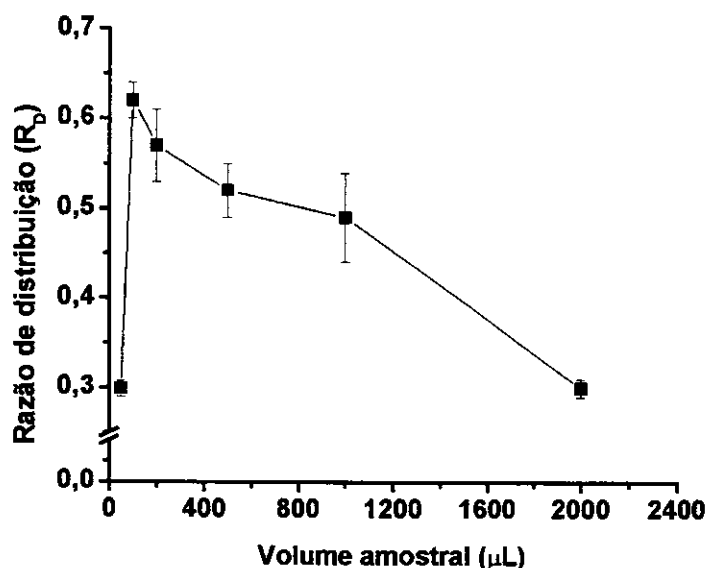
### 5.3.2. Volume de amostra

Considerando que as concentrações de surfactante estudadas eram insuficiente para extrair a maior parte das proteínas presentes na solução, foi avaliado o volume de amostra, de modo a diminuir a concentração protéica. A Figura 9 apresenta as razões de distribuição em diferentes volumes de amostra (50 - 2000  $\mu$ L). A concentração do surfactante manteve-se constante em todos os casos.

Observa-se que as razões de distribuição se situaram entre 0,62 e 0,30 para os volumes amostrais entre 100 e 2000  $\mu$ L, respectivamente. Maiores volumes de amostra implicam em quantidades de massa protéica elevada, para as quais a concentração de surfactante presente na solução já não é suficiente. Por outro lado, em quantidades maiores de massa protéica pode ocorrer à agregação entre as proteínas e, assim, facilitar a sua migração para a fase rica em surfactante. Esse fenômeno pode não ocorrer a baixas concentrações, como por exemplo, na



utilização de 50  $\mu\text{L}$ , o que explica uma diminuição na curva da razão de distribuição.



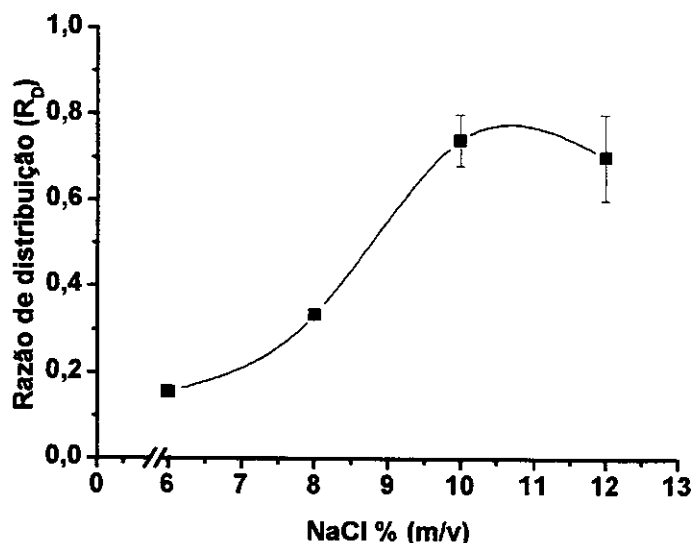
**Figura 9.** Razão de distribuição em função do volume de amostra ( $N = 3$ ), utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 10% (m/v) de NaCl, 20 min de tempo de contato e pH 7,2.

Assim, o volume de amostra foi fixado em 100  $\mu\text{L}$  devido ao fato deste apresentar a maior razão de distribuição.

### 5.3.3. Concentração do eletrólito (NaCl)

A influência do eletrólito na separação de fases já foi abordado no item 5.1. Portanto, neste item serão visualizados apenas o comportamento da razão de distribuição para as diferentes concentrações de NaCl (Figura 10).

A razão de distribuição aumentou com o aumento da concentração de NaCl e manteve-se praticamente constante a partir de 10% (m/v). Isto indica que acima de 10% (m/v) de NaCl, toda a carga superficial micelar é neutralizada, tornando a altura da fase rica menor e aumentando os valores da razão de distribuição, pois o analito está distribuído em um volume menor (Tabela 2).



**Figura 10.** Razão de distribuição em função da concentração de NaCl ( $N = 3$ ), utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 100  $\mu$ L de amostra, 20 min de tempo de contato e pH 7,2.

As razões de distribuição se situaram entre 0,16 e 0,70 para 6 e 12% (m/v) de NaCl, respectivamente.

**Tabela 2.** Volume das fases rica e pobre em surfactante ( $N = 3$ ) para as diferentes concentrações do eletrólito, utilizando no sistema de separação de fases 5% (m/v) de Triton X-114, 100  $\mu$ L de amostra, 20 min de tempo de contato e pH 7,2.

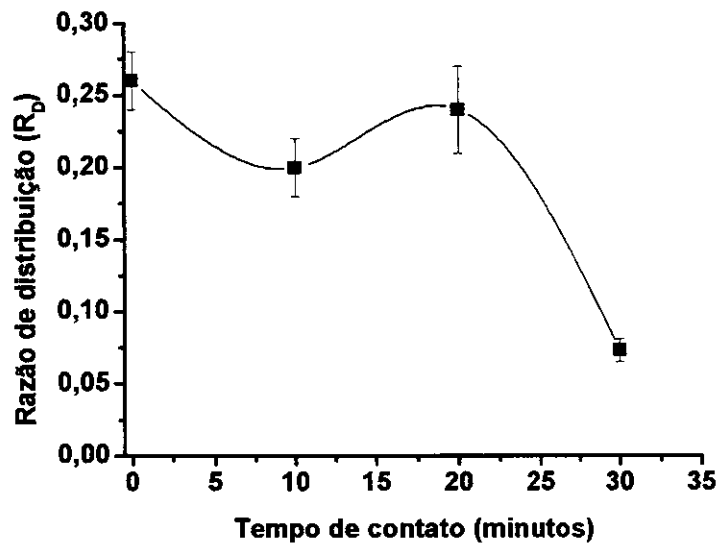
| NaCl % (m/v) | Volume da fase rica (mL) | Volume da fase pobre (mL) |
|--------------|--------------------------|---------------------------|
| 6            | $2,5 \pm 0,1$            | $5,6 \pm 0,2$             |
| 8            | $2,0 \pm 0,1$            | $5,9 \pm 0,1$             |
| 10           | $1,3 \pm 0,1$            | $6,6 \pm 0,1$             |
| 12           | $1,2 \pm 0,2$            | $7,0 \pm 0,2$             |

Assim, nas etapas seguintes, a concentração de NaCl foi fixada em 10% (m/v).

#### 5.3.4. Tempo de contato

Denomina-se tempo de contato, o tempo em que, após a mistura de todos os reagentes (anterior a centrifugação), a proteína e os agregados micelares ficam em

contato. A Figura 11 apresenta a variação da razão de distribuição para os diferentes tempos de contato.



**Figura 11.** Razão de distribuição em função do tempo de contato ( $N = 3$ ), utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 100  $\mu$ L de amostra, 10% (m/v) de NaCl e pH 7,2.

De acordo com Zhang *et al.*<sup>76</sup> a recuperação da atividade da enzima álcool desidrogenase varia pouco com o aumento no tempo de contato entre 1 e 11 min. Entre 0 e 20 min de contato entre as proteínas do plasma sanguíneo e o Triton X-114, a razão de distribuição permaneceu constante (cerca de 0,23), demonstrando que o equilíbrio na extração foi alcançado. Após 20 min a razão de distribuição diminuiu, e alcançou 0,07 em 30 min. O fato pode ter ocorrido devido a uma possível desnaturação das proteínas pelos agregados micelares do surfactante após um tempo de contato maior. Assim, este tempo pode ser instantâneo. O valor da razão de distribuição diferenciou daqueles encontrados anteriormente, como, por exemplo, o da Figura 10, devido ao fato da utilização de bolsas de plasma distintas, as quais possivelmente possuem quantidades diferentes de um tipo específico de proteína.

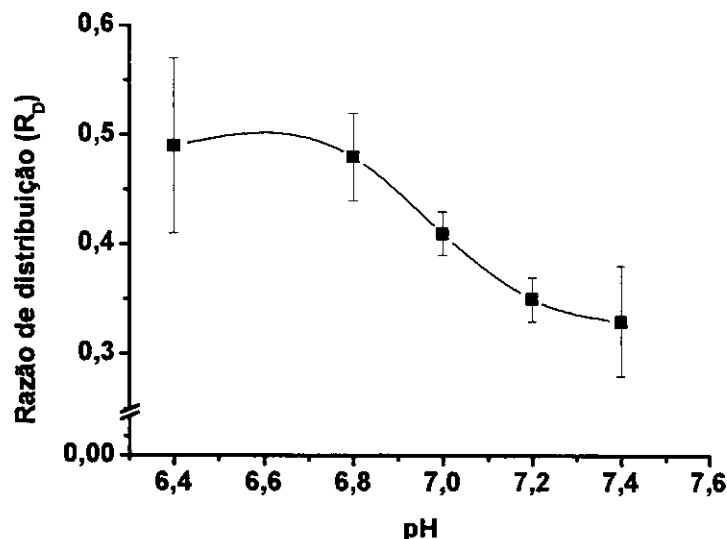
### 5.3.5. pH de extração

Poucas investigações têm sido reportadas na literatura sobre a dependência do pH na extração de proteínas por ponto nuvem<sup>1,77</sup>. Porém, a extração de proteínas é altamente dependente do pH do meio. De acordo com Hearn e Anspach<sup>78</sup>, o pH pode alterar a carga de grupos químicos localizados na cadeia lateral de aminoácidos levando a uma modificação na carga da rede global da proteína, alterando sua solubilidade. O número de grupos carregados sobre a superfície das moléculas protéicas muda com o pH, o qual induz a mudanças na estrutura<sup>79,80</sup>.

Silva *et al.*<sup>81</sup> verificaram um aumento no coeficiente de partição como uma função do pH para a glucose-6-fosfato e a hexoquinase. De acordo com os autores, a proteína carregada negativamente deve preferir a fase superior de um sistema de duas fases formado por polietilenoglicol (PEG) / fosfato a elevados valores de pH. Saitoh e Hinze<sup>69</sup> reportaram a extração de proteínas de membrana hidrofóbicas dentro de uma faixa de pH levemente ácida (5,5 – 6,5) usando o surfactante anfótero C<sub>9</sub>-APSO<sub>4</sub> (sulfato de 3-[nonil-dimetilamônio] propil), enquanto proteínas hidrofílicas não foram extraídas nessa faixa de pH.

As citações acima mostram que a variação no pH pode modificar a estrutura das proteínas, alterando a sua interação com os agregados micelares e, por consequência, a razão de distribuição. Assim, o efeito do pH foi avaliado dentro da faixa de pH fisiológico (6,4 – 7,4) de modo a estudar a extração das proteínas plasmáticas em um ambiente similar ao natural.

Segundo Selber *et al.*<sup>77</sup> a extração por ponto nuvem é fracamente afetada pelo pH. Como observado na Figura 12, as razões de distribuição situaram-se entre 0,49 e 0,33 para os valores de pH 6,4 e 7,4, respectivamente.



**Figura 12.** Razão de distribuição em função do pH (N = 3), utilizando 5% (m/v) de Triton X-114, 100  $\mu$ L de amostra, 10% (m/v) de NaCl e tempo de contato instantâneo.

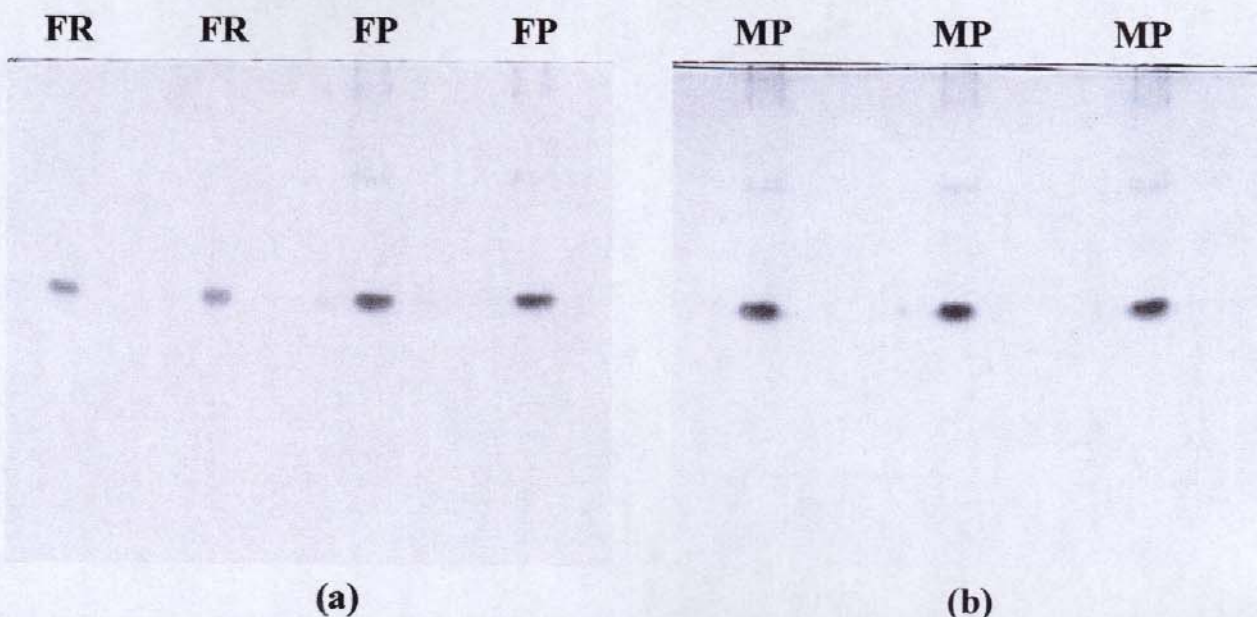
Nos valores de pH 6,4 e 6,8 não ocorreu uma variação significativa no valor da razão, o que pode indicar que no processo, o complexo proteína-micela é mais estável. Pelo perfil da curva apresentado, o pH ótimo seria o 6,6, mas, por comodidade, o pH foi fixado a 6,8 devido ao fato da posterior caracterização das proteínas por eletroforese, na qual a solução tampão de amostra é preparada também neste valor de pH.

Vale ressaltar que os valores da razão de distribuição variaram pouco, o que pode ser devido apenas a variações na força iônica.

#### **5.4. Eletroforese nativa descontínua em gel de poliacrilamida**

As proteínas das fases pobre e rica em surfactante do sistema otimizado (5% m/v de Triton X-114, 100  $\mu$ L de amostra, 10% m/v de NaCl, tempo de contato quase instantâneo e pH 6,8), bem como o material de partida (plasma sanguíneo na condição do sistema de separação de fases, mas, na ausência do surfactante) foram separadas por eletroforese nativa descontínua em gel de poliacrilamida para

caracterizar as proteínas com pI na faixa de  $\text{pH} < 7$ . O resultado da corrida eletroforética pode ser visualizado na Figura 13.



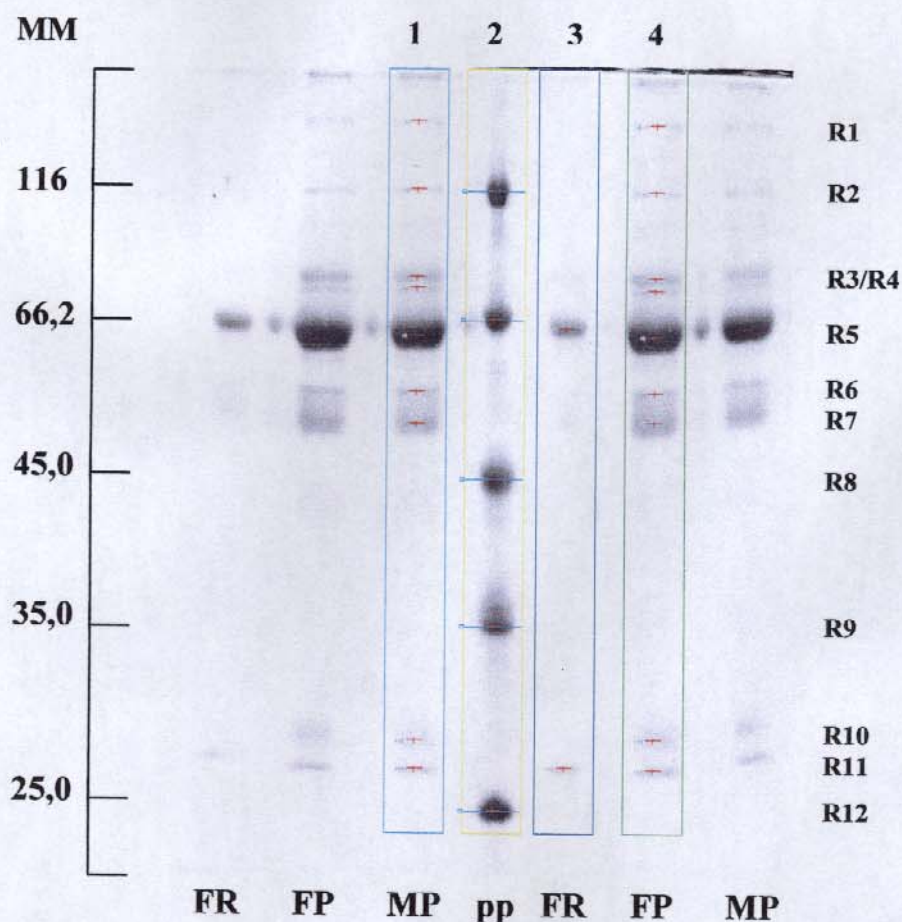
**Figura 13.** Eletroforese nativa descontínua em gel de poliacrilamida para as proteínas com pI na faixa de  $\text{pH} < 7$ . (a) fases pobre (FP) e rica (FR) em surfactante após a separação de fases (b) material de partida (MP).

Uma banda (possivelmente da albumina, cujo pI é em torno de 5,6<sup>82</sup>) foi visualizada em alta concentração nas fases pobre e rica em surfactante, bem como no material de partida. Quantidades baixíssimas de outras frações protéicas também foram observadas em outras regiões no material de partida e na fase pobre em surfactante. Assim, devido à pequena quantidade de bandas observadas, que pode ser uma limitação do corante utilizado, as proteínas e/ou frações protéicas presentes em ambas às fases foram caracterizadas por SDS-PAGE, para a separação das cadeias polipeptídicas.



### 5.5. Caracterização das proteínas por SDS-PAGE

As proteínas que migraram para a fase rica em surfactante e aquelas que permaneceram na fase pobre também foram caracterizadas por eletroforese do tipo SDS-PAGE. O gel obtido nas condições de extração otimizadas pode ser visualizado na Figura 14.



**Figura 14.** Corrida eletroforética SDS-PAGE nas condições de extração otimizadas. MM = massa molar (kDa); MP = material de partida; pp = padrão protéico de massa molar conhecida (de cima para baixo: 116; 66,2; 45,0; 35,0 e 25,0 kDa); FR = fase rica em surfactante; FP = fase pobre em surfactante. As descrições R1, R2, R3, etc., correspondem as bandas as quais as massas molares foram estimadas (vide Tabela 3).

Duas bandas foram observadas na fase rica em surfactante. Baixíssimas concentrações podem ser visualizadas em outras regiões, como por exemplo, em torno de 50-55 kDa. Além disso, observa-se que o processo se caracteriza por excluir proteínas na faixa de massa molar de aproximadamente 100 a 140 kDa, já que não se encontra qualquer banda nessa região e em concentrações mensuráveis.

As massas molares das frações protéicas, as quais são observadas na Figura 14 (de R1 a R12) foram estimadas. As colunas não identificadas correspondem a réplicas das outras colunas como está especificado na Figura 14. Estas não foram tratadas devido à distorção que ocorre nas extremidades do gel durante a corrida eletroforética e, assim, poderiam conduzir a erros na estimativa da massa molar. As massas molares das frações protéicas podem ser observadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Estimativa das massas molares (kDa) relativa à Figura 14. Coluna 1 = material de partida; coluna 2 = padrão protéico; coluna 3 = fase rica em surfactante; coluna 4 = fase pobre em surfactante.

| <b>Bandas</b> | <b>Coluna 1</b> | <b>Coluna 2</b> | <b>Coluna 3</b> | <b>Coluna 4</b> |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| R1            | 143             |                 |                 | 141             |
| R2            | 117             | 116             |                 | 116             |
| R3            | 82,8            |                 |                 | 82,4            |
| R4            | 78,7            |                 |                 | 77,6            |
| R5            | -               | 66,2            | 65,0            | -               |
| R6            | 56,6            |                 |                 | 56,5            |
| R7            | 52,4            |                 |                 | 52,5            |
| R8            |                 | 45,0            |                 |                 |
| R9            |                 | 35,0            |                 |                 |
| R10           | 28,8            |                 |                 | 28,9            |
| R11           | 27,3            |                 | 27,3            | 27,2            |
| R12           |                 | 25,0            |                 |                 |



Não foi determinada a massa molar da banda R5 das colunas 1 e 4 devido a alta concentração da fração protéica nessa região. Uma das proteínas pode ser atribuída à albumina, proteína de alta concentração encontrada no plasma sanguíneo (51-71% da proteína total<sup>83</sup>).

A banda correspondente às massas molares de 65,0 kDa, visualizada na fase rica em surfactante, pode ser atribuída a albumina, devido a facilidade de migração para a fase rica, face a sua alta concentração no plasma sanguíneo, como mencionado anteriormente. A outra fração da fase rica (27,3 kDa) corresponde a região de massas molares da apolipoproteína D e da imunoglobulina de cadeia leve. Devido à propriedade hidrofóbica da apolipoproteína D (proteína envolvida no transporte de lipídios), esta apresenta grande possibilidade de interação com os agregados micelares.

As frações protéicas visualizadas na Figura 14 correspondentes a fase pobre e ao material de partida (plasma sanguíneo na condição do sistema de separação de fases, mas, na ausência do surfactante), cujas massas molares foram estimadas, podem ser atribuídas à diversas proteínas (Tabela 4). As regiões de massas molares estimadas foram comparadas às massas molares de proteínas conhecidas por meio do banco de dados de proteínas de plasma sanguíneo humano (Expasy<sup>82</sup>).

A grande opção de possíveis proteínas identificadas para uma mesma região de massa molar deve-se ao fato dessas proteínas, embora com a mesma massa molar, possuírem ponto isoelétrico (pI) diferente. Assim, por meio da eletroforese em uma dimensão, não é possível identificá-las com maior precisão.

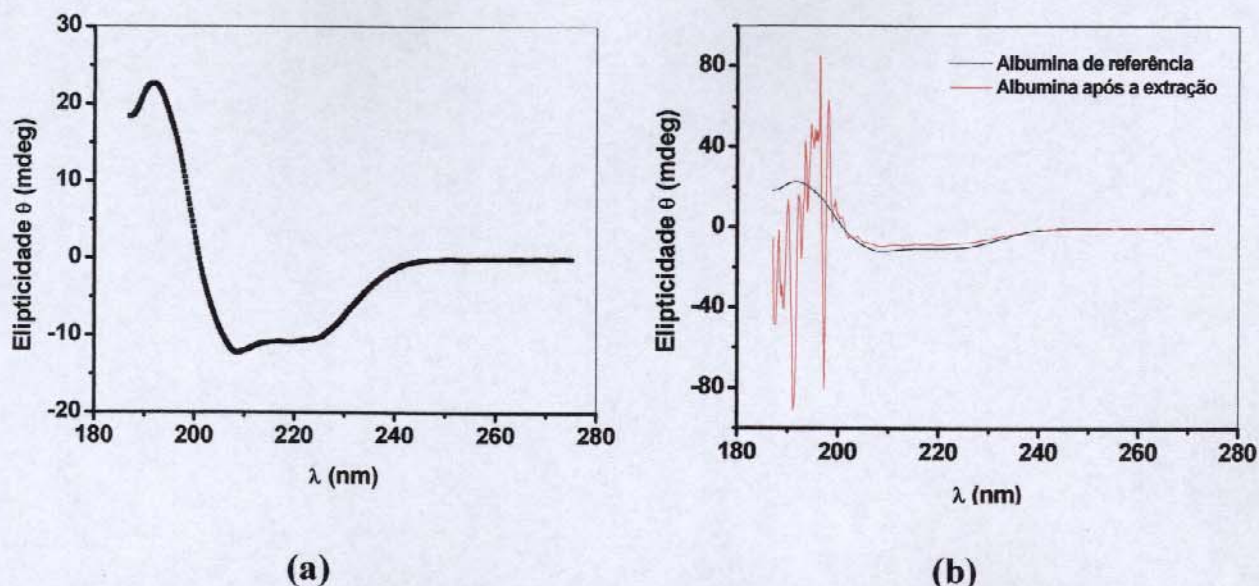
Vale ressaltar que outras frações protéicas de baixas concentrações não sensíveis ao corante azul brilhante de coomassie (0,2 – 0,5  $\mu\text{g}$ <sup>84</sup>) também podem ter sido separadas. Além disso, a faixa de massa molar de proteínas ou frações protéicas separadas por eletroforese foi de 116 – 25 kDa, podendo, portanto, exibir proteínas fora dessa faixa de massa molar que não foram visualizadas.

**Tabela 4.** Identificação das possíveis proteínas da amostra de partida (coluna 1) e da fase pobre em surfactante (coluna 2) após o ponto nuvem. MM = massa molar.

| Fração | MM (kDa) - Coluna 1 | MM (kDa) - Coluna 4 | Possível proteína                                                                                            |
|--------|---------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| R1     | 143                 | 141                 | Fora da faixa de massa molar do padrão – não confiável                                                       |
| R2     | 117                 | 116                 | Plasminogênio (contém angiostatina)                                                                          |
| R3     | 82,8                | 82,4                | Transferrina<br>Cadeia pesada de $\mu$ -imunoglobulina                                                       |
| R4     | 78,7                | 77,6                | Protombina (fator de coagulação II)<br>Tranferrina<br>Hemopexina                                             |
| R6     | 56,6                | 56,5                | $\alpha$ -1-antitripsina<br>$\alpha$ -1-antiquimotripsina<br>$\alpha$ -2-HS-glicoproteína                    |
| R7     | 52,4                | 52,5                | $\alpha$ -2-HS-glicoproteína<br>Glicoproteína rica em histidina<br>Cadeia pesada de $\gamma$ -imunoglobulina |
| R10    | 28,8                | 28,9                | Apolipoproteína D<br>Cadeia leve de imunoglobulina                                                           |
| R11    | 27,3                | 27,2                | Apolipoproteína D<br>Cadeia leve de imunoglobulina                                                           |

### 5.6. Dicroísmo circular

Devido ao fato da albumina ser considerada uma proteína globular lábil e modificar facilmente a sua estrutura conformacional<sup>51</sup>, ela foi escolhida para apontar possíveis mudanças na conformação das proteínas extraídas pela metodologia apresentada. A Figura 15 apresenta os espectros originais de dicroísmo circular para a ASB padrão e para a albumina extraída para a fase rica em surfactante.

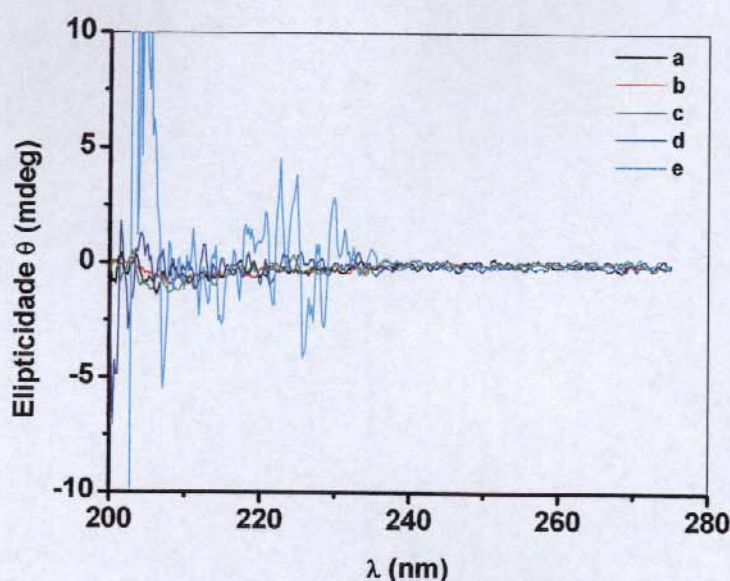


**Figura 15.** Espectros originais de dicroísmo circular. (a) ASB padrão  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L (b) ASB  $1,0 \times 10^{-6}$  mol/L (em preto) e ASB  $0,34 \times 10^{-6}$  mol/L extraída para a fase rica em surfactante (em vermelho).

A estrutura  $\alpha$ -hélice é caracterizada pelos picos negativos de magnitude similar a 222 e 208 nm<sup>85</sup>. A região próxima a 195 nm, caracterizada por um pico positivo de alta magnitude pode ser atribuída em maior proporção, a estrutura  $\beta$ -pregueada<sup>49</sup> (Figura 15a). Ocorreram fortes interferências no espectro da albumina extraída para a fase rica em surfactante (Figura 15b) na região de 187 a 200 nm, que pode ser devido a resíduos de Triton X-114 que se agregaram às proteínas no momento da precipitação.

A Figura 16 apresenta os espectros originais de dicroísmo circular em diferentes concentrações de Triton X-114. O surfactante não apresenta sinal significativo no espectro de dicroísmo circular entre 200 e 275 nm para concentrações menores que  $2 \times 10^{-3}$  mol/L, podendo indicar que o espectro observado nessa região para a Figura 15b corresponde apenas ao espectro da albumina devido ao perfil das curvas do Triton X-114.





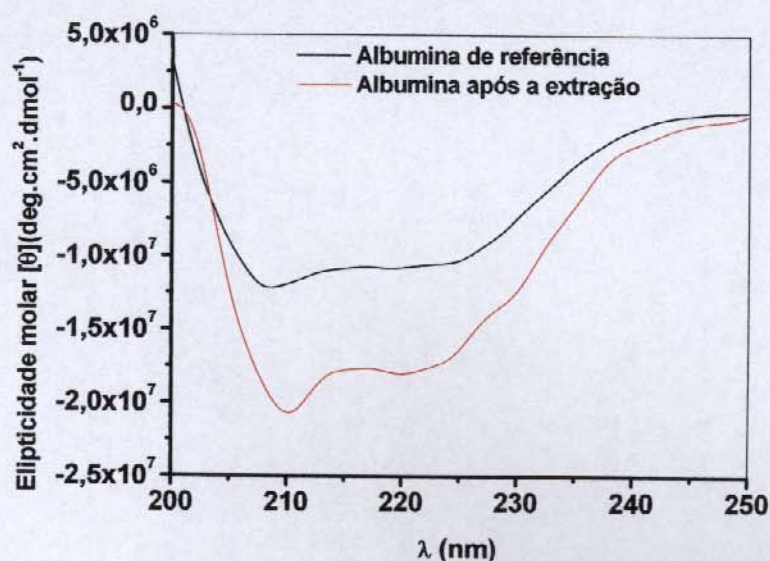
**Figura 16.** Espectros originais de dicroísmo circular para diferentes concentrações de Triton X-114 dissolvido em solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol/L / NaOH 0,1 mol/L pH 6,8. (a)  $1 \times 10^{-6}$  mol/L; (b)  $1 \times 10^{-5}$  mol/L; (c)  $1 \times 10^{-4}$  mol/L; (d)  $1 \times 10^{-3}$  mol/L; (e)  $2 \times 10^{-3}$  mol/L.

Assim, devido a interferências abaixo de 200 nm, apenas a região de 200 a 250 nm foi avaliada para indicar possíveis mudanças na estrutura secundária da albumina. No entanto, convém ressaltar que a confiabilidade na estimativa da porcentagem das estruturas secundárias é estreitamente reduzida quando a faixa de comprimento de onda é limitada. O gráfico em escala expandida dessa região, convertido para elipticidade molar (item 4.5.10), pode ser visualizado na Figura 17. As concentrações do padrão de albumina e da albumina extraída para a fase rica em surfactante são de  $1,0 \times 10^{-6}$  e  $0,34 \times 10^{-6}$  mol/L, respectivamente.

Utilizando o programa Model SSE-338, a porcentagem de  $\alpha$ -hélice obtida por meio dos espectros acima foi cerca de 79% para a albumina de referência e 66% para a albumina extraída para a fase rica em surfactante. Essa mudança na porcentagem de  $\alpha$ -hélice pode indicar mudanças na estrutura secundária da proteína. Segundo De *et al.*<sup>85</sup> a exposição de resíduos hidrofóbicos conduz a rupturas de  $\alpha$ -hélices para dar origem a estruturas desordenadas mais abertas,



randômicas, que ficam expostas ao solvente. Essas estruturas apresentam fortes bandas negativas acima de 200 nm, que pode variar de sistema para sistema<sup>49</sup>.



**Figura 17.** Espectros de dicroísmo circular em elipticidade molar entre 200-250 nm para uma solução de ASB padrão (em preto) e para a ASB extraída para a fase rica em surfactante (em vermelho).

Convém ressaltar que a estimativa na estrutura secundária de uma proteína pode variar de programa para programa, e uma estimativa precisa é obtida na utilização de vários deles. Infelizmente, devido à limitação da faixa de comprimento de onda no espectro de DC para a presente amostra, muitos programas<sup>86</sup> não aceitaram o conjunto de dados, e a estimativa ficou limitada. No entanto, observa-se mudanças no espectro de DC (Figura 17) da albumina após ser submetida a metodologia apresentada e conclui-se que esta apresentou mudanças na sua estrutura conformacional. O fato pode indicar uma limitação ao uso de possíveis proteínas fracionadas e/ou purificadas pelo método de separação de fases utilizando micelas com surfactantes, inclusive para as proteínas do plasma sanguíneo.

## 6. CONCLUSÕES

A escolha do surfactante na metodologia empregando ponto nuvem para a extração de proteínas se baseia naqueles não desnaturantes, aos quais inclui o grupo de surfactantes que separam fases a baixas temperaturas e/ou que apresentam fortes mudanças nas propriedades físicas na presença de aditivos. Na metodologia apresentada, a adição do cloreto de sódio foi de extrema importância, uma vez que acelerou o processo de separação de fases e diminuiu a temperatura de formação do ponto nuvem do Triton X-114, sendo, portanto, possível realizar o processo a temperatura ambiente (25 °C).

A extração líquido-líquido de sistemas micelares aquosos de duas fases é uma alternativa simples, rápida e versátil para a extração de proteínas de plasma sanguíneo, podendo ser aplicada a outras amostras biológicas complexas. Além disso, apresenta baixo custo e baixo consumo médio de reagentes: 8 mL da solução do surfactante, 100 µL de amostra e algumas miligramas de cloreto de sódio (cerca de oitenta centavos de reais cada separação).

Os valores das razões de distribuição encontrados foram menores que 1, indicando que o sistema não apresenta caráter pré-concentrador, mas pode ser usado para outra finalidade, como o fracionamento protéico. Embora o processo não seja capaz de concentrar uma única fração protéica na fase rica em surfactante, algumas frações migram para a fase superior, enquanto outras permanecem na fase inferior. Assim, temos um sistema de separação, uma vez que dividimos um sistema protéico complexo em duas grandes frações. Além disso, o presente processo se caracteriza por excluir proteínas na faixa de massa molar de aproximadamente 100 a 140 kDa, as quais não se encontram concentrações mensuráveis de frações protéicas nessa região de massa molar. Assim, o processo apresenta uma alternativa a uma das etapas da purificação protéica convencional.

A condição ótima para a extração e o fracionamento de proteínas totais do plasma sanguíneo foi:

- 5% (m/v) de Triton X-114;
- 100  $\mu$ L de amostra;
- 10% (m/v) de NaCl;
- Tempo de contato desnecessário entre as proteínas e os agregados micelares;
- Solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol/L / NaOH 0,1 mol/L pH = 6,8.

Uma das maiores vantagens do presente processo em relação aos outros tradicionalmente utilizados para o fracionamento de proteínas é a utilização em larga escala devido ao curto período de tempo requerido para alcançar o equilíbrio entre as fases. O uso de sais inorgânicos requer várias etapas, onde a remoção desses sais é realizada por meio de diálises exaustivas, uma vez que se encontram envolvidas altíssimas concentrações salinas. Já o uso de solventes orgânicos requer um longo período para alcançar o equilíbrio entre as fases. Além disso, os solventes orgânicos são voláteis, inflamáveis e alguns são tóxicos apresentando riscos para o operador e limitando o seu uso para processos em larga escala.

Uma limitação do processo proposto é a posterior remoção do surfactante, e uma possível desnaturação das proteínas, indicada pelas análises de dicroísmo circular. Esta última, apesar de não conclusiva, pode limitar a utilização das proteínas fracionadas para aquelas que não requerem a estrutura nativa, tais como, o uso de proteínas como marcadores para estimar as massas molares nas técnicas eletroforéticas desnaturantes.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Embora o fracionamento de misturas protéicas utilizando micelas obtidas a partir de surfactantes é um processo de grande utilidade, principalmente no ramo

industrial, vale ressaltar que estudos futuros poderiam ser focalizados nos seguintes aspectos:

- Aprofundamentos sobre os mecanismos da separação, em relação a mudanças estruturais na proteína, os quais são necessários para melhor compreensão do processo.
- Eletroforese em duas dimensões, como, por exemplo, 2D PAGE, é necessária para melhor identificação das cadeias polipeptídicas separadas.
- Utilizando uma proteína de referência, o processo proposto poderia ser comparado a técnicas de separação convencionais, como, por exemplo, a cromatografia de filtração em gel, para ressaltar suas vantagens.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Sánchez-ferrer, A.; Pérez-Gilabert, M.; Núñez, E.; Bru, R.; García-Carmona, F. Triton X-114 phase partitioning in plant protein purification. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 75-83, 1994.
- [2] Righetti, P. G. Bioanalysis: Its past, present and some future. *Electrophoresis*, v. 25, n. 14, p. 2111-2127, 2004.
- [3] Burnof, T.; Goubran, H.; Radosevich, M. Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large-scale fractionation of human plasma. *Journal of Chromatography*, v. 715, p. 65-80, 1998.
- [4] Shinoda, K.; The formation of micelles. In: Shinoda, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B.-I.; Isemura, T. *Colloidal surfactants: some physicochemical properties*. New York: Academic Press, 1963. p. 1-96.
- [5] Pelizzetti, E.; Pramauro, E. Analytical applications of organized molecular assemblies. *Analytica Chimica Acta*, v. 169, p. 1-29, 1985.
- [6] Corti, M.; Minero, C.; Degiorgio, V. Cloud point transition in nonionic micellar solutions. *Journal of Physical Chemistry*, v. 88, n. 2, p. 309-317, 1984.
- [7] Dow surfactants. Surfactant basics. Disponível em: <http://www.dow.com/surfactants/faq/>. Acesso em 29/03/2005.



- [8] Hinze, W. L.; Pramauro, E. A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud-point extractions): theory and applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 2, p. 133-177, 1993.
- [9] Sanz-Medel, A.; Campa, M. R. F.; Gonzalez, E. B.; Fernandez-Sanchez, M. L. Organised surfactant assemblies in analytical atomic spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 54, n. 2, p. 251-287, 1999.
- [10] McIntire, G. L. Micelles in analytical chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v.21, n. 4, p.257-278, 1990.
- [11] Watanabe, H.; Tanaka, H. Nonionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid-extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta*, v. 25, n. 10, p. 585-589, 1978.
- [12] Bezerra, M. D.; Conceição, A. L. B.; Ferreira, S. L. C. Doehlert matrix for optimisation of procedure for determination of nickel in saline oil-refinery effluents by use of flame atomic absorption spectrometry after preconcentration by cloud-point extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, n. 3, p. 798-803, 2004.
- [13] Borges, D. L. G.; da Veiga, M. A. M. S.; Frescura, V. L. A.; Welz, B.; Curtius, A. J. Cloud-point extraction for the determination of Cd, Pb and Pd in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ir or Ru as permanent modifiers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 18, n. 5, p. 501-507, 2003.
- [14] Nascentes, C. C.; Arruda, M. A. Z. Cloud point formation based on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and preconcentration. *Talanta*, v. 61, n. 6, p. 759-932, 2003.
- [15] Sirimanne, S. R.; Barr, J. R.; Patterson, D. G. Jr. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in human serum by combined micelle-mediated extraction (cloud-point extraction) and HPLC. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 9, p. 1556-1560, 1996.
- [16] Nascentes, C. C.; Arruda, M. A. Z. Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pré-concentração. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 483-489, 2002.
- [17] Oliveros, M. C. C.; de Blas, O. J.; Pávon, J. L. P.; Cordero, B. M. Cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometry: application to the determination of nickel and zinc. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 13, n. 6, p. 547-550, 1998.

- [18] Coelho, L. M.; Arruda, M. A. Z. Preconcentration procedure using cloud point extraction in the presence of electrolyte for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, n. 5, p. 743-748, 2005.
- [19] Sicilia, D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. Evaluation of the factors affecting extraction of organic compounds based on the acid-induced phase cloud point approach. *Analytica Chimica Acta*, v. 460, n. 1, p. 13-22, 2002.
- [20] Li, J.-L.; Chen, B.-H. Equilibrium partition of polycyclic aromatic hydrocarbons in a cloud-point extraction process. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 263, n. 2, p. 625-632, 2002.
- [21] Gündüz, U. Optimization of bovine serum albumin partition coefficient in aqueous two-phase systems. *Bioseparation*, v. 9, n. 5, p. 277-281, 2001.
- [22] Tani, H.; Suzuki, Y.; Matsuda, A.; Kamidate, T. Enhancement of the excluded-volume effect in protein extraction using triblock copolymer-based aqueous micellar two-phase systems. *Analytica Chimica Acta*, v. 429, n. 2, p. 301-309, 2001.
- [23] Liu, C. L.; Kamei, D. T.; King, J. A.; Wang, D. I. C.; Blankschtein, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. *Journal of Chromatography B*, v. 711, n. 1-2, p. 127-138, 1998.
- [24] Bordier, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 4, p. 1604-1607, 1981.
- [25] Tiruppathi, C.; Alpers, D. H.; Seetharam, B. Phase separation of rat intestinal brush border membrane proteins using Triton X-114. *Analytical Biochemistry*, v. 153, n. 2, p. 330-335, 1986.
- [26] Terstappen, G. C.; Geerts, A. J.; Kula, M. R. The use of detergent-based aqueous two-phases systems for the isolation of extracellular proteins: purification of a lipase from pseudomonas cepacia. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 16, n. 3, p. 228-235, 1992.
- [27] Rukhadze, M. D.; Tsagareli, S. K.; Sidamonidze, N. S.; Meyer, V. R. Cloud-point extraction for the determination of the free fraction of antiepileptic drugs in blood plasma and saliva. *Analytical Biochemistry*, v. 287, n. 2, p. 279-283, 2000.
- [28] Rangel-Yagui, C. O.; Lam, H.; Kamei, D. T.; Wang, D. I. C.; Pessoa Jr., A.; Blankschtein. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, n. 4, p. 445-456, 2003.

- [29] Saitoh, T.; Hinze, W. L. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. *Talanta*, v. 42, n. 1, p. 119-127, 1995.
- [30] Nikas, Y. J.; Liu, C. L.; Srivastava, T.; Abott, N. L.; Blankschtein, D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. *Macromolecules*, v. 25, n. 18, p. 4797-4806, 1992.
- [31] Sirimanne, S. R.; Patterson, D. G. Jr.; Ma, L.; Justice, J. B. Jr. Application of cloud-point extraction-reversed-phase high-performance liquid chromatography: a preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood. *Journal of Chromatography B*, v. 716, n. 1-2, p. 129-137, 1998.
- [32] Man, B. K. W.; Lam, M. H. W.; Lam, P. K. S.; Wu, R. S. S.; Shaw, G. Cloud-point extraction and preconcentration of cyanobacterial toxins (microcystins) from natural waters using a cationic surfactant. *Environmental Science & Technology*, v. 36, n. 18, p. 3985-3990, 2002.
- [33] Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. (tradução: Simões, A. A.; Lodi, W. R. N.). *Princípios de bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 425 p.
- [34] Garfin, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. In: Deutscher M. P. (ed.). *Methods in Enzymology Guide to Protein Purification*. California: Academic Press, 1990. V.182. p. 425-441.
- [35] Jacobs, D. S.; Kasten, B. L.; DeMott, W. R. Wolfson, W. L. *Laboratory Test Handbook*. 2. ed. Hudson (Cleveland): Lexi-Comp Inc, London: Williams & Wilkins, 1990. p. 316.
- [36] Jiang, L.; He, L.; Fountoulakis, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1023, n. 2, p. 317-320, 2004.
- [37] Zaia, D. A. M; Zaia, C. T. B. V. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.
- [38] Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.
- [39] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

- [40] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- [41] Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76- 85, 1985.
- [42] Zaia, D. A. M.; Verri, W. A.; Zaia, C. T. B. V. Determination of total proteins in several tissues of rat: a comparative study among spectrophotometric methods. *Microchemical Journal*, v. 64, n. 3, p. 235-239, 2000.
- [43] Sapan, C. V.; Lundblad, R. L.; Price, N. C. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, p. 99-108, 1999.
- [44] Fazekas de St. Groth, S.; Webster, R. G.; Datyner, A. 2 new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 71, n. 2, p. 377-391, 1963.
- [45] Sedmak, J. J.; Grossberg, S. E. Rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, v. 79, n. 1-2, p. 544-552, 1977.
- [46] Demoreno, M. R.; Smith, J. F.; Smith, R. V. Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 75, n. 9, p. 907-911, 1986.
- [47] Compton, S. J.; Jones, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.
- [48] Fountoulakis, M.; Juranville, J. F.; Manneberg, M. Comparison of the coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantification assays, using nonglycosylated proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 24, n. 3-4, p. 265-274, 1992.
- [49] Snatzke, G. Circular dichroism: an itroduction. In: Nakanishi, K. (ed.); Berova, N. (ed.); Woody, R. W. (ed.). *Circular dichroism*. New York: Wiley-VCH, 1994. p. 1-38.
- [50] Tatford, O. C.; Gomme, P. T.; Bertolini, J. Analytical techniques for the evaluation of liquid protein therapeutics. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 40, p. 67-81, 2004.
- [51] Efimova, Y. M.; Wierczinski, B.; Haemers, S.; van Well, A. A. Changes in the secondary structure of proteins labeled with  $^{125}\text{I}$ : CD spectroscopy and enzymatic

activity studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v. 264, n. 1, p. 91-96, 2005.

[52] Alfenas, A. C.; Brune, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: Alfenas, A. C. (ed.). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. p. 151-182.

[53] Tavares, M. F. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química nova*, v. 19, n. 2, p.173-181, 1996.

[54] Longsworth, L. G. Moving boundary electrophoresis – theory. In: Bier, M. (Ed.). *Electrophoresis: theory, methods, and applications*. New York: Academic Press, 1959. p.92-136.

[55] Shaw, D. J. *Electrophoresis*. London: Academic Press Inc., 1969. 144 p.

[56] Silva Jr, J. G. *Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático*. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 125 p.

[57] Wharton, D. C.; McCarty, R. E. *Experiments and methods in biochemistry*. New York: Macmillan Company, 1972. 350 p.

[58] Andrews, A. T. *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1986. 452 p.

[59] Hames, B. D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames, B. D. (Ed.); Rickwood, D. (Ed.). *Gel eletrophoresis of proteins: a practical approach*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1986. p. 1-147.

[60] Gordon, A. H. Applicability of starch and acrylamide zone electrophoresis. In: Work, T. S. (Ed.); Work, E. (Ed.). *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1975. p. 7-33.

[61] Chiou, S. H.; Wu, S. H. Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. *Analytica Chimica Acta*, v. 383, n. 1-2, p. 47-60, 1999.

[62] Reynolds, J. A., Tanford, C. Gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 245, n. 19, p. 5161-5167, 1970.

[63] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

[64] Gu, T.; Galera-Gómez P. A. Clouding of Triton X-114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants. *Colloids and Surfaces A*, v. 104, n. 2-3, p. 307-312, 1995.

- [65] Casero, I.; Sicilia, D.; Rubio, S.; Perez-Bendito, D. An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds. *Analytical Chemistry*, v. 71, n. 20, p. 4519-4526, 1999.
- [66] Ajith, S.; Rakshit, A. K. Effect of NaCl on a nonionic surfactant microemulsion system. *Langmuir*, v. 11, n. 4, p. 1122-1126, 1995.
- [67] Werck-Reichhart, D.; Benveniste, I.; Teutsch, H.; Durst, F.; Gabriac, B. Glycerol allows low-temperature phase separation of membrane proteins solubilized in Triton X-114: application to the purification of plant cytochromes P-450 and b<sub>5</sub>. *Analytical Biochemistry*, v. 197, n. 1, p. 125-131, 1991.
- [68] Gu, T.; Qin, S.; Ma, C. The effect of electrolytes on the cloud point of mixed solutions of ionic and nonionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 127, n. 2, p. 586-588, 1989.
- [69] Saitoh T.; Hinze, W. L. Concentration of hydrophobic organic compounds and extraction of protein using alkylammoniosulfate zwitterionic surfactant mediated phase separations (cloud point extractions). *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 21, p. 2520-2525, 1991.
- [70] Shott, H.; Royce, A. E.; Han, S. K. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 98, n. 1, p. 196-201, 1983.
- [71] Fricke, B. Quantitative determination of zwitterionic detergents using salt-induced phase separation of Triton X-100. *Analytical Biochemistry*, v. 281, n. 2, p. 144-150, 2000.
- [72] Barraclough, D.; Obenland, D.; Laing, W.; Carroll, T. A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples. *Postharvest Biology and Technology*, v. 32, n. 2, p. 175-181, 2004.
- [73] Terstappen, G. C.; Kula, M.-R. Selective extraction and quantitation of polyoxyethylene detergents and its application in protein determination. *Analytical Letters*, v. 23, n. 12, p. 2175-2193, 1990.
- [74] Saito, S. Polymer-surfactant interactions. In: Schick, M. J. (ed.). *Nonionic surfactants: physical chemistry*. New York: Marcel Dekker, 1987. V. 23. p. 881-926.
- [75] Morén, A. K.; Khan, A. Phase equilibria of an anionic surfactant (sodium dodecyl sulfate) and an oppositely charged protein (lysosyme) in water. *Langmuir*, v. 11, n. 10, p. 3636-3643, 1995.

- [76] Zhang, T. X.; Liu, H. Z.; Chen, J. Y. Extraction of yeast alcohol dehydrogenase using reversed micelles formed with CTAB. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 75, n. 9, p. 798-802, 2000.
- [77] Selber, K.; Collén, A.; Hyytiä, T.; Penttilä, M.; Tjerneld, F.; Kula, M. R. Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems. *Bioseparation*, v. 10, n. 4-5, p. 229-236, 2002.
- [78] Hearn, M. T. W.; Anspach, B. Separation process. In: Asenjo, J. A. *Separation processes in biotechnology*. New York: Marcell Dekker, 1990. V. 9. p. 3-64.
- [79] Gutenwik, J.; Nilsson, B.; Axelsson, A. Determination of protein diffusion coefficients in agarose gel with a diffusion cell. *Biochemical Engineering Journal*, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2004.
- [80] Gu, Y. S.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Influence of pH and *i*-carrageenan concentration on physicochemical properties and stability of  $\beta$ -lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 11, p. 3626-3632, 2004.
- [81] da Silva, D. P.; Pontes, M. Z. R.; de Souza, M. A.; Vitolo, M.; Silva, J. B. D. E.; Pessoa-Junior, A. Influence of pH on the partition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in aqueous two-phase system. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 3, p. 196-201, 2002.
- [82] Expasy. Swiss-2DPAGE: protein list for plasma (plasma\_human). Disponível em <http://bo.expasy.org>. Acesso em 06/01/2005.
- [83] Putnam, R. W. Alpha, beta, gamma, omega - the roster of the plasma proteins. In: Putnam, R. W. (ed.). *The plasma proteins: structure, function, and genetic control*. 2<sup>nd</sup> edition, New York: Academic Press, 1975. V. I, p. 58-131.
- [84] Dunn, M. J.; Corbett, J. M. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, v. 271, p. 177-203, 1996.
- [85] De, S.; Girigoswami, A.; Das, S. Fluorescence probing of albumin-surfactant interaction. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 285, n. 2, p. 562-573, 2005.
- [86] Dichroweb. Centre for protein and membrane structure and dynamics. Disponível em <http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>. Acesso em 21/06/2005.