JOSÉ SEBASTIÁN LÓPEZ VÉLEZ

**EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO NA PRECIPITAÇÃO DE
LISOZIMA USANDO SUCCINATO, TARTRATO E CITRATO DE
SÓDIO**

São Paulo

2016

JOSÉ SEBASTIÁN LÓPEZ VÉLEZ

**EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO NA PRECIPITAÇÃO DE
LISOZIMA USANDO SUCCINATO, TARTRATO E CITRATO DE
SÓDIO**

Tese apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

São Paulo

2016

JOSÉ SEBASTIÁN LÓPEZ VÉLEZ

**EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO NA PRECIPITAÇÃO DE
LISOZIMA USANDO SUCCINATO, TARTRATO E CITRATO DE
SÓDIO**

Tese apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Engenharia
Química

Orientador: Prof. Dr. Pedro de
Alcântara Pessoa Filho

São Paulo

2016

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catlogação-na-publicação

VÉLEZ, JOSÉ SEBASTIÁN LÓPEZ
EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO NA PRECIPITAÇÃO DE LISOZIMA
USANDO SUCCINATO, TARTRATO E CITRATO DE SÓDIO / J. S. L. VÉLEZ --
versão corr. -- São Paulo, 2016.
109 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia Química.

1.CE629.1.2.7.6 2.CE629.1.2.3.1 I.Universidade de São Paulo. Escola
Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

En memoria de mi Padre Alberto Fernán López Macías, cuyo amor, cariño y confianza hicieron posible este trabajo..."La eternidad esta en nuestras manos. Vive de tal manera que cuando te vayas, mucho de ti quede aun en aquellos que tuvieron la buenaventura de encontrarte". (Apunte encontrado en un cuaderno personal)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer infinitamente a meu pai Alberto Fernán López Macias por toda sua dedicação e amor em vida, a minha mãe Gloria María Vélez Morales e meu irmão Juan Mateo López Vélez por todo seu amor, compreensão e apoio nesta nossa aventura de vida.

Eu quero agradecer de maneira especial a meu orientador neste projeto de doutorado o Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho, por compartilhar todos os seus valiosos conhecimentos durante esta caminhada, que têm sido fundamentais em minha formação profissional e na obtenção dos objetivos deste trabalho, além de toda sua confiança e paciência que têm feito de mim uma melhor pessoa.

À Universidade de São Paulo e ao departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica pela oportunidade e apoio em todos os níveis para a elaboração e finalização deste projeto de doutorado.

Ao Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni pelo apoio científico e humano que têm sido essenciais na construção deste estudo.

As funcionárias e amigas Andréa da Silva e Orlinda Azevedo, pela ajuda profissional, e acima de tudo pelas boas conversas.

A todo o pessoal do GenBio pela parceria, contribuições e todos os bons momentos compartilhados.

Aos meus amigos e amigas, Wesley Marques, Rafael Ferraz, Pedro Henrique Oliveira, Luís Mercier, Cristian Guacaneme, Valentina Espinel, Jairo Queiroz, Carolina López, Alejandra Sanchez, Adrian Castaño, Cristian Triana, Luis Helmer Orozco e muitos outros que aqui não ficam, pelo companheirismo, alegria, lições e os bons momentos.

A CAPES pelo financiamento e apoio econômico direto deste trabalho. Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro à pesquisa.

Ao Brasil por me deixar morar nestas belas terras, à Colômbia por minhas origens e ao Universo pela minha existência, Obrigado!

A natureza é uma representação infinita de si mesma

RESUMO

A precipitação e cristalização de proteínas são operações unitárias amplamente utilizadas na indústria biotecnológica. A formação de precipitado nestas operações é muitas vezes atingida por meio da adição de um sal que diminui a solubilidade da proteína, ou seja, o chamado fenômeno de *salting-out*. A principal informação para o estudo da precipitação e da cristalização é o diagrama de fases, em que a solubilidade da proteína é apresentada em função das variáveis do sistema (temperatura, pH, concentração de sal). Outra medida importante é o segundo coeficiente virial, que é uma medida indireta da interação intermolecular. A combinação de ambas as informações é fundamental para a identificação das condições em que fases cristalina ou amorfa são obtidas. O equilíbrio sólido-líquido da lisozima de clara de ovo de galinha em soluções aquosas contendo sais biodegradáveis (succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio) foi estudado por meio da determinação da solubilidade da proteína e do segundo coeficiente virial em função da força iônica. Os dados experimentais do segundo coeficiente virial em função da força iônica foram medidos por meio de cromatografia de auto-interação. Estes dados foram correlacionados por modelos apropriados. As informações de solubilidade e do segundo coeficiente virial da proteína foram combinadas para gerar condições experimentais adequadas na identificação da janela de cristalização, i.e., as condições em que uma fase cristalina é obtida. Uma matriz do tipo placa de cultivo foi usada para os experimentos de cristalização. Os resultados experimentais mostraram que as regiões das fases cristalina e amorfa no diagrama de fases são funções simultâneas do segundo coeficiente virial, como parâmetro termodinâmico, e da supersaturação, como parâmetro cinético. Os três sais foram capazes de induzir o efeito *salting-out*, sendo o succinato de sódio o sal mais eficaz na diminuição da solubilidade da lisozima, seguido pelo tartarato de sódio e pelo citrato de sódio. No caso da lisozima, cristais foram obtidos em soluções de succinato de sódio e tartarato de sódio, e as condições nas quais a fase cristalina é formada foram identificadas; no entanto, para o citrato de sódio somente fase amorfa foi observada. Em conjunto, estes resultados mostram que estes sais biodegradáveis são agentes precipitantes promissores.

ABSTRACT

The precipitation and crystallization of proteins are unit operations widely used in the biotechnology industry. The formation of a solid phase in these operations is often achieved by adding a salt that lowers the protein solubility, the so-called *salting-out* phenomenon. The key information to study precipitation or crystallization is the phase diagram, in which the solubility of a protein is presented as a function of system variables (temperature, pH, salt concentration). Another important parameter is the second virial coefficient, which is an indirect measure of intermolecular interactions. The combination of both kinds of information is fundamental to identify the conditions in which crystal and amorphous phases can be formed. The solid-liquid equilibrium of hen egg-white lysozyme in aqueous solutions containing biodegradable salts, viz., sodium citrate, sodium tartrate and sodium succinate, was studied by determining both the protein solubility and the second virial coefficient as a function of ionic strength. Experimental data for second virial coefficient as a function of ionic strength were obtained through self-iteration chromatography. These data were correlated by appropriate models. The protein solubility and the second virial coefficient information were combined to generate adequate experimental conditions to identify the so-called crystallization slot, i.e., the conditions in which a crystalline solid phase is obtained. A plate matrix disposition was used for the crystallization experiments. The experimental results show that the crystal and amorphous regions in the phase diagram depend simultaneously on the second virial coefficient, as a thermodynamic parameter, and on the supersaturation ratio, as a kinetic parameter. All these salts were able to induce salting-out, being sodium succinate the most effective one in decreasing lysozyme solubility, followed by sodium tartrate and sodium citrate. For lysozyme in sodium succinate and sodium tartrate solutions, the conditions for which a crystal phase is formed were identified; however, for sodium citrate only amorphous solid phases were observed. Overall, these results show that these biodegradable salts are promising precipitating agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da interação binária de dois corpos de proteína com relação a um eixo de referencia numa distância r_{12} em meio de íons r_{ion} (Adaptação (NEAL; ASTHAGIRI; LENHOFF, 1998))	33
Figura 2	Estruturas moleculares: (a) succinato de sódio; (b) tartarato de sódio; (c) citrato de sódio	41
Figura 3	Esquema experimental para a obtenção do tempo de equilíbrio na cristalização / precipitação da lisozima em soluções de cloreto de sódio a 25°C e pH de 4,38, 7,00 e 10,20 e na medição da solubilidade da lisozima em soluções de cloreto de sódio a 25°C e pH 7,31 e 10,60	45
Figura 4	Esquema experimental para a obtenção da solubilidade da lisozima em soluções de sal a 25°C e pH constante	47
Figura 5	(a) FPLC marca ÄKTA referência UPC-900 / P920, (b) Coluna de cromatografia líquida HR 5/5 empacotada com resina CNBr activate sepharose 4B contendo lisozima ligada	49
Figura 6	Esquema experimental para a obtenção do volume de retenção (VR) no cálculo do segundo coeficiente virial da lisozima em soluções de sal a	52

25°C e pH 8,50

Figura 7	Matriz experimental com o B22 na horizontal e So na vertical, do tipo prato de cultivo (tissue plate), com 96 poços (48 x duplicata: linha de divisão vermelha), 200 µL x poço	55
Figura 8	Esquema experimental para a obtenção dos dados da janela de cristalização da lisozima em soluções de succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio a 25°C e pH 8,50	56
Figura 9	Perfis de concentração de lisozima em função do tempo da fase sobrenadante em soluções de cloreto de sódio a 25°C e pH constante de 7,00, 4,38 e 10,2 ((----): guias para os olhos)	58
Figura 10	Solubilidade da lisozima em soluções com cloreto de sódio a 25°C e pH constante de 7,00 e 10,00 ((----): guias para os olhos)	60
Figura 11	Solubilidade de lisozima em soluções de sais biodegradáveis a 25°C e pH constante: (a) succinato de sódio, (b) tartarato de sódio, (c) citrato de sódio ((·····): guias para os olhos)	62
Figura 12	Solubilidade de lisozima em função do pH a 25°C e força iônica constante: (▲) succinato de sódio, (■) tartarato de sódio, (●) citrato de sódio, ((·····): guias para os olhos)	64
Figura 13	Solubilidade linearizada da lisozima em função	69

da força iônica em soluções dos sais a 25°C e pH constante: (a) cloreto de sódio, (b) succinato de sódio, (c) tartarato de sódio, (d) citrato de sódio e diferentes pH

Figura 14	Segundo coeficiente virial de lisozima em função da força iônica em soluções dos sais a 25°C e pH 8,50: (a) succinato de sódio, (b) tartarato de sódio, (c) citrato de sódio. Modelos: Franco et al. (FRANCO; FILHO, 2011) (—), Hass et al. (HAAS; DRENTH; WILSON, 1999) (-----), Guo et al. (GUO et al., 1999) (·····), Ruppert et al. (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001) (·-·-·-·-). Desvio padrão (barras)	72
Figura 15	Janela de cristalização da sobressaturação em função do segundo coeficiente virial a 25°C e pH 8,50: (a) succinato de sódio e (b) o tartarato de sódio; (x) nenhuma fase sólida, (◆) fase cristal, (○) fase amorfa, (-----) limites aparentes da janela	82
Figura 16	Cristais típicos de lisozima em solução de succinato de sódio a 25°C e pH 8,50: (a) $S_0=6,99$ $B_{22}=-1 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. (b) $S_0=6,94$ $B_{22}=-2,2 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. (c) $S_0=5,97$ $B_{22}=-2,6 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$	89
Figura 17	Cristais típicos de lisozima em solução de	90

tartarato de sódio a 25°C e pH 8,50: (a) $S_0=7,49$
 $B_{22}=-1 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ (b) $S_0= 6,69$ $B_{22}=-2,4 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ (c) $S_0=4,26$ $B_{22}=-3,7 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$

Figura 18

Fase amorfa da lisozima em solução de citrato de sódio a 25°C e pH 8,50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais características da lisozima.	38
Tabela 2	Coeficiente área / volume de resinas cromatográficas tipo sepharose	53
Tabela 3	Constantes de <i>salting out</i> a 25°C da lisozima em diferentes sais e pH	70
Tabela 4	Parâmetros de ajuste dos modelos preditivos para o segundo coeficiente virial da lisozima em soluções de succinato de sódio a 25°C e pH 8,50	75
Tabela 5	Parâmetros de ajuste dos modelos preditivos para o segundo coeficiente virial da lisozima em soluções de tartarato de sódio a 25°C e pH 8,50	76
Tabela 6	Parâmetros de ajuste dos modelos preditivos para o segundo coeficiente virial da lisozima em soluções de citrato de sódio a 25°C e pH 8,50	77
Tabela 7	Matriz experimental de fases para o succinato de sódio a 25°C e pH 8,50: média dos tamanhos de cristais (μm); NF, nenhuma fase sólida; A, fase amorfa	85
Tabela 8	Matriz experimental de fases para o tartarato de sódio a 25°C e pH 8,50: média dos tamanhos de	86

cristais (μm); NF, nenhuma fase sólida; A, fase amorfa

Tabela 9	Solubilidade da lisozima em função da força iônica em solução de succinato de sódio a 25°C	103
Tabela 10	Solubilidade da lisozima em função da força iônica em solução de tartarato de sódio a 25°C	104
Tabela 11	Solubilidade da lisozima em função da força iônica em solução de citrato de sódio a 25°C	105
Tabela 12	Solubilidade da lisozima em função do pH a 25°C em soluções de succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio	106
Tabela 13	Segundo coeficiente virial em função da força iônica da lisozima em solução de succinato de sódio a 25°C e pH de 8,50	107
Tabela 14	Segundo coeficiente virial em função da força iônica da lisozima em solução de tartarato de sódio a 25°C e pH de 8,50	108
Tabela 15	Segundo coeficiente virial em função da força iônica da lisozima em solução de citrato de sódio a 25°C e pH de 8,50	109

CONTEÚDO

Nomenclatura

1. Introdução	22
2. Objetivos	27
3. Revisão bibliográfica	28
3.1. Cristalização de proteínas usando o efeito <i>salting out</i>	28
3.1.1. Equilíbrio líquido – líquido de PEG contendo sais	30
3.2. Termodinâmica das soluções com proteína	31
3.3. Lisozima	37
3.4. Sais biodegradáveis	40
4. Materiais e métodos	42
4.1. Reagentes	42
4.2. Principais equipamentos	42
4.3. Procedimentos	43
4.3.1. Solubilidade da lisozima em soluções com sal	43
4.3.1.1. Determinação do tempo de equilíbrio em soluções de cloreto de sódio	43
4.3.1.2. Solubilidade da lisozima em soluções de cloreto de sódio	44
4.3.1.3. Solubilidade da lisozima em soluções de succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio	45
4.3.1.3.1. Solubilidade em função da concentração de sal	45
4.3.1.3.2. Solubilidade em função do pH	47
4.3.2. Determinação de coeficientes viriais por cromatografia líquida	48
4.3.2.1. Imobilização do ligante e empacotamento da coluna	49

4.3.2.2. Obtenção de volume de retenção V_R	50
4.3.2.3. Medição do coeficiente de volume vazio V_0	51
4.3.2.4. Cálculo do B_{22}	52
4.3.3. Janela de cristalização	54
5. Resultados e discussão	57
5.1. Determinação do tempo de equilíbrio em soluções de cloreto de sódio	57
5.2. Solubilidade em função da concentração de cloreto de sódio	59
5.3. Solubilidade da lisozima em soluções de succinato, citrato e tartarato de sódio	60
5.4. Solubilidade em função do pH em soluções de succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio	63
5.5. Efeito <i>salting out</i>	65
5.6. Segundo coeficiente de interação virial B_{22}	70
5.7. Experimentos de cristalização	79
6. Conclusões	93
7. Continuidade do trabalho	96
8. Bibliografia	97
9. Apêndices	103

NOMENCLATURA

a		Atividade
a_e		Atividade no equilíbrio
R^2		Coeficiente de correlação
γ_P^L		Coeficiente de atividade da proteína na fase líquida
γ_P^e		Coeficiente de atividade da proteína no equilíbrio
γ^L		Coeficiente de atividade na fase líquida
B_{HS}	$\text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$	Coeficiente de interação de esfera rígida
K_s	L kg^{-1}	Coeficiente do salting out
B_{EXP}	$\text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$	Coeficiente virial experimental
x	mol mol^{-1}	Concentração
φ_s	r^{-1}	Concentração da proteína
x_P^L	mol mol^{-1}	Concentração da proteína na fase líquida
c_p	mol L^{-1}	Concentração da proteína na fase líquida
x_P^e	mol L^{-1}	Concentração da proteína no equilíbrio
c_{pe}	mol L^{-1}	Concentração da proteína no equilíbrio
c_w	mol L^{-1}	Concentração de água
C'	mol L^{-1}	Concentração de referência na fase líquida
m_{sal}	mol L^{-1}	Concentração molar de sal
m_{sal}^*	mol L^{-1}	Concentração molar de sal de referência
k	$\text{kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$	Constante de Boltzmann

R	$\text{m}^3 \text{Pa L K}^{-1}$	Constante universal dos gases
$\rho_{\text{solução}}$	g L^{-1}	Densidade da solução
ρ_{S}	moléculas g^{-1}	Densidade de proteína fixada na fase estacionária
$\Delta\mu_2$		Diferença de potencial químico da proteína na solução e na matriz cristalina
r	m	Distância
z		Fator de coordenação molecular
$w_{\text{água}}$	g g^{-1}	Fração mássica da água
f_{p}^{∞}		Fugacidade ideal da proteína
n_0		Índice de refração
M_{w}	g mol^{-1}	Massa molecular da água
$M_{\text{proteína}} /$	g mol^{-1}	Massa molecular da proteína
M_{p}		
dn/dc_{p}	L mol^{-1}	Mudança do índice de refração com a concentração de proteína
N_{A}		Numero de Advogadro
A_{c}		Parâmetro ajustável
K		Parâmetro ajustável
k'		Parâmetro cromatográfico
A		Parâmetro de ajustável
p		Parâmetro de anisotropia
w		Potencial de força
P	Pa	Pressão
r	m	Raio

B_{22} / B	$\text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$	Segundo coeficiente viral de interação
B_{22}^{CAL}	$\text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$	Segundo coeficiente viral de interação calculado
B^*	$\text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$	Segundo coeficiente viral de interação de referência
B_{22}^{EXP}	$\text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$	Segundo coeficiente viral de interação experimental
S_0		Sobressaturação
S	mol L^{-1}	Solubilidade
	mol kg^{-1}	
	g g^{-1}	
$SQ_{\text{resíduos}}$		Soma do quadrado dos resíduos
SQ_{total}		Soma total dos quadrados
T	K	Temperatura
B_{222}		Terceiro coeficiente viral de interação
V_R	cm^{-3}	Volume de retenção da fase móvel
V_w	$\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	Volume molar da água
$\bar{V}_p^\infty$	$\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	Volume molar parcial da proteína em dissolução infinita
V_0	cm^{-3}	Volume vazio
Letras Gregas:		
ρ	g L^{-1}	Densidade da solução
φ	$\text{m}^2 \text{ m}^{-3}$	Relação área – volume da resina

λ		Parâmetro de interação
γ		Ângulo posicional
θ		Ângulo posicional
φ		Ângulo posicional
β		Ângulo posicional
Π	Pa	Pressão osmótica
β		Coefficiente de <i>salting in</i>
Γ	mol kg ⁻¹	Força iônica

1. INTRODUÇÃO

Desde a metade do século passado, a biotecnologia tem promovido um grande aumento no estudo, no desenvolvimento de processos e na produção de novos produtos de origem biológica para múltiplas aplicações, seja como matéria-prima (em indústrias de cosméticos e alimentos, por exemplo), seja para uso direto como medicamentos (BASU et al., 2004). Na purificação de bioprodutos, as operações de separação (*downstream*) são parte fundamental e podem corresponder a 80% do custo de produção (CLONIS, 2006). Dentre estas operações, encontram-se duas em que o equilíbrio sólido-líquido tem importância: a precipitação e a cristalização. As duas operações diferem na posição dentro da sequência de purificação e na estrutura do sólido formado: a precipitação é uma etapa inicial, de concentração, enquanto a cristalização é uma etapa mais refinada que garante uma maior pureza (TAM et al., 2011). Estas operações têm grande interesse industrial por serem economicamente mais atrativas comparadas a outras técnicas como a ultrafiltração ou separações cromatográficas. Além da vantagem econômica, a cristalização permite separar uma espécie de interesse de outras presentes na mistura: como exemplo, pode-se obter ovoalbumina cristalizada, com uma pureza de 99% m/m, de uma mistura com lisozima e conalbumina (TAM et al., 2011).

A primeira proteína de natureza cristalina autorizada para uso terapêutico em humanos foi a insulina em 1982. Depois deste êxito da biofarmacêutica, muitos estudos têm sido realizados sobre o uso da cristalização para a

purificação de produtos de alta pureza como proteínas, enzimas, antibióticos entre outros (ZANG et al., 2011).

A lisozima é uma proteína muito conhecida, cuja estrutura foi descrita em 1951, e que foi sequenciada em 1963 (CANFIELD, 1963). Suas propriedades têm sido estudadas amplamente nas últimas décadas, de modo que são bem conhecidos dados de solubilidade desta molécula em diferentes soluções, como, por exemplo, em soluções de sulfato de sódio, sulfato de amônio (POPOVA et al., 2008), cloreto de sódio (WATANABE et al., 2009) e carbamato de amônio (WATANABE et al., 2010) em diferentes condições. Outra informação importante disponibilizada sobre a lisozima é o diagrama de fases em sulfato de amônio (COEN; BLANCH; PRAUSNITZ, 1995; MORETTI; SANDLER; LENHOFF, 2000). Devido a todo o conhecimento adquirido ao longo do tempo sobre esta molécula, pode-se considerá-la um padrão nos estudos que envolvem a precipitação de proteínas. Na indústria de alimentos a lisozima é usada como conservante de vinhos, de modo a inibir microrganismos que façam fermentação maloláctica, a qual não é desejada, por resultar em uma perda do sabor do produto (INÊS et al., 2008; MARCHAL et al., 2002).

A determinação das condições em que se forma um cristal, e não um sólido amorfo, é um assunto ainda não conhecido completamente na cristalização de proteínas. Em soluções salinas, por exemplo, sabe-se que a supersaturação da solução é um fator determinante na definição do tipo de sólido formado. No caso de proteínas, sabe-se que outras medidas termodinâmicas, como o segundo coeficiente virial e a pressão osmótica, intervêm nas características do sólido formado (WANKA; PEUKERT, 2011).

Para o projeto de otimização da cristalização, é necessário o estudo dos sistemas complexos que contêm proteínas ou outros produtos de origem biológica, de modo a obter um produto sólido cristalino com alta atividade biológica (BASU et al., 2004). Com a manufatura de agentes cristalinos procura-se obter outros benefícios, como menores custos na fabricação, altas concentrações das substâncias ativas, novas vias de produção dos biofármacos, diminuição dos processos naturais de biodegradação e melhoramento das características físico-químicas dos medicamentos (SEKHON, 2010).

A formação de um precipitado é uma das técnicas mais antigas de concentração de proteínas. Ela consiste na diminuição da solubilidade por meio da adição de um reagente ou de outras mudanças no meio, como alterações na temperatura, pH ou pressão, de modo a promover a associação das regiões hidrofóbicas da molécula (RUSSO KRAUSS et al., 2013). A diminuição da solubilidade nas soluções proteicas por adição de outro composto é comumente denominada de efeito *salting out*. Diferentes trabalhos estudam este efeito em sistemas proteicos, dando destaque para as mudanças da solubilidade como função do tipo de sal utilizado, pH e temperatura do sistema (BERNARD; JOLIVALT; SCHWARZTZENTRUBER, 1996; BOYCHYN et al., 2000; CHENG et al., 2006; GREEN, 1932; JUDGE; JOHNS; WHITE, 1996; LEGRAND; RIÈS-KAUTT; ROBERT, 2002; SHIH; PRAUSNITZ; BLANCH, 1992)

Apesar de o nome remeter ao uso de sais, os agentes precipitantes ou agentes promotores de *salting out* utilizados podem ser de diferentes tipos, por exemplo, sais, solventes orgânicos ou polímeros. No caso de produtos usados

em seres vivos como fármacos e suplementos alimentícios, caso o composto não seja compatível com o organismo no qual será usado, é necessário que o mesmo seja completamente retirado do sistema (TASHIMA et al., 2009) para evitar possíveis efeitos colaterais. Por esta razão, são usados sais como cloreto de sódio, que estão presentes em diferentes processos orgânicos, porém possuem uma baixa capacidade de separação. Novas alternativas têm surgido neste cenário, como os sais derivados do ácido cítrico (succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio). Esses sais se destacam pela capacidade em separar proteínas em sistemas líquido-líquido que contêm polietileno glicol (PEG) (PEREZ et al., 2013). Estes sais prometem ser mais eficientes e potencialmente biocompatíveis, já que estão presentes em diferentes ciclos metabólicos próprios dos seres vivos, como o ciclo de Krebs, metabolismo do ácido cítrico, entre outros (KREBS; WEITZMAN, 1987).

Para prever as condições de precipitação de uma proteína por influência de um sal é necessário conhecer seu comportamento termodinâmico, isto é, o equilíbrio sólido-líquido. De modo geral, os dados experimentais relacionados compreendem a solubilidade da proteína em função das variáveis do sistema (concentração de sal, temperatura e pH). O efeito *salting out*, anteriormente descrito, é uma modificação nas concentrações de equilíbrio das espécies e pode ser termodinamicamente escrito em termos de grandezas mensuráveis. O modelo termodinâmico clássico que interpreta o efeito de *salting out* é conhecido como a equação de **Cohn**, mostrada na Equação 1.1. Esta equação relaciona o logaritmo da solubilidade “S” de uma macromolécula como uma função linear da concentração de sal (força iônica, “I”) e as constantes com interpretação físico-química “ β ” e “Ks” (MELANDER;

HORVÁTH, 1977). Esses parâmetros devem ser ajustados mediante o uso de dados experimentais.

$$\ln(S) = \beta - K_s \Gamma \quad 1.1$$

A janela de cristalização (*crystallization slot*) é um termo que se usa para delimitar os valores de segundo coeficiente virial nos que se obtém cristais de proteína (GEORGE; WILSON, 1994). Atualmente podem-se visualizar regiões onde são obtidos cristais ou é gerada a fase amorfa mediante a relação experimental dos valores do segundo coeficiente virial e a sobressaturação. Esta técnica é nomeada como janela de cristalização do tipo 2D e descreve indiretamente os valores de concentração salina e de proteína nos quais se obtém algum tipo de precipitado (WANKA; PEUKERT, 2011).

A lisozima é uma boa alternativa como molécula de estudo por ser amplamente conhecida, o que permite comparar o comportamento já conhecido sobre sua cristalização/precipitação com o observado em soluções contendo succinato, tartarato e citrato de sódio. Estes sais tem como principal característica o fato de serem biocompatíveis, o que permite seu uso em possíveis aplicações em seres vivos. As medidas da solubilidade, segundo coeficiente virial e a determinação da janela de cristalização permitem quantificar a capacidade de separação dos sais e determinam termodinamicamente em que condições são geradas as fases em equilíbrio.

2. OBJETIVOS

Geral

Identificar e quantificar a eficiência dos sais succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio na cristalização e precipitação da lisozima de clara de ovo como proteína modelo.

Específicos

1. Obtenção da solubilidade da lisozima a 25°C em diferentes concentrações de sal (succinato, tartarato e citrato de sódio) inferiores ao limite máximo de saturação em água, e pH inferiores e superiores ao ponto isoelétrico.
2. Determinação dos valores do segundo coeficiente virial osmótico da lisozima, a 25°C e pH 8,50, em função da concentração dos diferentes sais (succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio).
3. Acoplamento dos modelos de solubilidade e segundo coeficiente virial da lisozima em diferentes soluções salinas (succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio) no cálculo da matriz experimental da janela de cristalização do tipo 2D (B_{22} vs. S_o).
4. Obtenção experimental da janela de cristalização da lisozima (25°C e pH 8,50) em diferentes soluções salinas (succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio) e identificação de uma faixa básica de valores típicos de tamanho dos cristais usando microscopia ótica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cristalização de proteínas usando o efeito *salting out*

Pode-se obter a separação sólido – líquido de uma solução com proteínas através de uma mudança no meio, i.e., pela manipulação das variáveis termodinâmicas: força iônica (concentração das espécies com carga), pH (concentração de íons H^+), temperatura e, finalmente, pressão (cuja influência é considerada desprezível no equilíbrio de sistemas sólido-líquido). Para entender o fenômeno, as mudanças nas forças intermoleculares que governam o sistema devem ser observadas. Uma molécula de proteína é um polipeptídeo que apresenta quatro níveis de estruturação. As estruturas primárias e secundárias são definidas por ligações atômicas fortes do tipo covalente, enquanto as outras estruturas são formadas por interações no interior das cadeias em função das forças intramoleculares do tipo: íon-íon, íon-dipolo (entre elas as ligações de hidrogênio), dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas. Quando as moléculas têm desenvolvidas todas as suas estruturas, interagem com o meio, especialmente com a água e com moléculas polares, devido aos resíduos polares e iônicos expostos no exterior da proteína, enquanto os resíduos hidrofóbicos ficam blindados no interior da molécula. Outras interações presentes na superfície da proteína expõem grupos hidrofóbicos que causam exclusão local e reorganização das moléculas de água nestes pontos (DIXON; WEBB, 1961).

Mudanças nas estruturas da proteína são possíveis através do favorecimento ou desfavorecimento das ligações anteriormente descritas, por alterações nas condições do meio. A associação entre as moléculas pode ou não ser privilegiada por um aumento na temperatura, que desfavorece as interações dipolares e favorece as hidrofóbicas, um aumento ou um decréscimo do pH, resultando numa agregação ou dissociação, respectivamente, de prótons nos grupos das superfícies, e a adição de sal, que diminui a quantidade de moléculas de água que interagem com os resíduos externos, o que favorece as interações hidrofóbicas entre moléculas similares (ENGLARD; SEIFTER, 1990; SCOPES, 1988).

Para entender melhor o fenômeno de *salting-out* e a especificidade do íon pela proteína, usa-se o termo de potencial de dispersão iônico (BOSTRÖM; WILLIAMS; NINHAM, 2003; MOREIRA et al., 2006). Em altas concentrações de sal, a proteína é rodeada por uma camada de íons que faz com que as macromoléculas comportem-se como um dipolo neutro (MELANDER; HORVÁTH, 1977). Nesta condição, o potencial eletrostático é reduzido e o potencial de dispersão iônico governa as interações, aumentando a atração entre moléculas de proteína.

O sal mais usado para induzir a precipitação é o sulfato de amônio. Por ser muito solúvel em água, produz soluções de baixa densidade, atuando ademais como agente inibidor do crescimento bacteriano (DEUTSCHER, 1990). Suas aplicações são conhecidas em processos que se baseiam na adição de sal, por exemplo, na extração de DNA genômico (NASIRI et al., 2005), na purificação de plasmídeo de DNA (YU et al., 2007) e na extração de β -glucosidase de sementes de maçã (ZHANG et al., 2007).

Outro sal usado frequentemente é o sulfato de sódio (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985), tendo sido seu uso relatado na purificação de imunoglobulinas G de soro ovino e imunoglobulinas da gema de ovo de galinha (KARAM et al., 2005; NEWCOMBE et al., 2005). Já o cloreto de sódio é amplamente usado na precipitação de proteínas, sendo considerado um composto de efetividade intermediária, um sal de referência (RETAILLEAU; DUCRUIX; RIÈS-KAUTT, 2002), além de ser utilizado no estudo do segundo coeficiente virial na precipitação de lisozima de clara de ovo de galinha (LUI; LISTER; WHITE, 2007).

3.1.1. Equilíbrio líquido – líquido de PEG contendo sais

Os sais usados como agentes precipitantes são conhecidos também por sua capacidade de formar sistemas de duas fases aquosas com polietilenoglicol (PEG). O equilíbrio líquido-líquido de soluções aquosas com polímeros como o PEG mostra o efeito organizativo de moléculas de alto peso molecular e sua influência na estrutura da água. Em altas temperaturas estes sistemas apresentam um estado entropicamente mais favorável, no qual não se gera uma separação de fases. Já em baixas temperaturas, o contrário é observado, sendo favorecidas outros tipos de interações associativas como, por exemplo, as ligações de Van der Waals entre as cadeias poliméricas. Observa-se uma diminuição na temperatura em que se origina a separação de fases (*cloud point*) nestes sistemas por meio da adição de sais de baixa massa molecular, sendo a ordem de alcance semelhante à série de Hofmeister: $\text{PO}_4^{-3} > \text{CO}_3^{-2} > \text{SO}_4^{-2} > \text{OH}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. Basicamente é considerada uma

mudança na estrutura da água pela presença do sal, podendo ser quantificada por mudanças na tensão superficial (ZASLAVSKY, 1995).

Em termos da solubilidade das duas fases aquosas, para todos os casos se observa que a quantidade de sal necessária para induzir a separação diminui com a quantidade de polímero presente. Experimentalmente, observa-se que a relação de concentrações sal / polímero muda com o tipo de composto, e que sua redução é inversamente proporcional ao aumento da capacidade de se obterem as duas fases. Este fato se pode representar como uma serie liotrópica : $\text{PO}_4^{-3} > \text{citrato} > \text{SO}_4^{-2} > \text{CO}_3^{-2} > \text{tartarato} > \text{succinato} > \text{OH}^- > \text{formiato}$ (ZASLAVSKY, 1995).

3.2. Termodinâmica das soluções com proteína

Para o estudo da cristalização de proteínas é preciso conhecer os limites em que a molécula antes dissolvida tende a precipitar. Este limite é expresso pelo equilíbrio termodinâmico de fases mostrado na Equação 3.1 (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001). A relação de equilíbrio mostra a igualdade das potenciais químicos do composto i nas fases líquida e sólida, escrita por sua vez em termos da atividade e da fugacidade das fases para i . Estas grandezas são função do estado do sistema, que é expresso pela temperatura T , pressão P , concentração dos componentes x_i e pH (concentração de íons H^+ , c_w) (FRANCO; FILHO, 2011).

$$\gamma_p^e(T, P, x_i) x_p^e f_p^e(T) = \gamma_p^l(T, P, x_i) x_p^l f_p^\infty(T) \quad 3.1$$

O estado no qual a proteína supera este limite é conhecido como supersaturação ou sobressaturação S_o , e nele podem ser geradas uma ou mais fases sólidas (KASHCHIEV; VAN ROSMALEN, 2003), como mostrado na Equação 3.2, na qual S_o é expressa em função das atividades, e estas, por sua vez, em função dos coeficientes de atividade e das concentrações da proteína na fase líquida e no equilíbrio (MELANDER; HORVÁTH, 1977).

$$S_o = \frac{a}{a_e} = \frac{\gamma_p^l c_p}{\gamma_p^e c_{pe}} \quad 3.2$$

Na quantificação de S_o de um sistema que contém proteína, é conhecida sua relação com a pressão osmótica, e por sua vez com os coeficientes viriais (NEAL; ASTHAGIRI; LENHOFF, 1998), como mostrado na Equação 3.3, onde C_p é a concentração da proteína e M_w a massa molecular da água.

$$\Pi = RTc_p \left(\frac{1}{M_w} + B_{22}c_p \right) \quad 3.3$$

A Equação 3.4 mostra um modelo de atividade da proteína no líquido que leva em conta os coeficientes de interação virial de segunda ordem e de ordem superior (B_{222}) (ESPITALIER; CHENG; LENHOFF, 2009; GRANT, 2000). Segundo as equações 3.2 e 3.4, a supersaturação pode ser calculada em função do coeficiente B_{22} e de outros parâmetros, conforme mostrado na Equação 3.5.

$$\ln \gamma^L = 2B_{22}C' + \frac{3}{2}B_{222}C' \cong 2B_{22}C' \quad 3.4$$

$$S_o = \exp \left[\ln \left(\frac{c_p}{c_{pe}} \right) + 2B_{22}M_{proteina}(c_p - c_{pe})w_{agua}\rho_{solução} \right] \quad 3.5$$

Em soluções que contêm proteínas, os coeficientes viriais são a representação física integral de como uma molécula de proteína interage com as outras moléculas da mesma espécie a uma distância r_{12} , de acordo com os ângulos de localização espacial θ , φ , α , β e γ e devido a um potencial de força w (ZIMM, 1946), conforme mostrado na Equação 3.6. Na figura 1 mostra-se uma representação gráfica de dois corpos de proteína interagindo em meio de íons com relação a um eixo de referencia.

$$B_{22} = \frac{1}{16\pi^2} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^\infty \left(e^{\frac{-w}{kT}} - 1 \right) r_{12}^2 dr_{12} \sin \theta d\theta d\varphi d\alpha \sin \beta d\beta d\gamma \quad 3.6$$

Figura 1. Esquema da interação binária de dois corpos de proteína com relação a um eixo de referencia numa distância r_{12} em meio de íons r_{ion} (Adaptação (NEAL; ASTHAGIRI; LENHOFF, 1998))

A maioria dos trabalhos sobre a não-idealidade de proteínas em soluções aquosas contendo sais considera somente o segundo coeficiente virial B_{22} , que se refere à interação entre um par de moléculas (GUO et al., 1999). O segundo

coeficiente virial tem uma magnitude muito maior do que os termos sucessivos do terceiro ou quarto coeficientes, que por sua vez representam a interação simultânea entre um trio e um quarteto de moléculas (GRANT, 2000), com menor probabilidade de acontecer.

Existem quatro modelos de origem termodinâmica que relacionam a solubilidade com o segundo coeficiente virial. O primeiro modelo é conhecido pela sigla HDW, proposto por Haas et al. (HAAS; DRENTH; WILSON, 1999). Este modelo assume teoricamente uma alta dependência da anisotropia do sistema e da forma cristalina da proteína, incluindo um fator de coordenação z que somente depende desta hipótese, e um coeficiente de correlação A , que por sua vez é descrito fisicamente por um parâmetro de anisotropia p e outro de interação λ , como mostrado na Equação 3.7.

$$B_{22} = \frac{4}{M_w \rho} \left\{ 1 - A \left[\left(\frac{\varphi_s}{m} \right)^{-\left(\frac{2}{z}\right)} - 1 \right] \right\} \quad 3.7$$

$$A = p(\lambda^3 - 1)$$

O segundo modelo foi criado por Guo et al., (GUO et al., 1999) e é mostrado na Equação 3.8. Este modelo leva em conta a temperatura T , a massa molecular da proteína M_p , além do diferença de potencial químico da proteína na solução e na matriz cristalina $\Delta\mu_2$.

$$B_{22} = \frac{-\Delta\mu_2}{RT} \frac{1}{2M_p S} - \frac{\ln S}{2M_p S} \quad 3.8$$

O terceiro modelo é o proposto por Ruppert et al., (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001) e relaciona um coeficiente virial experimental B_{exp} com a solubilidade molar da proteína C_p . Em sua estrutura existem dois

parâmetros ajustáveis, A_c e K , além de outros termos de natureza físico-química como o volume molar parcial da proteína em diluição infinita $\bar{V}_p^\infty$ (IMAI; KOVALENKO; HIRATA, 2005), o volume molar da água V_w , e a mudança do índice de refração com a concentração de proteína dn/dc_p (MEHTA; WHITE; LITSTER, 2011). O modelo é mostrado na Equação 3.9.

$$B_{EXP} = \frac{1}{2M_p c_p} \left[A_c - (1 - K) \ln \left(\frac{V_w}{M_p} c_p \right) \right] - \frac{\bar{V}_p^\infty}{M_p^2} - \frac{dn/dc_p}{n_0 M_p} \quad 3.9$$

O último modelo indicado por Franco et al. (FRANCO; FILHO, 2013) leva em consideração a relação entre o segundo coeficiente virial B com a concentração molar de sal m_{salt} , que por sua vez, relaciona-se com a solubilidade da proteína no meio. Este modelo precisa de um estado de referência conhecido, indicado na Equação 3.10 por meio do asterisco (*), além do conhecimento da constante de *salting out* K_s , obtida por ajuste de dados de solubilidade por meio da equação de Cohn.

$$\ln \left(\frac{B}{B^*} \right) = K_s (m_{sal} - m_{sal}^*) \quad 3.10$$

De forma prática, o coeficiente B_j pode ser medido usando diferentes técnicas experimentais, como a osmometria de membrana (MO, *Membrane Osmometry*), que determina a pressão osmótica em que se atinge o equilíbrio com uma solução isenta de proteína separada por uma membrana semipermeável (ZIMM, 1946), o que não é muito adequado para baixas concentrações (QUIGLEY et al., 2013). O espalhamento de luz estático (SLS, *Static Light Scattering*) mede a intensidade de um feixe de luz dirigido em um determinado ângulo através de uma amostra com determinada concentração (BAJAJ; SHARMA; KALONIA, 2004). Entretanto, esta técnica requer uma

grande quantidade de amostras para determinar um único valor de B_{22} (QUIGLEY et al., 2013). A cromatografia de auto-interação (SIC, *Self-Interaction Chromatography*) é a mais recente (TESSIER; LENHOFF; SANDLER, 2002). Ela se baseia na determinação das interações de um grupo de moléculas, fixadas em uma resina e empacotadas dentro de uma coluna cromatográfica, com outro grupo de moléculas presentes na fase eluída (fase móvel) a umas determinadas condições. Mede-se o volume de retenção da fase móvel V_R , que está relacionado com o parâmetro cromatográfico k' , e leva em consideração o volume vazio V_0 , como mostrado na Equação 3.11. O cálculo do segundo coeficiente virial experimental se faz subtraindo do parâmetro de interação do tipo esfera rígida do raio da molécula de proteína B_{HS} o quociente formado por k' , a relação área-volume da resina ϕ (DEPHILLIPS; LENHOFF, 2000) e a quantidade de moléculas de proteína empacotadas ρ_s , como é apresentado na Equação 3.12.

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad 3.11$$

$$B_{22} = \frac{N_A}{M_p^2} \left(B_{HS} - \frac{k'}{\rho_s \phi} \right) \quad 3.12$$

No estudo da cristalização de proteínas, existem outras técnicas experimentais que são úteis na caracterização da molécula, já que outros parâmetros são requeridos nos modelos termodinâmicos e fenomenológicos usados. A ultracentrifugação é uma técnica que permite conhecer o fator de forma hidrodinâmico e a massa molecular usando a medição do tempo de sedimentação de uma amostra que está sob a influência de um campo de aceleração (LEBOWITZ; LEWIS; SCHUCK, 2002). Outra técnica mais

amplamente usada é a difração de raios-X (*X-ray diffraction*) que permite identificar a estrutura dos cristais da proteína, registrando as variações na intensidade de um feixe de raios dirigido em diferente ângulo numa amostra de cristal, a determinada amplitude de onda, o que implica ter o conhecimento dos procedimentos para obter dito precipitado.

3.3. Lisozima

A lisozima, ou 1,4- β -N-acetilmuramidase, é a enzima que rompe as ligações glicosídicas entre o C-1 do ácido N-acetilmurâmico e o C-4 da N-acetilglucosamina em peptídeoglicanos de bactérias (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984). O nome da lisozima deve-se ao fato deste polipeptídeo ser capaz de “lisar” ou degradar as paredes celulares protetoras de alguns tipos de bactérias. Ela é, portanto, classificada como um agente bactericida (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Esta enzima apresenta ponto isoelétrico (pI) considerado básico de 11,35 e massa molecular de 14,0 kDa.

Na natureza, a lisozima pode ser encontrada na clara do ovo de galinha, na lágrima e na saliva animal (OSSERMAN, 1967). Comercialmente, ela pode ser encontrada na forma de pó liofilizado com alta pureza (maior que 95%) e distinguida por sua alta solubilidade ($>10 \text{ mg cm}^{-3}$). Estas e outras características da lisozima são apresentadas na Tabela 1 (WATANABE, 2007).

Tabela 1. Principais características da lisozima

Característica		Referência
Massa molecular (kDa)	14	(ALDRICH, 1996)
Ponto isoelétrico	11,35	(ALDRICH, 1996)
Solubilidade em água pura (mg cm ⁻³)	100,0	(ALDRICH, 1996)
Hidrofobicidade (cal/resíduo)	970	(BIGELOW, 1967)
Temperatura de desnaturação (°C)	>100	(JOLLÈS, 1967)
		(PETERS JR, 1985)
Número de resíduos aminoácidos	129	(JOLLÈS; JOLLÈS, 1984)J
		(PETERS JR, 1985))
Carga líquida da proteína a pH 7,0 (e)	+8	(RIÈS-KAUTT; DUCRUIX, 1997)
		(PETERS JR, 1985)

A cristalização da lisozima foi realizada pela primeira vez em 1946 com cloreto de sódio, antes mesmo do seu sequenciamento (ALDERTON; FEVOLD, 1946). Posteriormente, ela foi cristalizada empregando sulfato de amônio a partir de proteína dessalinizada (RIÈS-KAUTT; DUCRUIX; VAN DORSSELAER, 1994), sendo corroborada a obtenção de uma fase cristalina em um intervalo de pH de 4,8 a 7,0 em baixas concentrações de sulfato de amônio (<0,6 mol/L) e altas concentrações de proteína (alta sobressaturação) (FORSYTHE; SNELL; PUSEY, 1997).

A solubilidade de cristais ortorrômnicos de lisozima em soluções de cloreto de sódio diminui com o aumento do pH, fato esse não observável em

cristais tetraédricos (ATAKA; TANAKA, 1986; CACCIOPO; PUSEY, 1991; EWING; FORSYTHE; PUSEY, 1994)

A diminuição da solubilidade da lisozima em relação ao tipo de ânion em solução segue uma série inversa de Hofmeister, $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7^-$ (citrato) $> \text{CH}_3\text{CO}_2^-$ (acetato) $> \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{SO}_4^{2-}$ (ATAKA; TANAKA, 1986; BÉNAS; LEGRAND; RIÈS-KAUTT, 2002; RETAILLEAU; DUCRUIX; RIÈS-KAUTT, 2002; RIES-KAUTT; DUCRUIX, 1989). Efetivamente, proteínas com ponto isoelétrico básico, ou seja, com $\text{pI} > 7,0$, como a lisozima, em pH abaixo do seu pI , seguem o reverso da série de Hofmeister, enquanto proteínas com ponto isoelétrico ácido, ou seja, com $\text{pI} < 7,0$, em pH acima do seu ponto isoelétrico (pI) seguem a série de Hofmeister. Propõe-se que uma camada de íons liga-se aos resíduos carregados expostos das proteínas (com pK básico ou ácido, dependendo da situação) através de um processo semelhante a uma adsorção, diminuindo a carga líquida da molécula. No caso da lisozima, a carga líquida é positiva em pH ácido, resultando na diminuição da sua solubilidade pela adsorção de ânions. No caso das proteínas ácidas, a adsorção de cátions nos resíduos negativamente carregados gera um aumento na carga líquida, mas esse efeito é pouco pronunciado em comparação com o dos ânions (RIÈS-KAUTT; DUCRUIX, 1997).

Os cátions, no caso da lisozima, atuam como co-íons abaixo do ponto isoelétrico, o que é demonstrado experimentalmente por meio da substituição do cátion Na^+ por K^+ , fato que gera um aumento na repulsão molecular e, consequentemente, na solubilidade (BOSTRÖM et al., 2005). Do mesmo modo foi observada a diminuição da solubilidade da proteína com o aumento da eletronegatividade dos cátions, fato que concorda com a série do tipo

Hofmeister: $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Mg}^{+2}$ (ATAKA; TANAKA, 1986; BÉNAS; LEGRAND; RIÈS-KAUTT, 2002; RETAILLEAU; DUCRUIX; RIÈS-KAUTT, 2002; RIES-KAUTT; DUCRUIX, 1989).

3.4. Sais biodegradáveis

. Na figura 2 (a) se amostra sua estrutura do succinato de sódio. Comercialmente encontra-se como um pó branco cristalino, muito utilizado na indústria de alimentos, com uma massa molecular de $162,5 \text{ g mol}^{-1}$, um ponto de fusão de 400°C , uma densidade de $1,886 \text{ mg mL}^{-1}$, uma solubilidade em água pura maior a 100 mg mL^{-1} , é considerada biodegradável em no meio ambiente e de baixa toxicidade (SIDS, [s.d.]). O tartarato de sódio é um aglutinante e emulsificante usado na fabricação de galeias e manteigas, com uma massa molecular de $194,05 \text{ g mol}^{-1}$ (anidro), uma densidade $1,545 \text{ mg mL}^{-1}$, solúvel em água e insolúvel em etanol, sua estrutura é amostrada na figura 2 (b) (LIDE, 1998). O citrato de sódio é conhecida como um sal derivado do ácido cítrico, muito usado por sua capacidade de formar soluções tampão, empregado como aditivo de sabor e preservativo em alimentos, com uma massa molecular de $258,06 \text{ g mol}^{-1}$ (anidro), uma densidade de $1,7 \text{ mg mL}^{-1}$ e uma solubilidade em água de $92 \text{ g /100 g H}_2\text{O}$, sua estrutura se amostra na figura 2 (c) (TOXNET, [s.d.]).

(a)

(b)

(c)

Figura 2. Estruturas moleculares: (a) succinato de sódio; (b) tartarato de sódio; (c) citrato de sódio

4. MATÉRIAS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Lisozima de ovo de galinha (pureza (pt.) de 92,5% em massa), resina ativada CNBr Sepharose 4B (4% de agarose), succinato de sódio dibásico (pt.> 99%), tartarato de di-hidrato dibásico de sódio (pt.> 99%), citrato de sódio di-hidratado (pt.> 99%), ácido cítrico (pt.> 99,5%), hidróxido de sódio (pt.> 98%), ácido acético (pt.> 99,7%), acetato de sódio (pt.> 99%), cloreto de sódio (pt.> 99,5%), bicarbonato de sódio (pt.> 99,5%), Tris-base (pt. 99,9%), foram fornecidos pela *Sigma Aldrich*. Ácido clorídrico (pt. 37%) foi obtido da *Merk*. Todos os reagentes foram utilizados sem qualquer outra purificação adicional. Em todas as experiências foi usada água destilada ultrapura deionizada (obtida a partir de um sistema *Millipore Milli-Q system* >18,2 mΩ cm).

4.2. Principais equipamentos

As concentrações de proteína foram determinadas usando o espectrofotômetro *Thermoscientific Nanodrop 2000/2200c*, por meio da medida de absorbância em comprimento de onda de 280 nm e usando o coeficiente de extinção de 36 para a lisozima. A temperatura das amostras foi mantida por meio de banho termostatizado Láctea com controlador de temperatura *Julabo EC* ($\pm 0,1^\circ\text{C}$). A centrifugação das amostras foi feita em uma centrífuga refrigerada *Jouan*. Na determinação dos segundos coeficientes viriais foi usado um cromatógrafo líquido FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) marca AKTA referência UPC-900 / P920 (Figura 3 (a)). Para manter a temperatura

dos pratos de cultivo (tissue plate, Figura 7) a 25°C na identificação da janela de cristalização foi usada uma estufa – incubadora *Thermo Scientific Heratherm*. A diluição e homogeneização das amostras contidas em tubos tipo *Eppendorf* foi arranjada com um homogeneizador rotatório *Phoenix AP 22*.

4.3. Procedimentos

4.3.1. Solubilidade da lisozima em soluções com sal

4.3.1.1. Determinação do tempo de equilíbrio em soluções de cloreto de sódio

Escolheu-se o NaCl por ser um sal com uma ampla quantidade de dados experimentais, o que faz ser considerado um padrão em cristalização de proteínas, servindo como fator de comparação confiável. Para estimar o tempo necessário para atingir o equilíbrio em soluções nas quais ocorra precipitação e/ou cristalização da lisozima, obtêm-se dados de concentração na fase líquida da proteína em mistura com cloreto de sódio em função do tempo a 25°C e pH de 4,38, 7,00 e 10,20. Preparam-se soluções tampão com fosfato de potássio monobásicos e hidróxido de sódio em pH 4,38 e 7,00, e com ácido clorídrico e tris em pH 10,20. Usando as soluções tampão, preparam-se soluções de lisozima 0,2 m/m e de NaCl de 0,2 m/m (WATANABE et al., 2009). As duas soluções são misturadas em um tubo tipo Falcon de 15 cm³ nas quantidades calculadas com os balanços de massa. A cada intervalo de tempo (aprox. 1 h) é extraída uma amostra de 2 µL do sobrenadante da solução. Determinam-se as concentrações de proteína por medida de absorbância. O experimento é terminado quando aparentemente a concentração mantém-se constante. Na

Figura 3, mostra-se um esquema resumo do procedimento descrito anteriormente para a determinação do tempo de equilíbrio.

Em outra série de experimentos, que não se apresentam neste documento, verificou-se a ausência da influência da concentração do sal, neste caso NaCl, nas medições de absorvância para o cálculo da concentração de lisozima na fase líquida.

4.3.1.2. Solubilidade da lisozima em soluções de cloreto de sódio

O procedimento de determinação de solubilidade de lisozima em função da concentração de sal foi estabelecido em experimentos com NaCl em temperatura constante de 25°C e pH de 7,31 e 10,06.

Preparam-se soluções tampão com fosfato de potássio monobásicos e hidróxido de sódio a pH 7,31 e com ácido clorídrico e tris em pH 10,06. Usando as soluções tampão, preparou-se uma solução de lisozima 0,2 m/m e de NaCl de 0,2 m/m (WATANABE et al., 2009). Oito amostras de 1 g, em triplicata, são preparadas misturando-se as soluções de proteína e de sal à solução tampão até atingir a concentração global de cloreto de sódio procurada, de acordo com os balanços de massa. A temperatura das amostras foi mantida a 25 °C por meio de banho termostatizado.

Figura 3. Esquema experimental para a obtenção do tempo de equilíbrio na cristalização / precipitação de lisozima em soluções de cloreto de sódio a 25°C e pH de 4,38, 7,00 e 10,20 e na medição da solubilidade da lisozima em soluções de cloreto de sódio a 25°C e pH 7,31 e 10,06

Foram feitas medidas da concentração de lisozima na fase líquida todos os dias até que não foram observadas mudanças na medida. Antes de medir as concentrações na fase líquida todas as mostras são centrifugadas a 16000 *g* por 45 min. As concentrações de proteína foram determinadas usando 2 μ L para cada uma das medidas em um espectrofotômetro. O esquema experimental exibido na Figura 3 resume o procedimento antes descrito.

4.3.1.3 Solubilidade da lisozima em soluções de succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio

4.3.1.3.1. Solubilidade em função da concentração de sal

Os sais foram dissolvidos em concentrações próximas ao limite de solubilidade: para o tartarato de sódio, 27,6% m/m, para o citrato de sódio, 29,8% m/m, e para o succinato de sódio, 19,8% m/m. O pH das soluções foi atingido na produção do tampão utilizando diferentes proporções de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e ácido clorídrico 1 mol L^{-1} . Estas soluções tampão foram novamente diluídas em diferentes proporções para obter uma gama de concentrações para o succinato de sódio de 5 a 12 % m/m, para o tartarato de sódio de 5 a 27 % m/m e para o citrato de sódio de 10 a 22,5%.

Lisozima cristalizada foi adicionada em amostras de 0,5 g de solução salina (tartarato de sódio, citrato de sódio e succinato de sódio) de cada uma das diferentes concentrações de sal, até que o limite de solubilidade da proteína fosse atingido, isto é, até que não houvesse mais dissolução da proteína. As amostras foram, então, agitadas em homogeneizador e mantidas em temperatura constante por oito dias, tempo que foi determinado nos experimentos com cloreto de sódio. Caso fosse notada dissolução do precipitado, uma quantidade maior de proteína era adicionada. Finalizado o período de oito dias sem dissolução do precipitado, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 45 minutos à temperatura constante de 25°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A concentração de proteína foi medida pela absorbância da fase sobrenadante. Na Figura 4 mostra-se o esquema experimental resumido do procedimento anteriormente explicado.

Figura 4. Esquema experimental para a obtenção da solubilidade da lisozima em soluções de sal a 25°C e pH constante

4.3.1.3.2. Solubilidade em função do pH

As mesmas soluções com concentração máxima do sal, preparadas para os experimentos de determinação de solubilidade em função da concentração de sal, foram usadas para a preparação de soluções a diferentes valores de pH. Para atingir o pH desejado e formar uma solução tampão, se misturam as soluções com diferentes proporções de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e ácido clorídrico 1 mol L^{-1} . Deste modo, produziam-se soluções com força iônica constante, ou concentração de sal fixa, e em uma gama de diferentes pH: para o succinato de sódio de 8 a 12,5, para o tartarato de sódio de 4 a 12,5 e para o citrato de sódio de 6 a 12.

Da mesma forma, lisozima cristalizada foi adicionada em amostras de 0,5 g de solução salina (tartarato de sódio, citrato de sódio e succinato de sódio)

em cada um dos diferentes valores de pH, até que o limite de solubilidade da proteína fosse atingido. As amostras foram, então, agitadas em um homogeneizador e mantidas em temperatura constante até atingir o equilíbrio (oito dias). Caso fosse notada dissolução do precipitado, uma quantidade maior de proteína era adicionada. Após o tempo necessário para atingir o equilíbrio, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 45 minutos à temperatura constante de 25 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A concentração de proteína foi medida pela absorbância da fase sobrenadante. O esquema experimental do procedimento antes descrito é exibido na Figura 4.

4.3.2. Determinação de coeficientes viriais por cromatografia líquida

Foi usado um FPLC marca *AKTA*, como apresentado na Figura 5 (a). O equipamento permite a montagem de diferentes tipos de coluna e de loop (micro tubulação de armazenagem da mostra). Foi acoplada uma coluna de cromatografia líquida HR 5/5 de 50 mm de comprimento e um diâmetro de 5 mm como se mostra na Figura 5 (b). Na saída da coluna tem-se um espectrofotômetro para determinação da absorbância, um condutivímetro e um pHmetro. As medições de absorbância foram feitas em um comprimento de onda de 280 nm. O FPLC possui duas bombas independentes com as quais se pode ter o escoamento de duas soluções diferentes, permite fazer rampas de vazão e modificar amplamente o fluxo através da coluna. Foi usado um loop de 50 µL, com o qual foi fixado o volume injeção da amostra.

(a)
Figura 5. (a) FPLC marca ÄKTA referência UPC-900 / P920, (b) Coluna de cromatografia líquida HR 5/5 empacotada com resina CNBr activate sepharose 4B contendo lisozima ligada

4.3.2.1. Imobilização do ligante e empacotamento da coluna

Para o procedimento de imobilização da lisozima (TESSIER; LENHOFF; SANDLER, 2002) na resina foram preparadas soluções tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaHCO_3 e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl de pH 8,30 como solução de acoplamento; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Tris e HCl de pH 8,00 como solução de bloqueio; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético e acetato de sódio contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl de pH 4 como solução de lavagem A; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tris e HCl contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl de pH 8,00 como solução de lavagem B e uma solução de lavagem inicial I de HCl $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de HCl . Uma massa de 0,5 g de resina foi lavada com 200 cm^3 de solução de lavagem inicial I em alíquotas de 10 cm^3 e de forma paralela foi preparada a lisozima para sua ligação em 5 cm^3 de solução de acoplamento em uma concentração de 5 mg cm^{-3} . O volume gerado pela resina depois da lavagem e seu natural inchamento é de aproximadamente $1,5 \text{ cm}^3$ (tem-se uma

previsão de 3 cm³ por grama de resina). A solução contendo o ligante de lisozima foi colocada em contato com a resina por 2 horas em um homogeneizador. Posteriormente a resina foi lavada com mais 5 cm³ de solução de acoplamento sem lisozima para retirar os ligantes não fixados na matriz. A resina foi posta em contato com 10 cm³ de solução de bloqueio durante a noite para bloquear os grupos amina ainda ativos na matriz da resina. Finalmente a resina foi lavada em um ciclo de três etapas, de 5 cm³ a cada passo, trocando a cada vez as soluções de lavagem A e B. A resina foi empacotada em uma coluna de vidro HR5/5 *General Electric* mediante gravidade. Na Figura 5 (b) se mostra a coluna contendo a resina. Posteriormente a coluna foi conectada com o FPLC e foi estabilizado o leito usando um fluxo de 1 cm³ min⁻¹ em um tempo de 1 hora. A solução usada no procedimento de estabilização foi o tampão de lavagem B de pH 8.

4.3.2.2. Obtenção de volume de retenção V_R

Os experimentos foram feitos a pH constante de 8,50 e temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Este valor do pH foi escolhido por ser um valor médio que pode ser atingido para todos os sais considerados e suas soluções tampão (Figura 12). Para as medições são preparados 200 cm³ de solução tampão para cada ponto equivalente a uma concentração específica de succinato de sódio, citrato de sódio ou tartarato de sódio. O pH das soluções é fixado e tampão é formado usando diferentes proporções de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ e ácido clorídrico 1 mol L⁻¹.

A vazão usada nas medições foi de $0,5 - 0,75 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Foi programado o seguinte método de análise no equipamento tendo em conta um volume de coluna de $1,5 \text{ cm}^3$: primeiro a coluna foi estabilizada com 10 volumes da solução tampão usada no experimento em questão. Imediatamente depois foram injetados os $50 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra que foi eluída com 3 volumes de coluna. Finalmente, a coluna foi lavada com 10 cm^3 de uma solução 100 mmol L^{-1} do sal que contém o tampão principal. Na Figura 6 tem-se o esquema experimental resumido do procedimento na medição do volume de retenção.

4.3.2.3. Medição do coeficiente de volume vazio V_0

Uma segunda coluna foi empacotada com resina e bloqueada unicamente com Tris-base, ficando livre de lisozima. O procedimento do bloqueio da resina foi o mesmo descrito para acoplamento do ligante, excetuando-se o passo em que a lisozima é ligada à matriz da resina. Duas soluções foram eluídas em triplicata na coluna: uma primeira de acetona $1 \text{ \% v/v}$ que gera um dado de volume vazio V'_A e uma segunda solução de lisozima $6,5 \text{ mg cm}^{-3}$ em um tampão de pH 8,0 de succinato de sódio, que gera um dado de volume vazio V'_P . A solução de succinato de sódio usada como tampão tem uma concentração de $0,016 \text{ m/m}$, e corresponde ao mesmo valor do ponto mais diluído nos experimentos de solubilidade com o sal. O succinato tem íons de menor tamanho dentre os três sais, permitindo maior mobilidade da proteína nos poros da resina, o que gera um dado mais confiável do volume vazio. O coeficiente é calculado pela divisão entre ambos os volumes V'_P/V'_A .

Figura 6. Esquema experimental para a obtenção do volume de retenção V_R no cálculo do segundo coeficiente virial da lisozima em soluções de sal a 25°C e pH 8,50

4.3.2.4. Cálculo do B_{22}

No capítulo introdutório abordou-se o conceito de segundo coeficiente virial além dos aspectos físicos em sua medição usando cromatografia líquida (QUIGLEY et al., 2013; TESSIER; LENHOFF; SANDLER, 2002; TESSIER; SANDLER; LENHOFF, 2004; TESSIER et al., 2002). Na Equação 4.1. é apresentada a relação do segundo virial com as variáveis experimentais. Na Equação 4.2 é apresentada a relação do volume de retenção com o volume vazio no cálculo do coeficiente cromatográfico k' .

$$B_{22} = \frac{N_A}{M_p^2} \left(B_{HS} - \frac{k'}{\rho_s \phi} \right) \quad (4.1)$$

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (4.2)$$

$$B_{HS} = \frac{2}{3}\pi r^3 \quad (4.3)$$

O coeficiente de interação de esferas rígidas B_{HS} é calculada a partir do raio da lisozima ($r = 1,55$ nm) como se mostra na Equação 4.3. Anteriormente, apresentou-se o procedimento no qual uma quantidade de lisozima é fixada na matriz da resina, e várias soluções tampão são usadas. Para o cálculo da densidade molecular da lisozima fixada ρ_s mede-se a concentração da lisozima na solução de acoplamento e sucessivamente nas soluções de lavagem. Por diferença nos balanços de massa é possível conhecer a quantidade imobilizada e finalmente tendo em conta a quantidade de resina usada se calcula o número de moléculas por metro quadrado de superfície.

Tabela 2. Coeficiente área volume de resinas cromatográficas tipo sepharose

R(nm)	ϕ (m ² cm ⁻³)		ϕ médio (m ² cm ⁻³)
	CM sepharose FF ^a	SP sepharose FF ^b	
1,55	44,304	40,772	42,5
4,65	33,353	31,314	32,3

a,b – Parâmetros obtidos usando dados experimentais de Dephillips et al. (DEPHILLIPS; LENHOFF, 2000)

O parâmetro de relação área/volume da resina ϕ , depende exclusivamente das propriedades físicas da resina. Seu valor é estimado como é mostrado na Tabela 2, tendo em conta as propriedades das resinas CM sepharose FF e a SP sepharose FF que são muito próximas à resina CNBr

active sepharose 4B. Utiliza-se o valor de 4,65 nm, equivalente a três diâmetros, que representa a área acessível nos poros da resina, assumindo duas monocamadas de moléculas afixadas na matriz e o espaço disponível equivalente ao raio de uma molécula livre. Calcula-se por interpolação linear um valor de φ de 32,3 m² cm⁻³ o qual corresponde a um comportamento intermediário entre as duas resinas conhecidas (DEPHILLIPS; LENHOFF, 2000).

4.3.3. Janela de cristalização

A janela de cristalização proposta é uma matriz em duas variáveis, na qual se identificam simultaneamente os valores de segundo coeficiente virial e sobressaturação nos quais é gerada ou não um precipitado, que pode ser cristalina ou amorfa. Experimentalmente pode-se reescrever S_o como a distância entre a concentração inicial da proteína na fase líquida C_p e a concentração do equilíbrio C_{pe} , como se mostra na Equação (4.4).

$$S_o \cong \frac{C_p}{C_{pe}} \quad 4.4$$

Planejou-se uma matriz experimental do tipo prato de cultivo (*tissue plate*), como se mostra na Figura 7. Nesta montagem pode-se avaliar em cada um dos pratos simultaneamente duas variáveis, S_o e B_{22} , em 96 poços (48 x duplicata) com um volume máximo de 200 µL. É necessário conhecer as quantidades das soluções de lisozima, sal e tampão em cada um dos poços para obter as condições desejadas. O seguinte procedimento foi utilizado:

1. Fixou-se um vetor de valores de B_{22} e calculou-se os valores de Γ usando o modelo de Ruppert et al (Equação 5.3).

2. Com a equação de Cohn (Equação 1.1) e os valores de Γ se calcularam os valores de C_{pe} . Os valores de Γ correspondem indiretamente às concentrações de sal w_{sal} .
3. Fixou-se um vetor de valores de S_o . Com estes valores e C_{pe} , são calculadas as concentrações iniciais de proteína C_p usando a Equação 4.4.
4. Os valores de C_p e w_{sal} são usados nos balanços de massa para calcular as quantidades mássicas das soluções de lisozima, sal e tampão para cada um dos poço.

Figura 7. Matriz experimental com o B_{22} na horizontal e S_o na vertical, do tipo prato de cultivo (*tissue plate*), com 96 poços (48 x duplicata: linha de divisão vermelha), 200 μ L x poço.

Foram preparadas soluções de lisozima 0,240 m/m, succinato de sódio 0,198 m/m, citrato de sódio 0,298 m/m e tartarato de sódio 0,276 m/m, a pH 8,50, e foram colocadas em cada um dos poços nas quantidades antes

calculadas com auxílio de uma micropipeta. Cada um dos pratos foi fechado e mantido em estufa a 25°C por 8 dias (tempo estimado de equilíbrio)

Depois de atingir o tempo de equilíbrio, realizaram-se imagens individuais de cada um dos poços dos pratos de cultivo (*tissue plate*, Figura 7), o que permitiu a identificação da fase cristalina e/ou amorfa, ou sua ausência, em cada uma das condições da matriz experimental. As fotografias foram obtidas com o microscópio *Leica* EZ4D com aumento de 35x. O software de análise de imagem LAS EZ V 2.0.0, incluso com o equipamento, permite fazer uma análise manual do tamanho de partícula. Na Figura 8 mostra-se esquematicamente um resumo do procedimento descrito para a obtenção dos dados de tamanho e a identificação de fases.

Figura 8. Esquema experimental para a obtenção dos dados da janela de cristalização da lisozima em soluções de succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio a 25 °C e pH 8,50

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.Determinação do tempo de equilíbrio em soluções com cloreto de sódio

Para determinar o tempo necessário para os experimentos de precipitação com sais biodegradáveis, realizaram-se experimentos de precipitação com cloreto de sódio a 25°C e diferentes valores de pH: 4,38, 7,00 e 10,20, numa concentração fixa de sal de 0,13 m/m. Os experimentos foram realizados em triplicata. Em cada experimento, tomaram-se amostras em intervalos aproximadamente constantes de tempo. Na Figura 9 são apresentados os perfis de concentração de lisozima na fase sobrenadante. As concentrações iniciais de lisozima foram diferentes em cada experimento, sendo de 12 mg cm⁻³ para o pH 10,20, e de 9 mg cm⁻³ para os valores de pH de 4,38 e 7,00.

Em pH 4,38 e 7,00, observa-se uma diminuição na concentração de lisozima no sobrenadante depois de 5 horas. Em pH 10,20, um decréscimo equivalente ocorre apenas após 15 h. Pode-se considerar o momento em que começa o decréscimo acentuado na concentração de proteína no sobrenadante como sendo o tempo de indução na formação de núcleos. Após aproximadamente 30 h, para os três valores de pH, a concentração remanescente de proteína na fase líquida é de aproximadamente 2 mg cm⁻³. Com um período de 70 h a concentração diminui até aproximadamente 1 mg após o qual o equilíbrio é atingido. A concentração final nos três casos chega a

valores próximos de 1 mg cm^{-3} , depois de um tempo de 100 h (aproximadamente 4 dias). O desvio padrão aumenta na região de indução de formação núcleos, que é considerada uma área de transição, e diminui para tempos maiores a 20 h em valores perto do equilíbrio.

Figura 9. Perfis de concentração de lisozima em função do tempo da fase sobrenadante em soluções de cloreto de sódio a 25°C e pH constante de 7,00, 4,38 e 10,2 (---): guias para os olhos)

Em soluções de sulfato de amônio e temperatura ambiente conhece-se o tempo de indução em algumas condições: em pH 8 e força iônica $6,2 \text{ mol L}^{-1}$ o tempo de indução é de 5 h, em força iônica 7 mol L^{-1} é de 12h, e em força iônica $7,9 \text{ mol L}^{-1}$ é de 24 h. A concentração de proteína no sobrenadante é menor que 2 mg cm^{-3} em força iônica de $6,2 \text{ mol L}^{-1}$ após 19h, em força iônica 7 mol L^{-1} após 24 h, e em força iônica $7,9 \text{ mol L}^{-1}$ após 48 h. Neste pH 8,00,

para as três forças iônicas, a concentração de proteína no sobrenadante é inferior a 1 mg cm^{-3} após 72 h. Além disso, em soluções com sulfato de amônio a pH 4, temperatura ambiente e força iônica de $4,8 \text{ mol L}^{-1}$, o tempo de indução é menor que 2 h, observando-se uma estabilização da concentração da proteína em 5 mg cm^{-3} depois de 48 h (CHENG et al., 2006).

Assim, observa-se que tanto em cloreto de sódio como em sulfato de amônio, o tempo mínimo para atingir o equilíbrio é superior às 70 h. Desse modo, para os experimentos com os sais investigados (succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio) o tempo de equilíbrio foi superestimado em 8 dias, de modo a garantir que a condição de equilíbrio termodinâmico tenha sido atingida e eliminar os possíveis aspectos cinéticos característicos de cada sistema.

5.2. Solubilidade em função da concentração de cloreto de sódio

Para validação do procedimento experimental, procurou-se reproduzir a série de valores de solubilidade da lisozima em soluções com cloreto de sódio obtidos por Watanabe (WATANABE et al., 2009) a 25°C e pH 7,00, utilizando-se a metodologia relatada anteriormente. Como se pode verificar na Figura 10, as curvas de solubilidade são muito próximas. Complementarmente, realizaram-se medidas de solubilidade de lisozima em soluções contendo NaCl a pH de 10,20 e 25°C . Observam-se valores de solubilidade entre 3 e 1 mg cm^{-3} em concentrações inferiores a 0,14 m/m de NaCl, portanto valores de solubilidade inferiores aos obtidos nos experimentos em pH 7,0. Em

concentrações de sal superiores a 0,14 m/m de NaCl se nota uma estabilização na tendência das três series de dados e se observa pouca influência do pH na solubilidade: em todos os casos, a solubilidade chega a valores inferiores a 0,5 mg cm⁻³ de lisozima na fase líquida.

Figura 10. Solubilidade da lisozima em soluções com cloreto de sódio a 25°C e pH constante de 7,00 e 10,00 (----): guias para os olhos)

5.3. Solubilidade da lisozima em função da concentração de succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio

Na Figura 11 apresentam-se os resultados obtidos para a solubilidade da lisozima em função da concentração dos sais succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio. Todos os experimentos foram realizados a 25°C e a pH constante, a saber: para o citrato de sódio, pH 7,0, para o tartarato de sodio, pH's 10,60, 11,37 e 5,94, e para o succinato de sódio, pH's 10,20, 11,37

e 6,43. O limite superior da concentração de sal em cada caso era sua solubilidade em água na temperatura de 25 °C.

Figura 11. Solubilidade de lisozima em soluções de sais biodegradáveis a 25°C e pH constante: (a) succinato de sódio, (b) tartarato de sódio, (c) citrato de sódio ((·····): guias para os olhos)

Observou-se que os três sais são capazes de induzir o *salting out* da lisozima, ou seja, de reduzir a solubilidade desta enzima com o aumento da concentração de sal. Observou-se também que o succinato de sódio é o sal com maior capacidade de reduzir a solubilidade desta proteína, seguido pelo tartarato de sódio e finalmente pelo citrato de sódio, como pode ser visto comparando-se a solubilidade em soluções com a mesma concentração de sal. Tomando como referência o valor de 20 mg cm⁻³ de concentração de lisozima, pode-se observar que o valor foi atingido para concentrações mais baixas de succinato de sódio (aproximadamente 0,045 m/m) que de tartarato de sódio (aproximadamente 0,1 m/m) ou citrato de sódio (aproximadamente 0,18 m/m).

O citrato de sódio parece apresentar uma tendência em solubilizar a lisozima em valores mais baixos de concentração (inferiores a 0,15 m/m). Entretanto, o chamado *salting in* (isto é, um aumento da solubilidade com o aumento da concentração de sal) não foi observado experimentalmente, principalmente em razão da alta solubilidade da lisozima em solução isenta de sal. Em baixas concentrações de sal, isto é, na região na qual se poderia esperar um aumento de solubilidade pela presença do sal, o succinato de sódio em pH 11,70 (próximo ao ponto isoelétrico da lisozima) solubiliza 110 mg cm^{-3} de lisozima, concentração maior até que a observada em soluções de citrato de sódio (aproximadamente 70 mg cm^{-3} em pH 7,00). Esse comportamento não é exclusivo dos sais investigados nesse trabalho: por exemplo, o sulfato de amônio consegue solubilizar 120 mg cm^{-3} e o sulfato de sódio, 135 mg cm^{-3} em pH 7,00 (WATANABE et al., 2009). Poucos estudos relatam o efeito de *salting-in* para a lisozima; sabe-se, de maneira geral, que esse fenômeno não ocorre em soluções contendo o íon Cl^- (RETAILLEAU; RIÈS-KAUTT; DUCRUIX, 1997). Porém a alta solubilidade da lisozima em água pura ($>10 \text{ mg cm}^{-3}$) torna difícil a observação da ocorrência de *salting in*.

5.4. Solubilidade em função do pH em soluções de succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio

Os dados da solubilidade da lisozima em função do pH são mostrados na Figura 12. Estes experimentos foram realizados à temperatura de 25°C e força iônica constante equivalente à concentração de sal próxima à correspondente saturação em água (citrato de sódio, 0,298 m/m, succinato de sódio, 0,198

m/m, e tartarato de sódio, 0,276 m/m). O objetivo desse estudo é avaliar influência do pH na solubilidade para a região de altas concentrações de sal onde acontece o *salting-out*, na qual os valores de solubilidade são mais baixos.

Figura 12. Solubilidade de lisozima em função do pH a 25°C e força iônica constante: (▲) succinato de sódio, (■) tartarato de sódio, (●) citrato de sódio, ((·····)): guias para os olhos)

Os valores da solubilidade da lisozima em os máximos valores da concentração de sal a pH constante, mostrados na seção anterior, correspondem às condições dos experimentos de solubilidade em função do pH, a força iônica constante. A vizinhança dos valores em ambos os casos constata a validade dos dados obtidos para os três sais estudados.

O tartarato de sódio apresenta um mínimo em pH ácido (próximo a 4,00), o que indica que o ânion, nessa condição, passa a atuar como contra-íon. Como já apresentado, para valores de pH muito abaixo do ponto isoelétrico, os sais podem seguir uma série inversa de Hofmeister, em função principalmente deste fato (WATANABE et al., 2009).

Para um valor de comparação de pH próximo a 10,30, o succinato de sódio tem a maior capacidade de induzir o *salting out*, seguido pelo citrato de sódio que solubiliza 4 vezes mais lisozima e o tartarato de sódio, 15 vezes mais. Todos os sais tendem a um mínimo de solubilidade perto do ponto isoelétrico da lisozima (que corresponde a um pH de 11,30).

5.5. Efeito *salting out*

A solubilidade de lisozima em função da força iônica pode ser expressa por meio da equação de Cohn (MELANDER; HORVÁTH, 1977), apresentada na Equação 1.1. Esta expressão relaciona o logaritmo da solubilidade da proteína com a força iônica Γ , que por sua vez é uma medida da concentração de sal:

$$\ln(S) = \beta - K_s \Gamma \quad 1.1$$

Neste caso, a solubilidade S é expressa em fração mássica, para que não se extraia o logaritmo de uma grandeza dimensional. O parâmetro K_s é chamado de constante de *salting out*, e é o parâmetro que define quantitativamente a capacidade de um sal em induzir este efeito.

Na Figura 13 são apresentados os dados de solubilidade em escala

logarítmica, bem como os resultados do ajuste por meio da equação de Cohn, para os diferentes sais e diferentes valores de pH. Na Tabela 3 são apresentados os resultados numéricos obtidos no ajuste dos parâmetros para a equação de Cohn para os três sais considerados. Além disso, também se incluem os parâmetros da equação de Cohn para a solubilidade de lisozima em outros sais, para que se possa estabelecer um termo de comparação. Observa-se que o valor máximo absoluto da constante K_s de *salting out* é obtido para o succinato de sódio em um pH de 11,70, maior que o ponto isoelétrico, enquanto diminuem para os pH 10,20 e 6,43, que são inferiores ao ponto isoelétrico. O K_s obtido para o cloreto de sódio, que é o sal de referência conhecido, é inferior a obtido com o succinato de sódio para os três valores de pH. É possível falar de uma série inversa de Hofmeister experimental para a lisozima com base nos valores K_s , que resultam na ordem: succinato de sódio > cloreto de sódio > carbamato de amônio > tartarato de sódio > sulfato de sódio > sulfato de amônio > citrato de sódio. O pH de referência para esta série inversa de Hofmeister é 7,00, valor que se situa dentro da região na qual o pH tem pouco ou nenhum efeito na solubilidade da proteína, como apresentado na seção anterior. A série inversa de Hofmeister sugerida é oposta, e de mesma ordem que a série liotrópica da lisozima em sistemas de duas fases líquidas com PEG contendo sais, apresentada anteriormente ($\text{PO}_4^{-3} > \text{citrato}^{-3} > \text{SO}_4^{-2} > \text{CO}_3^{-2} > \text{tartarato}^{-2} > \text{succinato}^{-2} > \text{OH}^- > \text{formiato}$ (ZASLAVSKY, 1995)).

Teoricamente, a influência do pH no valor do K_s deveria ser nula ou quase desprezível, enquanto que para o parâmetro β essa influência deveria ser grande. Mudanças no pH deveriam fazer com que a curva de solubilidade se movesse verticalmente sem alterar significativamente sua inclinação. Isto é

numericamente corroborado no caso do succinato de sódio, que mostra o valor mais negativo de β em pH de 6,43, que é mais ácido, seguido dos valores de β em pH de 10,20 e 11,70.

Na Figura 13 (d), na qual se apresentam os resultados obtidos para o citrato de sódio, pode-se observar um distanciamento dos valores experimentais da linha prevista pela equação de Cohn para forças iônicas inferiores a 3 mol kg⁻¹. Novamente, esse comportamento parece indicar a ocorrência de *salting-in*, considerando-se o valor positivo de β (Tabela 3). Entretanto, em senso estrito não foi possível observar a ocorrência do *salting-in*.

(a)

(b)

(c)

(d)
Figura 13. Solubilidade linearizada de lisozima em função da força iônica em soluções dos sais a 25°C: e pH constante (a) cloreto de sódio, (b) succinato de sódio, (c) tartarato de sódio, (d) citrato de sódio e diferentes pH

Finalmente, pode-se concluir que a constante de *salting out* para o succinato de sódio é da mesma ordem de grandeza que para outros sais usados na precipitação de lisozima (WATANABE et al., 2009), o que sugere estabelecer este sal como uma alternativa promissora para agente precipitante dentro das três possibilidades consideradas. Por outro lado, o citrato de sódio é a alternativa com o menor valor de K_S e maior valor de β , o que torna esse sal uma alternativa menos atraente a ser considerado efetivamente como agente precipitante.

Tabela 3. Constantes de *salting out* da lisozima a 25°C em diferentes sais e pH

Sal	pH	β^a	$K_s / \text{kg mol}^{-1}$
Succinato de sódio	6,43	-2,413	1,581
	10,20	-2,290	1,801
	11,17	-2,123	1,938
Tartarato de sódio	5,94	-2,995	0,827
	10,60	-3,147	0,734
	11,37	-2,931	0,819
Citrato de sódio	7,00	0,412	0,554
Cloreto de sódio ^b	7,00	-4,294	1,277
Sulfato de sódio ^b	7,00	-2,226	0,751
Sulfato de amônio ^b	7,00	-1,042	0,668
Carbamato de amônio ^c	7,00	-5,701	0,929

a – Valores de β foram obtidos considerando que a solubilidade é expressada em fração mássica (adimensional)

b – Parâmetros obtidos usando dados experimentais de Popova et al. (POPOVA et al., 2008) e Watanabe et al. (WATANABE et al., 2009)

c – Parâmetros obtidos usando dados experimentais de Watanabe et al. (WATANABE et al., 2010)

5.6. Segundo coeficiente de interação virial B_{22}

Na Figura 14 são apresentados os resultados obtidos para o segundo

coeficiente virial em função da força iônica para o succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio, a 25°C e pH de 8,50. Cada ponto representa a meia de uma serie de três repetições.

Figura 14. Segundo coeficiente virial de lisozima em função da força iônica em soluções dos sais a 25°C e pH 8,50: (a) succinato de sódio, (b) tartarato de sódio, (c) citrato de sódio. Modelos: Franco et al. (FRANCO; FILHO, 2011) (—), Hass et al. (HAAS; DRENT; WILSON, 1999) (----), Guo et al. (GUO et al., 1999) (.....), Ruppert et al. (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001) (-.-.-.-). Desvio padrão (barras)

Além dos dados experimentais, apresentam-se também os ajustes realizados para os modelos teóricos de Franco e Pessoa Filho (FRANCO; FILHO, 2011), Haas et al. (HAAS; DRENT; WILSON, 1999), Guo et al. (GUO et al., 1999) e Ruppert et al. (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001) detalhados na seção 3 (Revisão Bibliográfica). Com exceção do modelo de Franco e Pessoa Filho (FRANCO; FILHO, 2011), os demais modelos relacionam o segundo coeficiente virial diretamente à solubilidade da lisozima. Nesse caso, para se obter a relação entre o segundo coeficiente virial B_{22} e a força iônica Γ (ou, implicitamente, a concentração de sal), insere-se diretamente nesses modelos a equação de Cohn (Equação 1.1). Os valores de

K_s e β oriundos da equação de Cohn são parâmetros ajustáveis nos modelos. As relações finais são apresentadas na Equação 5.1 para o modelo de Haas et al. (HAAS; DRENTH; WILSON, 1999) na Equação 5.2 para o modelo de Guo et al. (GUO et al., 1999), e na Equação 5.3 para o modelo de Ruppert et al. (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001). A Equação 5.4, que apresenta o modelo de Franco et al. (FRANCO; FILHO, 2011), permanece inalterada.

$$B_{22} = \frac{4}{M_w \rho} \left\{ 1 - A \left[\left(\frac{\exp(\beta - K_s \Gamma)}{\left(\frac{M_w}{18} \right)} \right)^{-\left(\frac{2}{z} \right)} - 1 \right] \right\} \quad 5.1$$

$$B_{22} = \frac{-\Delta\mu_2}{RT} \frac{1}{2000 M_p \exp(\beta - K_s \Gamma)} - \frac{\ln 1000 + (\beta - K_s \Gamma)}{2000 M_p \exp(\beta - K_s \Gamma)} \quad 5.2$$

$$B_{22} = \frac{1}{2000 M_p \exp(\beta - K_s \Gamma)} \left[A_c - (1 - K) \ln \left(\frac{1000 V_w}{M_p} \exp(\beta - K_s \Gamma) \right) \right] \quad 5.3$$

$$- \frac{\bar{V}_p^\infty}{M_p^2} - \frac{dn/dc_p}{n_0 M_p}$$

$$\ln \left(\frac{B_{22}}{B_{22}^*} \right) = K_s (\Gamma - \Gamma^*) \quad 5.4$$

Na Equação 5.5 apresenta-se a função de minimização usada no ajuste dos modelos e no cálculo dos parâmetros. Para a obtenção dos parâmetros ótimos foi usado um algoritmo de minimização do tipo derivada livre (LAGARIAS et al., 1998) no ajuste multi-paramétrico feito com os dados experimentais. Os parâmetros ajustados para os experimentos de B_{22} da

lisozima a 25°C e pH 8,50 em soluções de succinato de sódio são apresentados na Tabela 4, em soluções de tartarato de sódio na Tabela 5 e em soluções de citrato de sódio na Tabela 6.

$$\min \left\{ \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{B_{22}^{EXP}{}_i - B_{22}^{CAL}{}_i}{B_{22}^{EXP}{}_i} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \right\} \quad 5.5$$

Tabela 4. Parâmetros de ajuste dos modelos para o segundo coeficiente virial da lisozima em soluções de succinato de sódio a 25°C e pH 8,50

Modelo	Parametro						R ²
	β	K _s	A	z	$\Delta\mu$	A _c	
Haas et al. (HAAS; DRENTH; WILSON, 1999)	0,0151	0,8998	0,0001	1,3449	-	-	0,9856
Guo et al. (GUO et al., 1999)	-	2,4945	-	-	0,1466x10 ⁵	-	0,9927
	5,5726						
Ruppert et al. (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001)	0,7582	1,0574	-	-	-	-	0,9924
						0,9789x10 ⁴	1,0519 x10 ⁴
Franco e Filho. (FRANCO; FILHO, 2013)	-	1,827	-	-	-	-	0,9902

Tabela 5. Parâmetros de ajuste dos modelos para o segundo coeficiente virial da lisozima em soluções de tartarato de sódio a 25°C e pH 8,50

Modelo	Parametro							R ²
	β	K _s	A	z	$\Delta\mu$	A _c	K	
Haas et al. (HAAS; DRENTH; WILSON, 1999)	0,0141	0,3513	0,0001	1,2340	-	-	-	0,5756
Guo et al. (GUO et al., 1999)	-5,6186	0,7579	-	-	1,159 x10 ⁵	-	-	0,63
Ruppert et al. (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001)	1,1603	0,8085	-	-	-	-3,711 x10 ⁴	0,9998	0,6497
Franco e Filho. (FRANCO; FILHO, 2013)	-	0,8133	-	-	-	-	-	0,7414

Tabela 6. Parâmetros de ajuste dos modelos para o segundo coeficiente virial da lisozima em soluções de citrato de sódio a 25°C e pH 8,50

Modelo	Parametro							R²
	β	K _s	A	z	Δμ	A _c	K	
Haas et al. (HAAS; DRENTH; WILSON, 1999)	0,0062	0,4558	0,0001	1,3912	-	-	-	0,7153
Guo et al. (GUO et al., 1999)	-2,3428	1,0205	-	-	4,3122 x10 ⁵	-	-	0,9072
Ruppert et al. (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001)	2,2881	1,1396	-	-	-	-1,2083 x10 ⁴	1,3731	0,9264
Franco e Filho. (FRANCO; FILHO, 2013)	-	0,5664	-	-	-	-	-	0,7201

A fidelidade dos ajustes é quantificada considerando-se o coeficiente de correlação R^2 , que se mostra na Equação 5.8, sendo o melhor ajuste aquele mais próximo da unidade. Para isso são calculados os parâmetros da soma do quadrado dos resíduos $SQ_{residuos}$ com a Equação 5.6 e a soma total dos quadrados em relação a média SQ_{total} com a Equação 5.7. O modelo que apresentou em média os melhores ajustes foi o de Ruppert et al (RUPPERT; SANDLER; LENHOFF, 2001). Mas no caso do tartarato de sódio, o modelo de Franco e Filho (FRANCO; FILHO, 2013) mostrou melhor ajuste.

$$SQ_{residuos} = \sum_{i=1}^n (B_{22}^{EXP}{}_i - B_{22}^{CAL}{}_i)^2 \quad 5.6$$

$$SQ_{total} = \sum_{i=1}^n (B_{22}^{EXP}{}_i - \overline{B_{22}^{EXP}})^2 \quad 5.7$$

$$R^2 = 1 - \frac{SQ_{residuos}}{SQ_{total}} \quad 5.8$$

Existem poucos dados na literatura sobre o segundo coeficiente virial em função da concentração de sal para a lisozima, e nenhum para os sais estudados nesse trabalho. São conhecidos os valores de B_{22} para esta proteína em cloreto de sódio (TESSIER; LENHOFF; SANDLER, 2002). Nesse caso, observam-se valores positivos para forças iônicas inferiores a $0,35 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,50, e valores negativos em pH 7,00 e pH 9,00 – em todos os casos, considerando-se uma força iônica máxima de $0,8 \text{ mol L}^{-1}$. Da mesma maneira, os valores de B_{22} para lisozima em brometo de magnésio foram estudados para forças iônicas inferiores a $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ (TESSIER; LENHOFF; SANDLER, 2002), exibindo valores positivos para forças iônicas inferiores a $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ para pH 7,80. Neste trabalho, o succinato de sódio é o sal que resultou em valores mais

negativos, com um mínimo de $-3,6 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ em força iônica de $2,13 \text{ mol L}^{-1}$, seguido por citrato de sódio com $-3,14 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ a $3,72 \text{ mol L}^{-1}$ e, finalmente, pelo tartarato de sódio com $-2,45 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ em $1,65 \text{ mol L}^{-1}$.

Os valores experimentais de B_{22} para o citrato de sódio, apresentados na Figura 14 (c), expõem uma leve tendência de aumento, sem chegar, entretanto, a valores positivos (repulsivos), na faixa de força iônica de 0 a $1,5 \text{ mol L}^{-1}$, com um máximo de $-0,232 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ em força iônica de $1,47 \text{ mol L}^{-1}$. Isto está relacionado aos valores obtidos na solubilidade da lisozima em soluções de citrato de sódio (Figura 13 (d)), que apresentaram uma tendência que sugere o efeito *salting in*. Entretanto, é necessário lembrar que não se observou inequivocamente sua presença, nesse trabalho ou em artigos já publicados na literatura (RETAILLEAU; RIÈS-KAUTT; DUCRUIX, 1997).

Experimentalmente, as medições feitas em concentrações próximas do valor de saturação do sal em água apresentaram múltiplas complicações operacionais como a obtenção de dados de V_R erráticos e com pouco sentido devido a não interação da fase móvel com a fase estacionária. Esta dificuldade se corrobora ao observar o aumento no desvio padrão dos valores experimentais de B_{22} com o incremento da força iônica.

5.7. Experimentos de cristalização

A obtenção de cristais depende do valor do segundo coeficiente virial e do valor da sobressaturação; considera-se que o fato do segundo coeficiente virial

situar-se em uma região específica é condição necessária, mas de modo algum suficiente, para que cristais sejam obtidos. Para sobressaturações muito altas, a velocidade de nucleação será muito alta e serão obtidos precipitados amorfos mesmo que o valor de B_{22} seja favorável à formação de cristais. O mapeamento das condições em que foram obtidos cristais, em função da sobressaturação e do segundo coeficiente virial do succinato de sódio e do tartarato de sódio a 25°C e pH 8,50 é apresentado na Figura 15. Nela pode-se observar diferenças aparentes nas densidades dos pontos experimentais, o que depende unicamente do número de experimentos realizados em uma determinada região de valores. Isso quer dizer que existe mais de uma série de ensaios para cobrir o total da área estudada. Os resultados do citrato de sódio não são apresentados, já que para esse sal obteve-se uma fase amorfa para valores de B_{22} superiores a $-2,3 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$, valor correspondente a uma força iônica aproximada de 3 mol kg^{-1} , o limite inferior do diagrama de solubilidade em que se observa um comportamento *salting out* (Figura 13 (d)). Experimentos fora desta região dificilmente apresentariam a formação de algum precipitado, devido à alta solubilidade da proteína.

Os limites clássicos relatados na literatura para a janela de cristalização para proteínas em função única do B_{22} são um máximo de 0 e um mínimo de $-0,8 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$, conforme o trabalho pioneiro de George e Wilson (GEORGE; WILSON, 1994). São conhecidos resultados específicos para a lisozima em cloreto de sódio e um pH de 4,00 e 25°C, com limites de B_{22} entre $-1,00 \times 10^{-3}$ e $-0,22 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. Em experimentos semelhantes àqueles realizados nesse trabalho, a fase amorfa aparece mesmo para valores de B_{22} de $-0,32 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ e sobressaturação de 15 (definida como a razão

entre a concentração proteica e a solubilidade), e valores de B_{22} de $-1 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ e sobressaturação de 8 (WANKA; PEUKERT, 2011).

Para a lisozima em soluções de succinato de sódio observou-se a formação de cristais para valores de B_{22} entre $-0,2 \times 10^{-3}$ e $-2,95 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$, e para soluções de tartarato de sódio, cristalização foi observada para valores de B_{22} entre $-0,6 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ e $-4,3 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. A fase amorfa para soluções de succinato de sódio não foi identificada em nenhum dos experimentos realizados. Para o tartarato de sódio, foi observada a formação de sólido amorfo para valores de B_{22} acima de $-3 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ para valores altos de sobressaturação maiores a 7,5. A sobressaturação máxima para a ocorrência de cristalização diminuiu até um S_o de 2,6 em um B_{22} de $-4,4 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$.

O valor mínimo da sobressaturação S_o^{min} em que ocorre a formação de precipitado (usualmente cristalino, para soluções de tartarato e succinato de sódio nas condições estudadas) corresponde fisicamente à concentração de proteína que delimita a região conhecida como região de metaestabilidade, que é controlada pela velocidade de formação de núcleos. Nessa região a cinética de nucleação é suficientemente baixa, devido à baixa concentração de proteína, o que restringe a formação de precipitado em maior grau mesmo que a cinética de crescimento de cristal.

(a)

(b)

Figura 15. Janela de cristalização da sobressaturação em função do segundo coeficiente virial a 25°C e pH 8,50: (a) succinato de sódio e (b) o tartarato de sódio; (×) nenhuma fase sólida, (◆) fase cristal, (○) fase amorfa, (----) limites aparentes da janela

O succinato de sódio apresentou um S_o^{min} constante de aproximadamente 2 para todos os valores medidos de B_{22} (0 e $-3 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$). No caso do tartarato de sódio, o S_o^{min} fica constante em 3,4 até um B_{22} de $-1,5 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$, situação em que o valor de S_o^{min} diminuiu para 1,9 em um B_{22} de $-3 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. Isso quer dizer que a concentração do sal, quando superior a este valor, começa a ter maior influência na cinética de crescimento.

Nas Tabelas 7 e 8, se apresentam as matrizes experimentais de fases, nas quais se especifica o tamanho do cristal no caso da fase cristalina, para o succinato de sódio e tartarato de sódio, respectivamente, a 25°C e pH de 8,50. Para cada um dos poços foi determinado o tamanho dos cristais manualmente em 3 medições aleatórias com ajuda de software calibrado, e calculada a média aritmética das medidas. Os tamanhos dos cristais apresentados correspondem à média aritmética dos dados e suas duplicatas experimentais.

Sabe-se que o tamanho de partícula está ligado diretamente ao tempo de indução e às condições iniciais nas quais se produz o precipitado. De modo geral, tanto para o succinato de sódio quanto para o tartarato de sódio, observam-se alguns comportamentos semelhantes. Inicialmente, exceto em valores mais baixos de sobressaturação, o tamanho do cristal é independente (ou quase) do grau de sobressaturação, mas dependente do segundo coeficiente virial. Efetivamente, em situações próximas à curva de metaestabilidade, os cristais formados são significativamente *menores* que em sobressaturações mais altas. Em sobressaturações mais altas, o tamanho do cristal passa a ser independente do grau de sobressaturação – as variações observadas são mais devidas a desvios experimentais e variações da escolha dos cristais analisados do que propriamente mostram uma tendência.

Por outro lado, observa-se que valores menores de segundo coeficiente virial (ligados a concentrações maiores de sal) levam a tamanhos maiores de cristais, de maneira geral (consideradas as condições em que efetivamente são formados cristais). Isso pode ser observado para ambos os sais: no caso específico do succinato de sódio, podem-se distinguir as regiões superior e inferior a $-1 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$.

De maneira geral, os dois diagramas mostram que os dois sais são bastante adequados para a cristalização de lisozima. O fato de que, em concentrações de sal mais altas (situação em que a solubilidade é menor) serem obtidos cristais de tamanho praticamente independente da concentração salina mostra que esses sais são adequados para a cristalização de lisozima. Embora não existam informações sobre o comportamento desses sais na precipitação de cristalização de outras proteínas, eles efetivamente se colocam como alternativas promissoras nesse processo.

Finalmente, a formação de fase amorfa em altas sobressaturações e altas concentrações de sal é devida a uma alta velocidade de nucleação, a qual é consequência mesma de uma alta interação molecular entre as moléculas proteicas, ligada a um valor altamente negativo B_{22} (resultante da elevada concentração de sal) e a uma elevada concentração da proteína. Uma possível razão físico-química para a formação de precipitados amorfos é a presença de uma transição sol-gel dentro da região em que coexistem sólidos e líquidos (MUSCHOL; ROSENBERGER, 1997).

Tabela 7. Matriz experimental de fases para o succinato de sódio a 25°C e pH 8,50: média de tamanhos de cristais em μm ; NF, nenhuma fase sólida; A, fase amorfa

		$B_{22} / \text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$					
		$-2,0 \times 10^{-4}$	$-3,6 \times 10^{-4}$	$-5,2 \times 10^{-4}$	$-6,8 \times 10^{-4}$	$-8,4 \times 10^{-4}$	$-1,0 \times 10^{-3}$
$S_0 / \text{mg mg}^{-1}$	2,60	127,5	191,5	219,5	235,5	228,5	249,0
	2,40	120,5	150,0	179,0	228,0	196,5	189,5
	2,20	102,4	110,7	157,5	105,5	112,8	86,5
	1,99	20,8	29,9	37,0	114,0	42,3	NF
	1,80	NF	NF	NF	NF	52,0	NF
	1,59	NF	NF	NF	NF	NF	NF
	1,40	NF	NF	NF	NF	NF	NF
	1,19	NF	NF	NF	NF	NF	NF
		$B_{22} / \text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$					
		$-1,0 \times 10^{-3}$	$-1,4 \times 10^{-3}$	$-1,8 \times 10^{-3}$	$-2,2 \times 10^{-3}$	$-2,6 \times 10^{-3}$	$-3,0 \times 10^{-3}$
$S_0 / \text{mg mg}^{-1}$	8,91	335,7	311,4	345,5	375,9	359,0	339,0
	7,93	222,5	292,3	320,2	386,4	371,2	373,5
	6,94	282,2	334,2	336,4	352,3	351,9	388,7
	5,96	313,3	321,2	439,8	467,2	393,8	435,5
	4,96	330,0	470,2	260,9	505,5	378,2	369,7
	3,97	297,5	456,0	387,2	404,7	457,0	448,4
	2,97	337,0	250,5	0,0	142,7	269,0	NF
	1,98	NF	NF	NF	NF	NF	NF

Tabela 8. Matriz experimental de fases para o tartarato de sódio a 25°C e pH 8,50: média de tamanhos de cristais em μm ; NF, nenhuma fase sólida; A, fase amorfa

		$B_{22} / \text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$					
		$-5,0 \times 10^{-4}$	$-6,0 \times 10^{-4}$	$-7,0 \times 10^{-4}$	$-8,0 \times 10^{-4}$	$-9,0 \times 10^{-4}$	$-1,0 \times 10^{-4}$
$S_0 / \text{mg mg}^{-1}$	5,50	NF	160,5	277,5	203,0	175,0	222,0
	4,88	NF	186,5	113,5	172,0	153,0	157,5
	4,27	NF	197,5	81,4	168,0	108,9	128,5
	3,66	NF	152,8	66,9	43,8	77,6	93,0
	3,05	NF	218,5	NF	NF	38,4	NF
	2,44	NF	52,0	NF	NF	NF	NF
	1,83	NF	NF	NF	NF	NF	NF
	1,21	NF	NF	NF	NF	NF	NF
		$B_{22} / \text{mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$					
		$-1,0 \times 10^{-3}$	$-1,7 \times 10^{-3}$	$-2,4 \times 10^{-3}$	$-3,0 \times 10^{-3}$	$-3,7 \times 10^{-3}$	$-4,4 \times 10^{-3}$
$S_0 / \text{mg mg}^{-1}$	7,49	319,4	343,5	327,7	208,9	A	A
	6,68	273,7	424,2	365,0	269,0	A	A
	5,89	254,0	287,5	344,2	283,8	A	A
	5,09	243,8	279,7	282,2	287,2	583,5	A
	4,29	210,7	251,5	293,7	278,5	147,3	A
	3,49	110,4	NF	225,0	206,9	184,9	A
	2,70	NF	NF	144,0	190,3	152,4	546,9
	1,90	NF	NF	NF	124,1	52,3	562,0

Obtiveram-se imagens de cada um dos poços dos pratos de cultivo (*tissue plates*, conforme Figura 7) usados na obtenção da janela de cristalização e na identificação da matriz de fases (Tabelas 3 e 4). Na Figura 16 se apresentam algumas fotografias típicas dos cristais de lisozima obtidos para o succinato de sódio a pH 8,50 e 25°C em algumas condições de sobressaturação e segundo coeficiente virial: (a) $S_0=6,99$ $B_{22}=-1 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. (b) $S_0=6,94$ $B_{22}=-2,2 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$ (c) $S_0=5,97$ $B_{22}=-2,6 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. Em geral os cristais obtidos têm formas macro hexagonais projetadas, mas não se observam mudanças significativas no hábito do cristal com as variações no segundo coeficiente virial e a sobressaturação, com exceção de aparentes diminuições na relação de longitude / largura com o aumento de B_{22} .

Figura 16. Cristais típicos de lisozima em uma solução de succinato de sódio a 25°C e pH 8,50: (a) $S_0=6,99$ $B_{22}=-1 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. (b) $S_0=6,94$ $B_{22}=-2,2 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. (c) $S_0=5,97$ $B_{22}=-2,6 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$

Figura 17. Cristais típicos de lisozima em uma solução de tartarato de sódio a 25°C e pH 8,50: (a) $S_0=7,49$ $B_{22}=-1 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. (b) $S_0=6,69$ $B_{22}=-2,4 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$. (c) $S_0=4,26$ $B_{22}=-3,7 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$

Figura 18. Fase amorfa de lisozima em uma solução de citrato de sódio a 25°C e pH 8,50

Na Figura 17 se apresentam cristais obtidos em soluções de tartarato de sódio a 25°C e pH 8,50 em três condições de segundo coeficiente virial e sobressaturação: (a) $S_0=7,49$ $B_{22}=-1 \times 10^{-3}$ mol cm³ g⁻². (b) $S_0=6,69$ $B_{22}=-2,4 \times 10^{-3}$ mol cm³ g⁻² (c) $S_0=4,26$ $B_{22}=-3,7 \times 10^{-3}$ mol cm³ g⁻². Encontrara-se nesse caso uma mistura de macro-cristais de forma hexagonal e cúbica, principalmente para valores mais baixos do segundo coeficiente virial. Perto da região onde a fase amorfa aparece, isto é, em altos valores de B_{22} ($-3,7 \times 10^{-3}$ mol cm³ g⁻²), os cristais tendem a diminuir seu tamanho, e se observam cristais hexagonais mais delgados (i.e. relação longitude / largura).

A fase amorfa, que corresponde a uma separação metaestável líquido-líquido, frustrada pela presença de flocos e agregados de proteína (WATANABE, 2007), é apresentada na Figura 18. Nesse caso, um precipitado semelhante a um gel foi obtido em soluções de citrato de sódio a 25°C e pH

8,50.

Em soluções de sulfato de amônio se identificou uma variação na morfologia dos cristais de lisozima com a sobressaturação (FORSYTHE; SNELL; PUSEY, 1997, 1999). Em concentrações de lisozima inferiores a 100 mg cm⁻³, obtêm-se cristais tetraédricos, enquanto concentrações maiores que 150 mg cm⁻³ resultaram em uma maior proporção de cristais ortorrômbicos frágeis. Mudanças na morfologia dos cristais de lisozima têm sido descritas em função da temperatura: a 15,0 °C cristais tetraédricos e ortorrômbicos são formados, enquanto acima de 25,0 °C somente cristais de lisozima ortorrômbicos se formam (FORSYTHE; PUSEY, 1994; FORSYTHE; SNELL; PUSEY, 1999; GUILLOTEAU; RIÈS-KAUTT; DUCRUIX, 1992; ROSENBERGER et al., 1993).

6. CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos de solubilidade da lisozima em sistemas contendo sais biodegradáveis permitem estabelecer que o succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio são capazes de induzir o *salting out* da lisozima e podem ser considerados como promissores agentes precipitantes. Dentre esses sais, o succinato de sódio mostrou-se o mais efetivo em termos da diminuição da solubilidade, quantificada pela constante de *salting out* K_s da equação de Cohn. A constante β da equação de Cohn para o succinato de sódio aumenta com a diminuição do pH, mostrando que a solubilidade da lisozima a valores baixos de sal aumenta levemente nessa condição. Esse fato é aparentemente contraditório, mas pode estar ligado à formação de complexos no precipitado, embora essa hipótese não tenha sido experimentalmente testada. O valor da constante K_s , para os sais succinato de sódio e tartarato de sódio não sofreu alterações significativas com a mudança de pH. É possível propor uma série do tipo Hofmeister inversa com base na análise dos valores de K_s experimentais: succinato de sódio > cloreto de sódio > carbamato de amônio > tartarato de sódio > sulfato de sódio > sulfato de amônio > citrato de sódio.

Analisando-se as curvas de solubilidade em função do pH, observou-se que em valores de pH muito inferiores ao ponto isoeletrico existe a possibilidade de formação de complexos entre o tartarato de sódio e a lisozima, fato inferido pela diminuição abrupta da solubilidade a um valor de pH

aproximado de 4. Entretanto, essa diminuição é muito menor do que ocorre, por exemplo, com sulfatos, e pode significar que a forma precipitada é formada apenas por um hidrato proteico. De qualquer modo, mais estudos são necessários para confirmar esse fato.

Obtiveram-se dados experimentais do segundo coeficiente virial B_{22} , mediante o uso de cromatografia líquida de auto-interação (SIC). Os dados foram obtidos a condições de temperatura constante (25 °C) e pH constante de 8,50, em função da concentração dos sais succinato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio. Todos os dados obtidos foram negativos, o que representa interações do tipo atrativo entre as moléculas. Ademais, em muitas faixas de concentração o valor do segundo coeficiente virial encontra-se na chamada janela de cristalização, isto é, a faixa de valores para os quais a formação de cristais é favorecida.

Experimentalmente se observou-se a cristalização da lisozima usando estruturas matriciais 2D mantendo a temperatura constante de 25°C e pH de 8,50 em soluções de succinato de sódio e tartarato de sódio. Nesse caso, as variáveis investigadas foram o valor do segundo coeficiente virial e a sobressaturação. Os dois sais geramram cristais da proteína até valores do segundo coeficiente virial de $-3 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^3 \text{ g}^{-2}$, corroborando os limites relatados na literatura. No caso do tartarato de sódio, comprovou-se que a fase amorfa começa a aparecer neste limite mesmo em valor de sobressaturação de 8.

A distribuição de tamanho de partícula medido mostra um incremento do tamanho dos cristais proporcional a acréscimos na sobressaturação e/ou no

segundo coeficiente virial para o succinato de sódio e o tartarato de sódio. Para os dois sais uma região transitória foi identificada, e ela é caracterizada por não apresentar tendência definida no que diz respeito ao tamanho dos cristais. No caso do tartarato de sódio, esta região faz a transição entre as condições onde é gerada a fase cristal e a fase amorfa. Em todos os casos o hábito do cristal identificado é de geometria hexagonal e ocasionalmente cúbica.

7. CONTINUIDADE DO TRABALHO

Este trabalho demonstra o potencial uso de sais biodegradáveis como o succinato de sódio, tartarato de sódio e o citrato de sódio na obtenção de proteína cristalizada, especificamente lisozima. Uma possível extensão do trabalho seria a aplicação direta desses sais no estudo do equilíbrio sólido-líquido de outras proteínas.

A determinação de dados de equilíbrio sólido-líquido é de natureza termodinâmica. Outra possível extensão seria a continuação do trabalho na área cinética, que passaria pela determinação experimental das taxas de nucleação e de crescimento de cristais em condições determinadas de temperatura, pH e força iônica. A cinética de crescimento dos cristais pode ser estudada por meio da análise da distribuição de tamanho de partículas em função do tempo. Desta maneira, se procuraria entender e prever de modo mais geral o fenômeno da cristalização e/ou precipitação de lisozima em soluções de sais biodegradáveis mediante o uso simultâneo de informações termodinâmica e cinética na integração simultânea dos balanços populacionais e materiais.

8. BIBLIOGRAFIA

ALDERTON, G.; FEVOLD, H. L. Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 164, p. 1–5, 1946.

ALDRICH, S. **Chicken egg white lysozyme – Product information sheet**. Saint Louis: [s.n.].

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, G. N. Theory of protein solubility. **Methods in Enzymology**, v. 114, p. 49–77, 1985.

ATAKA, M.; TANAKA, S. The growth of large single crystals of lysozyme. **Biopolymers**, v. 25, p. 337–350, 1986.

BAJAJ, H.; SHARMA, V. K.; KALONIA, D. S. Determination of second virial coefficient of proteins using a dual-detector cell for simultaneous measurement of scattered light intensity and concentration in SEC-HPLC. **Biophysical journal**, v. 87, n. 6, p. 4048–55, 2004.

BASU, S. K. et al. Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals. **Expert opinion on biological therapy**, v. 4, n. 3, p. 301–17, mar. 2004.

BÉNAS, P.; LEGRAND, L.; RIÈS-KAUTT, M. Strong and specific effects of cations on lysozyme chloride solubility. **Acta Crystallographica Section D**, p. 1582–1587, 2002.

BERNARD, N.; JOLIVALT, C.; SCHWARZTZENTRUBER, J. Protein precipitation by caprylic acid: equilibrium composition data. **Biotechnology and bioengineering**, v. 49, p. 405–411, 1996.

BIGELOW, C. C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. **Journal of Theoretical Biology**, v. 16, p. 187–211, 1967.

BOSTRÖM, M. et al. Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. **Biophysical chemistry**, v. 117, p. 217–224, 2005.

BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R.; NINHAM, B. W. Specific ions effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series. **Biophysical journal**, v. 85, p. 686–694, 2003.

BOYCHYN, M. et al. Laboratory scaledown of protein purification processes involving fractional precipitation and centrifugal recovery. **Biotechnology and bioengineering**, v. 69, p. 1–10, 2000.

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

CANFIELD, R. E. The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. **The**

Journal of biological chemistry, v. 238, n. 8, p. 2698–707, ago. 1963.

CHENG, Y. C. Y.-C. et al. Kinetics and equilibria of lysozyme precipitation and crystallization in concentrated ammonium sulfate solutions,. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. Rie 1989, p. 177–188, 2006.

CLONIS, Y. D. Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatory tools develop. **Journal of Chromatography A**, n. 1101, p. 1–24, 2006.

COEN, C. J.; BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. Salting-out of aqueous proteins – phase equilibria and intermolecular potentials. **AIChE Journal**, v. 41, p. 996–1004, 1995.

DEPHILLIPS, P.; LENHOFF, A. M. Pore size distributions of cation-exchange adsorbents determined by inverse size-exclusion chromatography. **Journal of chromatography. A**, v. 883, n. 1-2, p. 39–54, 23 jun. 2000.

DEUTSCHER, M. P. **Methods in Enzymology volume 182**. San Diego: Academic Press, 1990.

DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzyme fractionation by salting-out: a theoretical note. **Advances in Protein Chemistry**, v. 16, p. 197–219, 1961.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 285–300, 1990.

ESPITALIER, F.; CHENG, Y. C.; LENHOFF, A. M. Mechanism of formation of lysozyme crystals in concentrated ammonium sulfate solution from concentration profiles and equilibria: Influence of the 2nd osmotic virial coefficient. **Powder Technology**, v. 190, n. 1-2, p. 112–117, mar. 2009.

EWING, F.; FORSYTHE, E.; PUSEY, M. L. Orthorhombic lysozyme solubility. **Acta Crystallographica Section D**, v. 50, p. 424–428, 1994.

FORSYTHE, E.; PUSEY, M. L. The effects of temperature and NaCl concentration on tetragonal lysozyme face growth rates. **Journal of Crystal Growth**, v. 139, p. 89–94, 1994.

FORSYTHE, E.; SNELL, E. H.; PUSEY, M. L. Crystallization of chicken egg-lysozyme from ammonium sulfate. **Acta Crystallographica Section D**, p. 795–797, 1997.

FORSYTHE, E.; SNELL, E. H.; PUSEY, M. L. Crystallization of chicken egg white lysozyme from assorted sulfate salts. **Journal of Crystal Growth**, v. 196, p. 332–343, 1999.

FRANCO, L. F. M.; FILHO, P. D. A. P. On the solubility of proteins as a function of pH: Mathematical development and application. **Fluid Phase Equilibria**, v. 306, n. 2, p. 242–250, jul. 2011.

FRANCO, L. F. M.; FILHO, P. D. A. P. On the relationship between the solubility of proteins and the osmotic second virial coefficient. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 01, p. 95–104, 2013.

GEORGE, W.; WILSON, W. Predicting protein crystallization from a dilute solution property. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 50, n. 4, p. 361, 1994.

GRANT, M. Effects of thermodynamic nonideality in protein crystal growth. **Journal of crystal growth**, v. 209, n. August 1999, p. 130–137, 2000.

GREEN, A. A. Studies in the physical chemistry of the proteins: X. The solubility of hemoglobin in solutions of chlorides and sulfates of varying concentration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 95, p. 223–230, 1932.

GUILLOTEAU, J. P.; RIÈS-KAUTT, M.; DUCRUIX, A. F. Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts. **Journal of Crystal Growth**, v. 122, p. 223–230, 1992.

GUO, B. et al. Correlation of second virial coefficients and solubilities useful in protein crystal growth. **Journal of Crystal Growth**, v. 196, n. 2-4, p. 424–433, jan. 1999.

HAAS, C.; DRENT, J.; WILSON, W. W. Relation between the Solubility of Proteins in Aqueous Solutions and the Second Virial Coefficient of the Solution. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 14, p. 2808–2811, abr. 1999.

IMAI, T.; KOVALENKO, A.; HIRATA, F. Partial molar volume of proteins studied by the three-dimensional reference interaction site model theory. **The journal of physical chemistry. B**, v. 109, n. 14, p. 6658–65, 14 abr. 2005.

INÊS, A. et al. REVISÃO : AS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO DO VINHO – Parte I REVIEW : WINE LACTIC ACID BACTERIA - Part I. **Ciência Téc. Vitiv.**, v. 23, n. 2, p. 81–96, 2008.

JOLLÈS, P. Relationship between chemical structure and biological activity of hen egg-white lysozyme and lysozymes of different species. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, v. 167, p. 350–363, 1967.

JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 63, p. 165–189, 1984.

JUDGE, R. A.; JOHNS, M. R.; WHITE, E. T. Solubility of ovalbumin in ammonium sulfate solutions. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 41, p. 422–424, 1996.

KARAM, G. A. et al. Extraction and purification of anti-proteinase 3 (PR3) antibodies from egg yolk. **Iranian Biomedical Journal**, v. 9, p. 41–45, 2005.

KASHCHIEV, D.; VAN ROSMALEN, G. M. Review: Nucleation in solutions revisited. **Crystal Research and Technology**, v. 38, n. 78, p. 555–574, jul. 2003.

KREBS, H. A.; WEITZMAN, P. D. J. Krebs' citric acid cycle: half a century and still turning. **London: Biochemical Society**, p. 25, 1987.

LAGARIAS, J. C. et al. Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions. **SIAM Journal of Optimization**, v. 9, n. 1, p. 112–147, 1998.

LEBOWITZ, J.; LEWIS, M.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. **Protein Science**, v. 11, p. 2067–2079, 2002.

LEGRAND, L.; RIÈS-KAUTT, M.; ROBERT, M. C. Two polymorphs of lysozyme nitrate: temperature dependence of their solubility. **Acta Crystallographica**

Section D, v. 58, p. 1564–1567, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: [s.n.].

LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. [s.l.] CRC Press, 1998.

LUI, J. Y. M.; LISTER, J. D.; WHITE, E. T. Precipitation of soy proteins: particle formation and protein separation. **AIChE Journal**, v. 53, p. 514–522, 2007.

MARCHAL, R. et al. Influence of lysozyme treatments on champagne base wine foaming properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1420–8, 13 mar. 2002.

MEHTA, C. M.; WHITE, E. T.; LITSTER, J. D. Correlation of second virial coefficient with solubility for proteins in salt solutions. **Biotechnology progress**, v. 28, n. 1, p. 163–70, 2011.

MELANDER, W.; HORVÁTH, C. Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 183, p. 200–215, 1977.

MOREIRA, L. A. et al. Hofmeister effects: why protein charge, pH titration and protein precipitation depend on the choice of background salt solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects**, v. 282–283, p. 457–463, 2006.

MORETTI, J. J.; SANDLER, S. I.; LENHOFF, A. M. Phase equilibria in the lysozyme- ammonium sulfate-water system. **Biotechnology and bioengineering**, v. 70, p. 498–506, 2000.

MUSCHOL, M.; ROSENBERGER, F. Liquid-liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization. **Journal of Chemical Physics**, v. 107, p. 1953–1962, 1997.

NASIRI, H. et al. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 19, p. 229–232, 2005.

NEAL, B. L.; ASTHAGIRI, D.; LENHOFF, A. M. Molecular origins of osmotic second virial coefficients of proteins. **Biophysical journal**, v. 75, n. 5, p. 2469–77, nov. 1998.

NEWCOMBE, A. R. et al. Optimised affinity purification of polyclonal antibodies from hyper immunized ovine serum using a synthetic protein A adsorbent, MAbsorbent® A2P. **Journal of Chromatography B**, v. 814, p. 209–215, 2005.

OSSERMAN, E. F. Crystallization of human lysozyme. **Science**, v. 155, p. 1536–1537, 1967.

PEREZ, B. et al. Experimental determination and thermodynamic modeling of phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing biodegradable salts. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 56, n. July, p. 136–143, 2013.

PETERS JR, T. Serum Albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 37, p. 161–245, 1985.

POPOVA, E. et al. Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: Effect of salt concentration and pH. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 6, p. 1026–1033, jun. 2008.

QUIGLEY, A et al. The accurate measurement of second virial coefficients using self-interaction chromatography: Experimental considerations. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, n. May, 25 abr. 2013.

RETAILLEAU, P.; DUCRUIX, A; RIÈS-KAUTT, M. Importance of the nature of anions in lysozyme crystallization correlated with protein net charge variation. **Acta Crystallographica Section D**, v. 58, p. 1576–1581, 2002.

RETAILLEAU, P.; RIÈS-KAUTT, M.; DUCRUIX, A. No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH. **Biophysical journal**, v. 73, n. 4, p. 2156–63, out. 1997.

RIÈS-KAUTT, M.; DUCRUIX, A. Inferences drawn from physicochemical studies of crystallogenesis and precrystalline state. **Methods in Enzymology**, v. 276, p. 23–59, 1997.

RIÈS-KAUTT, M.; DUCRUIX, A; VAN DORSSELAER, A. Crystallization of previously desalted lysozyme in the presence of sulfate ions. **Acta Crystallographica Section D**, v. 50, p. 366–369, 1994.

RIES-KAUTT, M. M.; DUCRUIX, A F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 2, p. 745–8, 15 jan. 1989.

ROSENBERGER, F. et al. Temperature dependence of protein solubility – determination and application to crystallization in X-ray capillaries. **Journal of Crystal Growth**, v. 129, p. 1–12, 1993.

RUPPERT, S.; SANDLER, S. I.; LENHOFF, A M. Correlation between the osmotic second virial coefficient and the solubility of proteins. **Biotechnology progress**, v. 17, n. 1, p. 182–7, 2001.

RUSSO KRAUSS, I. et al. An overview of biological macromolecule crystallization. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 6, p. 11643–91, jan. 2013.

SCOPES, R. K. **Protein purification**. 2^a ed ed. New York: Springer-Verlag New York Inc., 1988.

SEKHON, B. S. Biopharmaceuticals: an overview Abstract: **Thai J. Pharm. Sci.**, v. 34, p. 1–19, 2010.

SHIH, Y. C.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. . Some characteristics of protein precipitation by salts. **Biotechnology and bioengineering**, v. 40, p. 1155–1164, 1992.

SIDS, O. **Sodium succinate**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/150903.pdf>>.

TAM, S. K. et al. Design of Protein Crystallization Processes Guided by Phase Diagrams. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 13, p.

8163–8175, 6 jul. 2011.

TASHIMA, A. K. et al. Precipitation of porcine insulin with carbon dioxide. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, n. 5, p. 909–19, 1 ago. 2009.

TESSIER, P. M. et al. Self-interaction chromatography: a novel screening method for rational protein crystallization. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 58, n. 10, p. 1531–1535, 26 set. 2002.

TESSIER, P. M.; LENHOFF, A. M.; SANDLER, S. I. Rapid measurement of protein osmotic second virial coefficients by self-interaction chromatography. **Biophysical journal**, v. 82, n. 3, p. 1620–31, mar. 2002.

TESSIER, P. M.; SANDLER, S. I.; LENHOFF, A. M. Direct measurement of protein osmotic second virial cross coefficients by cross-interaction chromatography. **Protein science**, v. 13, n. 5, p. 1379–1390, 2004.

TOXNET. **Sodium Citrate anhydrous**.

WANKA, J.; PEUKERT, W. Optimized Production of Protein Crystals: From 1D Crystallization Slot towards 2D Supersaturation B22 Diagram. **Chemical Engineering & Technology**, v. 34, n. 4, p. 510–516, 24 abr. 2011.

WATANABE, E. O. et al. Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: Effect of salt type and temperature. **Fluid Phase Equilibria**, v. 281, n. 1, p. 32–39, jul. 2009.

WATANABE, E. O. et al. Phase equilibria of lysozyme precipitation with the volatile salt ammonium carbamate. **Fluid Phase Equilibria**, v. 292, n. 1-2, p. 42–47, maio 2010.

WATANABE, É. O. **Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima e albumina de soro bovino com o uso de sais**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2007.

YU, H. L. et al. Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of O-glucosides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 354–361, 2007.

ZANG, Y. et al. Towards protein crystallization as a process step in downstream processing of therapeutic antibodies: screening and optimization at microbatch scale. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25282, 22 jan. 2011.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning**. New York: Macel Dekker, Inc., 1995.

ZHANG, H. et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1670–1676, 2007.

ZIMM, B. H. Application of the Methods of Molecular Distribution to Solutions of Large Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 14, n. 3, p. 164, 1946.

Tabela 9. Solubilidade da lisozima em função da força iônica em uma solução de succinato de sódio a 25°C^a

pH 10,2			pH 11,7			pH 6,43		
F / mol kg ⁻¹	S / mg cm ⁻³	±σ/mg cm ⁻³	F / mol kg ⁻¹	S / mg cm ⁻³	±σ/mg cm ⁻³	F / mol kg ⁻¹	S / mg cm ⁻³	±σ/mg cm ⁻³
0,321	57,15	4,94	0,224	107,21	5,16	0,311	65,5	5,18
0,732	33,1	2,26	0,601	29,64	4,91	0,682	29,48	3,35
1,031	13,48	0,24	0,959	15,96	1,15	0,982	15,85	0,11
1,386	7,17	0,01	1,308	8,47	0,20	1,343	9,5	0,28
1,578	5,68	0,17	1,481	6,85	0,18	1,560	7,35	0,10
1,787	4,17	0,13	1,663	4,52	0,12	1,765	5,83	0,18
1,863	3,57	0,06	1,823	3,57	0,14	1,917	4,74	0,18
2,073	2,69	0,13	2,021	2,89	0,13	2,140	3,14	0,38

^a – Incertezas experimentais u são u(T) = 0.1 K, u(F) = 0.01 mol kg⁻¹, e u(S) = 0.03 mg cm⁻³.

APÊNDICES

Tabela 10. Solubilidade da lisozima em função da força iônica em uma solução de tartarato de sódio a 25°C^a

pH 10,6			pH 11,37			pH 5,94		
$T / \text{mol kg}^{-1}$	$S / \text{mg cm}^{-3}$	$\pm \sigma / \text{mg cm}^{-3}$	$T / \text{mol kg}^{-1}$	$S / \text{mg cm}^{-3}$	$\pm \sigma / \text{mg cm}^{-3}$	$T / \text{mol kg}^{-1}$	$S / \text{mg cm}^{-3}$	$\pm \sigma / \text{mg cm}^{-3}$
0,866	23,72	0,12	0,763	35,95	8,81	0,653	32,88	1,01
0,993	21,09	0,36	1,099	22,15	0,99	1,105	20,43	0,61
1,639	13,13	0,08	1,649	12,38	0,22	1,738	11,40	0,20
2,066	8,74	0,10	2,064	8,48	0,09	2,033	8,49	0,23
2,432	7,28	0,08	2,427	6,11	0,26	2,427	6,23	0,29
2,886	4,7	0,08	2,913	4,32	0,29	2,898	4,23	0,99
3,237	3,88	0,36	3,215	4,11	0,26	3,225	3,09	0,31
3,594	3,47	0,13	3,594	3,57	0,18	3,595	3,30	0,18

^a – Incertezas experimentais u são $u(T) = 0.1 \text{ K}$, $u(T) = 0.01 \text{ mol kg}^{-1}$, e $u(S) = 0.02 \text{ mg cm}^{-3}$.

Tabela 11. Solubilidade da lisozima em função da força iônica em uma solução de citrato de sódio a 25°C^a

pH 7,0		
Γ / mol kg ⁻¹	S / mg cm ⁻³	$\pm\sigma$ /mg cm ⁻³
2,084	67,54	3,10
2,402	64,49	6,10
2,755	57,0	3,48
3,115	51,87	1,61
3,464	34,94	3,50
3,917	15,24	1,83
4,292	9,57	0,40
6,083	1,18	0,03

^a – Incertezas experimentais u são $u(T) = 0.1$ K, $u(\Gamma) = 0.01$ mol kg⁻¹, e $u(S) = 0.02$ mg cm⁻³.

Tabela 12. Solubilidade da lisozima em função do pH a 25°C em soluções de succinato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio ^a

Succinato de sódio			Citrato de sódio			Tartarato de sódio		
pH	S/ mg cm ⁻³	±σ/ mg cm ⁻³	pH	S/ mg cm ⁻³	±σ/ mg cm ⁻³	pH	S/ mg cm ⁻³	±σ/ mg cm ⁻³
8,49	0,044	0,010	6,53	1,368	0,025	8,42	3,866	0,616
9,24	0,065	0,018	7	1,178	0,026	9,36	3,801	0,084
10,15	0,052	0,006	7,24	1,084	0,273	10,6	3,721	0,022
10,61	0,073	0,012	10,03	1,111	0,179	11,37	3,570	0,107
11,3	0,031	0,005	10,62	0,980	0,003	11,91	1,752	1,167
11,65	0,055	0,024	10,94	1,112	0,208	12,32	0,474	0,553
11,98	0,091	0,037	11,38	0,933	0,024	5,94	3,674	0,121
12,32	0,219	0,079	11,8	0,370	0,338	4,26	1,063	0,078
			12	0,027	0,009			

^a – Incertezas experimentais u são $u(T) = 0.1 \text{ K}$, $u(\Gamma) = 0.01 \text{ mol kg}^{-1}$, and $u(S) = 0.03 \text{ mg cm}^{-3}$.

Tabela 13. Segundo coeficiente virial em função da força iônica da lisozima em um solução de succinato de sódio a 25°C e pH de 8,50^a

Γ	B_{22}	$B_{22}^{\text{médio}}$	$\pm\sigma$
0,3108	-1,67 x10 ⁻⁴	-1,19x10 ⁻⁴	6,7840 x10 ⁻⁵
	-1,67 x10 ⁻⁴		
	-2,36 x10 ⁻⁵		
0,6821	-3,59 x10 ⁻⁴	-3,59 x10 ⁻⁴	1,9584 x10 ⁻⁵
	-3,83 x10 ⁻⁴		
	-3,35 x10 ⁻⁴		
0,9807	-5,99 x10 ⁻⁴	-4,79 x10 ⁻⁴	1,223 x10 ⁻⁴
	-5,27 x10 ⁻⁴		
	-3,11 x10 ⁻⁴		
1,3388	-8,39 x10 ⁻⁴	-9,67 x10 ⁻⁴	9,255 x10 ⁻⁵
	-1,01 x10 ⁻³		
	-1,05 x10 ⁻³		
1,5620	-1,20E x10 ⁻³	-1,49 x10 ⁻³	2,2698 x10 ⁻⁴
	-1,53 x10 ⁻³		
	-1,75 x10 ⁻³		
1,7635	-2,45 x10 ⁻³	-2,31 x10 ⁻³	1,004 x10 ⁻⁴
	-2,21 x10 ⁻³		
	-2,28 x10 ⁻³		
1,9164	-2,47 x10 ⁻³	-2,52 x10 ⁻³	5,0477 x10 ⁻⁴
	-2,59 x10 ⁻³		
	-2,51 x10 ⁻³		
2,1353	-2,93 x10 ⁻³	-3,69 x10 ⁻³	7,1972 x10 ⁻⁴
	-3,48 x10 ⁻³		
	-4,65 x10 ⁻³		

^a – Incertezas experimentais u são $u(T) = 0.1 \text{ K}$, $u(\Gamma) = 0.01 \text{ mol kg}^{-1}$. A incerteza experimental $u(B_{22})$ é estimada em $0,14x B_{22}$

Tabela 14. Segundo coeficiente virial em função da força iônica da lisozima em um solução de tartarato de sódio a 25°C e pH de 8,50^a

Γ	B_{22}	$B_{22}^{\text{médio}}$	$\pm\sigma$
0,171	-7,00 x10 ⁻⁴	-6,90 x10 ⁻⁴	1,04 x10 ⁻⁵
	-6,76 x10 ⁻⁴		
	-6,95 x10 ⁻⁴		
0,5487	-6,95 x10 ⁻⁴	-6,23 x10 ⁻⁴	5,18 x10 ⁻⁵
	-5,99 x10 ⁻⁴		
	-5,75 x10 ⁻⁴		
0,9274	-7,81 x10 ⁻⁴	-8,47 x10 ⁻⁴	5,48 x10 ⁻⁵
	-9,16 x10 ⁻⁴		
	-8,44 x10 ⁻⁴		
1,2812	-8,70 x10 ⁻⁴	-1,01 x10 ⁻³	1,87 x10 ⁻⁴
	-8,89 x10 ⁻⁴		
	-1,28 x10 ⁻³		
1,6546	-1,85 x10 ⁻³	-2,45 x10 ⁻³	1,02 x10 ⁻³
	-3,09 x10 ⁻³		
	-1,13 x10 ⁻³		

^a – Incertezas experimentais u são $u(T) = 0.1 \text{ K}$, $u(\Gamma) = 0.01 \text{ mol kg}^{-1}$. A incerteza experimental $u(B_{22})$ é estimada em $0,14x B_{22}$

Tabela 15. Segundo coeficiente virial em função da força iônica da lisozima em um solução de citrato de sódio a 25°C e pH de 8,50

Γ	B_{22}	$B_{22}^{\text{médio}}$	$\pm\sigma$
0,3421	-8,39 x10 ⁻⁴	-7,07 x10 ⁻⁴	1,4 x10 ⁻⁴
	-5,75 x10 ⁻⁴		
	-5,51 x10 ⁻⁴		
0,9061	-6,23 x10 ⁻⁴	-3,95 x10 ⁻⁴	2,94 x10 ⁻⁴
	-1,67 x10 ⁻⁴		
	-7,91 x10 ⁻⁴		
1,4707	-2,95 x10 ⁻⁴	-2,32 x10 ⁻⁴	4,25 x10 ⁻⁴
	-1,70 x10 ⁻⁴		
	-9,64 x10 ⁻⁴		
2,0338	-3,16 x10 ⁻⁴	-3,98 x10 ⁻⁴	8,84 x10 ⁻⁵
	-4,79 x10 ⁻⁴		
	-4,98 x10 ⁻⁴		
2,5975	-1,05 x10 ⁻³	-1,10 x10 ⁻³	4,15 x10 ⁻⁵
	-1,15 x10 ⁻³		
	-1,08 x10 ⁻³		
3,1620	-1,29 x10 ⁻³	-1,70 x10 ⁻³	5,91 x10 ⁻⁴
	-1,22 x10 ⁻³		
	-2,59 x10 ⁻³		
3,7255	-1,23 x10 ⁻³	-3,14 x10 ⁻³	1,66 x10 ⁻³
	-3,02 x10 ⁻³		
	-4,96 x10 ⁻³		

^a – Incertezas experimentais u são $u(T) = 0.1 \text{ K}$, $u(\Gamma) = 0.01 \text{ mol kg}^{-1}$. A incerteza experimental $u(B_{22})$ é estimada em $0,14 \times B_{22}$