Kelly Cristina Nascimento Alves

Contribuições ao Estudo da Não-Idealidade de Soluções Proteicas

São Paulo
2013

Kelly Cristina Nascimento Alves

Contribuições ao Estudo da Não-Idealidade de Soluções Proteicas

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

São Paulo
2013

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 maio de 2013.

Assinatura do autor _____

Assinatura do orientador _____

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Kelly Cristina Nascimento
Contribuições ao estudo da não-idealidade de soluções
protéicas / K.C.N. Alves. – versão corr. -- São Paulo, 2013.
180 p.

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

1. Termodinâmica (Modelagem) 2. Membranas de separação
3. Soluções protéicas 4. Não-idealidade 5. Osmometria de mem-
brana I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departa-
mento de Engenharia Química II. t.

Kelly Cristina Nascimento Alves

Contribuições ao Estudo da Não-Idealidade de Soluções Proteicas

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

Área de concentração:
Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Alcântara
Pessôa Filho

São Paulo
2013

Dedicatória

***Dedico este trabalho à minha
família.***

Agradecimentos

Neste momento único não poderia deixar de expressar minha imensa gratidão e apreço pelas pessoas especiais que contribuíram para essa importante etapa.

A toda minha família, em especial minha avó e minha mãe, que sempre acreditaram no meu potencial, pela confiança, apoio e carinho sempre presentes.

Ao meu marido pelo amor e companheirismo inestimáveis.

Ao meu filho João Pedro, pelo seu amor, carinho e sorrisos constantes... Por simplesmente existir em minha vida!

Ao orientador Prof. Dr. Pedro Pessôa pela orientação, ensinamentos, incentivo e apoio constante; sobretudo pela confiança em mim depositada ao longo do trabalho.

À Prof^a. Dr^a, Bibiana Nerli pela amizade, dedicação, por contribuir e agregar seus conhecimentos neste trabalho.

Aos meus amigos e professores que contribuíram de maneira direta ou indiretamente colaboraram na concretização deste projeto.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESP pelo incentivo financeiro concedido.

"O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis".

(Dale Carnegie)

Resumo

O estudo de soluções proteicas visando à modelagem e à simulação de processos de recuperação e purificação de bioprodutos passa necessariamente pelo estudo da não idealidade, em sentido termodinâmico, destas soluções. Para sistemas em que a concentração de proteína seja baixa, situação comumente presente nestes processos, a principal maneira de avaliar experimentalmente a não idealidade é por meio da determinação da pressão osmótica gerada pela proteína. Deste modo, os objetivos deste trabalho foram: estudar a influência de co-solventes na pressão osmótica de soluções proteicas, verificar a integridade das estruturas secundária e terciária das proteínas nessas soluções, e modelar termodinamicamente os dados de pressão osmótica obtidos. A pressão osmótica foi determinada diretamente por osmometria de membrana, usando soluções de referência com mesma concentração de co-solvente e pH, mas isentas de proteínas. Obtiveram-se dados de pressão osmótica, em função da concentração proteica, de cinco diferentes proteínas (albumina de soro bovino, imunoglobulina G humana, ovalbumina, β -lactoglobulina e lisozima) em soluções contendo co-solventes como o polietileno glicol (de diversos tamanhos de cadeia) e sais (sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio). Cada conjunto de dados foi obtido em pH e concentração de co-solvente constantes. Observou-se que a presença de co-solventes altera a pressão osmótica, mas este efeito é dependente da proteína, do co-solvente e sua concentração, e do pH da solução. Medidas de fluorescência e de dicróismo circular das mesmas proteínas permitiram confirmar que elas mantêm sua integridade estrutural nesses meios, o que justifica o uso de equações volumétricas de estado com parâmetros constantes. Os dados de pressão osmótica em função da concentração proteica foram correlacionados por meio de uma equação volumétrica de estado, que combina um termo de esferas rígidas adesivas e um termo de perturbação de ordem zero (aproximação aleatória). O modelo proposto, embora simples, foi suficiente para correlacionar adequadamente o comportamento experimental.

Palavras-chave: Modelagem termodinâmica, soluções proteicas, não-idealidade, osmometria de membrana.

Abstract

The study of protein solutions aiming at the modeling and simulation of downstream processes entails the study of non-ideality (in thermodynamic sense) of these solutions. For systems wherein the protein concentration is low – a situation often encountered in these processes – the most important technique to experimentally evaluate this non-ideality is the determination of the osmotic pressure generated by the protein in solution. Thus, the objectives of this work were: to study the influence of co-solvents on the osmotic pressure of protein solutions, to verify the absence of change in the secondary and tertiary structure of proteins in these solutions, and to thermodynamically model the obtained osmotic pressure data. The osmotic pressure was directly measured through membrane osmometry, using protein-free reference solutions with the same pH and co-solvent concentration. The data of osmotic pressure were obtained as a function of protein concentration for five different proteins (bovine serum albumin, human immunoglobulin G, ovalbumin, β -lactoglobulin and lysozyme) in solution with co-solvents such as polyethylene glycol (of various chain sizes) and salts (ammonium sulfate, sodium sulfate and sodium chloride). Each data set was obtained at constant pH and co-solvent concentration. It was observed that the presence of co-solvents do shift the osmotic pressure, but this effect is dependent on the protein, the co-solvent and its concentration, and the solution pH. Measurements of fluorescence and circular dichroism of these proteins confirmed that they maintain their structure unchanged in the media, which corroborates the use of volumetric equations of state with constant parameters. The osmotic pressure data as a function of protein concentration were correlated using an osmotic equation of state comprising a repulsive term of adhesive hard spheres and a zero-order perturbation term (random approximation). The proposed model, though simple, was sufficient to properly correlate the experimental behavior.

Keywords: thermodynamic modeling, protein solutions, non-ideality, membrane osmometry.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Eletroforese em gel da BSA. a – proteína BSA dessalinizada e b – proteína BSA em forma comercial.....42
- Figura 2.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA dessalinizada variando a concentração de PEG 2000 em pH = 4,0 a 298,15 K.
 $\diamond$ - 0,5%, $\square$ – 1,0%, Δ - 2,0%, $\circ$ - 4,0%, $\times$ -6,0% em massa de PEG 2000.....52
- Figura 3.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA dessalinizada variando a concentração de PEG 2000 em pH = 5,0 a 298,15 K.
 $\diamond$ - 0,5%, $\square$ – 1,0%, Δ - 2,0%, $\circ$ - 4,0%, $\times$ -6,0% em massa de PEG 2000.....52
- Figura 4.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA dessalinizada variando a concentração de PEG 2000 em pH = 6,0 a 298,15 K.
 $\diamond$ - 0,5%, $\square$ – 1,0%, Δ - 2,0%, $\circ$ - 4,0%, $\times$ -6,0% em massa de PEG 2000.....53
- Figura 5.** Pressão osmótica para sistemas contendo BSA dessalinizada variando a concentração de Na₂SO₄ em pH = 5,0 a 298,15 K.
 $\blacksquare$ – solução tamponada, $\diamond$ - 1,0%, $\square$ – 5,0%, Δ - 10,0%, $\times$ - 15,0% em massa de sulfato de sódio.....53
- Figura 6.** Função ψ para cálculo do segundo coeficiente virial osmótico da BSA em soluções de PEG 2000 em pH = 4,0. $\diamond$ – 0,5% de PEG; $\square$ – 1,0% de PEG; Δ – 2,0 % de PEG, $\circ$ – 4,0% de PEG, $\blacklozenge$ – 6,0% de PEG.....56
- Figura 7.** Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo BSA em soluções tamponadas a 20mM acetato a 298,15K. Linha tracejada – pH = 4,0; linha contínua - pH =5,0; linha pontilhada - pH = 6,0.....59
- Figura 8.** Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta – buffer pH = 4,0; linha amarela –

PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja – PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa – PEG 2000.....60

Figura 9. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta – buffer pH = 4,0; linha amarela – PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja – PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....60

Figura 10. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha cinza contínua – sulfato de amônio 50mM; linha cinza tracejada – sulfato de amônio 10%; linha vermelha contínua – sulfato de sódio 20mM; linha vermelha contínua – sulfato de sódio 10%.....62

Figura 11. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela – PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja – PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....63

Figura 12. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela – PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja – PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....64

Figura 13. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela – PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja – PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....65

Figura 14. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 20mM.....65

Figura 15. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo

IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 6,0 a 298,15K. x - NaCl 0,9%; □ - NaCl 5,0%; ◇- NaCl 10,0%.....	68
Figura 16. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 7,0 a 298,15K. x - NaCl 0,9%; + - NaCl 2,0%; ● - NaCl 3,0%; □ - NaCl 5,0%; ◇- NaCl 10,0%; ○ – NaCl 15,0%.....	68
Figura 17. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 8,0 a 298,15K. x - NaCl 0,9%; □ - NaCl 5,0%; ◇- NaCl 10,0%.....	69
Figura 18. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo IgG humana em soluções tamponadas a 50mM fosfato a 298,15K. Linha contínua - pH =6,0; linha tracejada - pH=7,0; linha pontilhada - pH = 8,0.....	72
Figura 19. Espectro de dicroísmo circular a 298,15K para o sistema contendo IgG humana em soluções de NaCl 50mM. Linha preta - pH = 6,0; linha vermelha - pH = 7,0; linha azul – pH = 8,0; linhas contínuas –solução tamponada; linha tracejadas – solução salina.....	73
Figura 20. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo ovalbumina + PEG + água deionizada em pH = 4,6 a 298,15K. * - solução tamponada; Δ - PEG 400 1%; ▲ - PEG 400 2%; ○ - PEG 600 1%; ● - PEG 600 2%; □- PEG 1000 1%;■ - PEG 1000 2%; ◇ - PEG 2000 1%; ♦ PEG 2000 2%.....	75
Figura 21. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo ovalbumina + (NH ₄) ₂ SO ₄ + água deionizada em pH = 4,6 a 298,15K. ■ - solução tamponada; Δ - (NH ₄) ₂ SO ₄ 1%; ▲ - (NH ₄) ₂ SO ₄ 5%.....	75
Figura 22. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde- PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....	78

- Figura 23.** Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.....79
- Figura 24.** Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo β - lactoglobulina + PEG + água deionizada em pH = 5,3 a 298,15K. ■ - solução tamponada; ○ - PEG 600 1%;● - PEG 600 2%; %; Δ - PEG 2000 1%; ▲ - PEG 2000 2%.....81
- Figura 25.** Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo β - lactoglobulina + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + água deionizada em pH = 5,3 a 298,15K. ■ - solução tamponada; Δ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%; ▲ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5%.....81
- Figura 26.** Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções tamponadas a 20mM acetato a 298,15K. Linha tracejada – pH = 4,0; linha contínua - pH =5,0; linha pontilhada - pH = 6,0.....83
- Figura 27.** Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....84
- Figura 28.** Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....84
- Figura 29.** Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.....85
- Figura 30.** Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o

<p>sistema contendo β-Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....</p>	86
<p>Figura 31. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β-Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja- PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....</p>	86
<p>Figura 32. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β-Lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.....</p>	87
<p>Figura 33. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em pH = 10,5 a 298,15K. ■ - solução tamponada; ○ - PEG 400 1%;● - PEG 400 2%; %; Δ - PEG 1500 1%; ▲ - PEG 1500 2%.....</p>	88
<p>Figura 34. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima+ (NH₄)₂SO₄ + água deionizada em pH = 10,5 a 298,15K. ■ - solução tamponada; Δ - (NH₄)₂SO₄ 1%; ▲ - (NH₄)₂SO₄ 5%.....</p>	89
<p>Figura 35. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em pH = 11,0 a 298,15K. ■ - solução tamponada; ○ - PEG 400 1%;● - PEG 400 2%; % ;Δ - PEG 1500 1%; ▲ - PEG 1500 2%.....</p>	89
<p>Figura 36. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima+ (NH₄)₂SO₄ + água deionizada em pH = 11,0 a 298,15K. ■ - solução tamponada; Δ - (NH₄)₂SO₄ 1%; ▲ - (NH₄)₂SO₄ 5.....</p>	90
<p>Figura 37. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em pH = 11,5 a 298,15K. ■ - solução tamponada; ○ - PEG 400 1%;● - PEG 400 2%; % ;Δ - PEG 1500 1%; ▲ - PEG 1500 2%.....</p>	90

Figura 38. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + água deionizada em pH = 11,5 a 298,15K. ■ - solução tamponada; Δ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%; ▲ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5%.....	91
Figura 39. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....	93
Figura 40. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....	94
Figura 41. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.....	95
Figura 42. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções salinas. Linha preta – buffer pH = 8,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha azul – sulfato de amônio 50mM.....	95
Figura 43. Correlação dos modelos para o sistema composto por BSA+ PEG 2000 a 0,5 % em massa em pH 4,0 a 298,15 K. □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.....	101
Figura 44. Correlação dos modelos para o sistema composto por BSA+ PEG 2000 a 0,5 % em massa em pH 5,0 a 298,15 K. □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.....	102

Figura 45. Correlação dos modelos para o sistema composto por BSA+ PEG 2000 a 0,5 % em massa em pH 6,0 a 298,15 K. □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.....	102
Figura 46. Correlação dos modelos para o sistema composto por BSA+ Na ₂ SO ₄ a 10,0 % em massa em pH 5,0 a 298,15 K. □ – pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas – predição do modelo proposto.....	103
Figura 47. Correlação dos modelos para o sistema composto por IgG humana + NaCl a 5,0 % em massa em pH 8,0 a 298,15 K. □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.....	103
Figura 48. Comparação de modelos para correlação de Π (ovalbumina + PEG 2000 1% em pH 4,6). □ - pontos experimentais; linhas contínuas – modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas predição do modelo proposto.....	104
Figura 49. Comparação de modelos para correlação de Π (β -lactoglobulina + (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% em pH 5,3). □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas – predição do modelo proposto.....	104
Figura 50. Comparação de modelos para correlação de Π (lisozima + PEG 400 2% em pH 11,0). □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.....	105

Lista de Tabelas

Tabela 1. Curvas de pressão osmótica obtidas.....	44
Tabela 2. Espectros de fluorescência obtidos.....	46
Tabela 3. Espectros de dicroísmo circular obtidos.....	49
Tabela 4. Dados obtidos de valores de massa molar da proteína para o sistema contendo BSA a 298,15K.....	54
Tabela 5. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema BSA a 298,15 K.....	57
Tabela 6- Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema BSA com Na ₂ SO ₄ a 298,15 K em pH 5,0.....	57
Tabela 7. Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo BSA.....	66
Tabela 8. Dados obtidos de valores de massa molar da proteína para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio+ água deionizada a 298,15K.....	70
Tabela 9. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema IgG humana + NaCl + água deionizada a 298,15 K.....	70
Tabela 10. Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo IgG humana.....	73
Tabela 11. Dados obtidos de valores de massa molar da proteína para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio+ água deionizada a 298,15K.....	76
Tabela 12. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema ovalbumina a 298,15 K.....	77

Tabela 13. Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo ovalbumina em pH 5,0 .	79
Tabela 14. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema Beta-lactoglobulina a 298,15K.	82
Tabela 15. Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo β -lactoglobulina em pH 5,0.	87
Tabela 16. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema lisozima a 298,15 K em pH 10,5.	92
Tabela 17. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema lisozima a 298,15 K em pH 11,0.	92
Tabela 18. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema lisozima a 298,15 K em pH 11,5.	92
Tabela 19. Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo lisozima em pH 8,0.	96
Tabela 20. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e para o termo atrativo para o sistema BSA+ PEG 2000 + água deionizada a 298,15 K.	100
Tabela 21. Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e para o termo atrativo para o sistema BSA+ sulfato de sódio + água deionizada a 298,15 K.	100

Lista de Símbolos

A	energia livre de Helmholtz
A	absorbância
A_L	absorbância para a luz circularmente polarizada para a esquerda
A_R	absorbância para a luz circularmente polarizada para a direita
a	intervalo de interação protéica
a	parâmetro de perturbação de ordem zero
a_s	atividade do solvente
a_w	atividade da água
a_w^{ID}	atividade da água em solução ideal
B_2	segundo coeficiente virial
B_2'	segundo coeficiente virial expresso em concentração molar
$B_{2,pert}$	parte de perturbação do segundo coeficiente virial
B_3	terceiro coeficiente virial
BSA	albumina sérica bovina
BSADS	albumina sérica bovina dessalinizada
c	concentração
c_p	concentração do soluto/proteína
CD	dicroísmo circular
DVLO	teoria de Derjaguin-Verwey-Landau-Overbeek
e	unidade de carga elementar
F	função pressão osmótica-potencial químico da proteína de McMillan-Mayer.
F	força dimensional eletrostática para o modelo de Poisson-Boltzmann
f	força do oscilador para a absorção
f	força adimensional eletrostática para o modelo de Poisson-Boltzmann
G	energia livre de Gibbs
g	função de correlação

H	constante de Hamaker
h	distância mais próximas entre as moléculas de proteína
I	força iônica
I	intensidade de luz emitida
I_o	intensidade de luz emitida em $t= 0$
L	distância
M_p	massa molar do proteína
n	número de moles do soluto
n	expoente do potencial da força
N	número de componentes
n_r	número de resíduos na proteína
n^0	número de moles do solvente
N_{AV}	número de Avogadro
PEG	polietileno (glicol)
r	distância de centro-a-centro
r_b	diâmetro da molécula
R	constante dos gases
RPA	aproximação de fase randômica
S	entropia
T	temperatura
U_1	análogo à constante a na equação de estado de van der Waals
U_+	dispersão das interações de Van der Waals entre o cátion e proteína (+)
U_-	dispersão das interações de Van der Waals entre o ânion e proteína (-)
V	volume total
V_s	volume do solvente puro
$\bar{V}_s$	volume parcial do solvente
$\bar{V}_1$	volume parcial do soluto 1

w	fração mássica
W_{22}	potencial de interação entre as moléculas
W_{disp}	potencial de dispersão atrativo
W^{dl}	potencial de interação de dupla camada
W_{elec}	potencial de repulsão eletrostática
W_{esp}	potencial de poço quadrado
W_{Ham}	potencial de interação de dispersão de Hamaker
W^{hs}	potencial do termo de esferas rígidas
W_{osmotic}	potencial do volume excluído
W_{PB}	potencial de força de Poisson-Boltzman
x_i	fração molar do componente i
Z	fator de compressibilidade osmótico
z_p	valência da proteína
z_{ion}	carga do íon i

Letras Gregas

β_{+1}	coeficientes de dispersão cátion-macroíon para os macroíons 1
β_{+2}	coeficientes de dispersão cátion-macroíon para os macroíons 2
β_{-1}	coeficientes de dispersão ânion-macroíon para os macroíons 1
β_{-2}	coeficientes de dispersão ânion-macroíon para os macroíons 2
δ	largura
δ	distância mínima entre duas superfícies de proteínas.
ε	coeficiente de extinção molar
ε	força de interação da força de interação em contato por Curtis <i>et al.</i>

ε	constante dielétrica dependente da força iônica
ε_0	permissividade no vácuo
ε_{spec}	profundidade
ε_R	coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para direita
ε_L	coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para esquerda
η	fator de empacotamento
η	coordenadas bi-esféricas do modelo de Poisson-Boltzmann
η_0	valores defração de empacotamento em cada superfície esférica para o modelo de Poisson-Boltzmann
θ	coordenadas bi-esféricas do modelo de Poisson-Boltzmann
θ	elipitcidade
θ_m	elipitcidade molar
$[\theta]$	elipitcidade molar residual média
κ	inverso do comprimento de Debye
κ_B	constante de Boltzmann
λ	número adimensional, função do fator de empacotamento
λ	comprimento de onda
μ_i	potencial químico de referência para espécies puras i
μ_s	potencial químico do solvente
$\hat{\mu}_s$	potencial químico do solvente em uma solução contendo soluto
μ_p^θ	potencial químico da proteína em estado de diluição infinita
Π	pressão osmótica
ρ	densidade
ρ_p	densidade do soluto/proteína
σ	diâmetro da molécula de proteína
σ_{ion}	composição no diâmetro do íon

σ_{ps}	média ponderada pela composição no diâmetro do íon
τ	período de desestimulação média
τ^{-1}	parâmetro reduzido que caracteriza a força de atração
ϕ	coeficiente osmótico
Φ	rendimento de fluorescência
Ψ	potencial eletrostático em forma adimensional
Γ	função de estado de Gibbs-McMillan-Mayer
$U_{\text{cátion}}$	coeficiente estequiométrico do cátion
$U_{\text{ânion}}$	coeficiente estequiométrico ânion

Subscritos

p	proteína
PEG	polietileno (glicol)
i	inside
ideal	estado de solução ideal
$i, j, \text{ e } m$	contadores
o	outside
r	residual
s	solvente
virial	referente à equação virial
$+$	cátion
$-$	ânion

Sobrescritos

EX	quantidade excedente
GM	Gibbs-McMillan-Mayer
M	McMillan-Mayer
0	estado de referência
PB	Poisson-Boltzmann
α	lado de um sistema de duas células, isotérmico e dividido por uma membrana semi-permeável, na célula α existe o soluto 1 e alguns solventes
β	lado de um sistema de duas células, isotérmico e dividido por uma membrana semi-permeável na célula β há além dos componentes presentes na outra célula um ou mais solutos diferentes.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Não-idealidade de soluções.....	2
2. Objetivos.....	6
3. Revisão Bibliográfica.....	7
3.1. Termodinâmica de soluções proteicas.....	12
3.2. Interações entre moléculas proteicas e desenvolvimento de modelos.....	14
3.3. Fluorescência.....	28
3.4. Dicroísmo circular.....	32
3.5. Proteínas.....	34
3.5.1. Albumina sérica bovina.....	35
3.5.2. Imunoglobulina G humana.....	35
3.5.3. Ovalbumina.....	36
3.5.4. Beta-lactoglobulina.....	37
3.5.5. Lisozima.....	37
3.5.6. Co-solventes.....	38
4. Materiais e métodos.....	40
4.1. Materiais.....	30
4.2. Métodos.....	41
4.2.1. Ultra-filtração da amostra.....	41
4.2.2. Eletroforese.....	41

4.2.3. Obtenção de dados de pressão osmótica.....	42
4.2.4. Medidas de fluorescência.....	45
4.2.5. Medidas de dicroísmo circular.....	48
5. Resultados.....	51
5.1. Albumina sérica bovina.....	51
5.2. Imunoglobulina G humana.....	67
5.3. Ovalbumina.....	74
5.4. Beta-Lactoglobulina.....	80
5.5. Lisozima.....	88
6. Modelagem termodinâmica.....	98
7. Conclusões finais e recomendações para trabalhos futuros	106
Referências bibliográficas.....	108
APÊNDICE A - Tabelas de resultados de pressão osmótica obtidos.....	121
APÊNDICE B - Espectros de fluorescência e dicroísmo circular obtidos.....	139
APÊNDICE C – Dados da literatura de determinação do segundo coeficiente osmótico virial.....	179

1. Introdução

A constatação de que significativa parcela dos custos de investimento e operação de uma indústria química concentra-se nos processos de separação e purificação de produtos, justifica, em grande parte, a pesquisa de modelos termodinâmicos cada vez mais acurados para o cálculo de equilíbrio de fases. Isso é especialmente verdadeiro em processos de transformação biotecnológica: o estudo, tanto experimental quanto teórico, da Termodinâmica de soluções de bioprodutos é uma das principais fronteiras da Engenharia Química (Mollerup, 2006; Sadowski, 2008). De maneira geral, as propriedades de soluções de bioprodutos são afetadas por um número maior de variáveis, o que resulta em um acréscimo de complexidade tanto teórica quanto experimental.

De modo geral, podem ser entendidos como *processos de transformação biotecnológica* os processos cuja etapa reacional corresponda a uma síntese biológica. Como outros processos químicos, os de transformação biotecnológica compreendem diversas operações unitárias – iniciando-se com etapas de pré-tratamento, passando pela síntese propriamente dita (etapa reacional) e operações de *downstream* (operações de separação visando à formulação e à disposição final do produto almejado). As operações de *downstream*, embora não constituam o cerne do processo, são também fundamentais, pois o resultado da síntese biológica, independentemente do organismo nela envolvido, é uma mistura complexa da qual a molécula cuja produção se objetiva é apenas um dos constituintes. Ao final do processo esta molécula deverá estar presente em níveis de pureza que satisfaçam os requisitos da finalidade à qual ela se destina – diferentes, por exemplo, para uma enzima de uso industrial e um produto de uso terapêutico. Essas etapas são responsáveis por uma parcela considerável do custo final de produção, sendo por vezes reconhecidas como a etapa limitante do desenvolvimento de bioprocessos (Rito Palomares, 2008).

Muitas das operações de recuperação e purificação de bioprodutos correspondem a processos de separação usuais em Engenharia Química, modificados

para respeitar as particularidades de sistemas que contenham compostos de origem biológica. Consideremos, inicialmente, as operações unitárias de precipitação e cristalização. A solubilidade de uma proteína em solução – fundamento destas operações – é governada pelos mesmos princípios fundamentais (condições de equilíbrio termodinâmico) que regem o comportamento de qualquer substância em equilíbrio sólido-líquido. Reconhecida a semelhança entre os fenômenos em si, é necessário ressaltar sua diferença: o estudo de sistemas que contenham biomoléculas é mais complexo, pois seu comportamento é afetado por um número maior de variáveis. – considerem-se, por exemplo, os inúmeros fatores que influenciam a solubilidade de uma proteína. Ademais, a presença de biomoléculas impõe restrições à própria descrição dos sistemas: o equilíbrio sólido-líquido é usualmente calculado a partir de um caminho de integração que inclui a fusão da substância presente em fase sólida, abordagem que não pode ser usada na descrição da precipitação de proteínas, pois não se pode submetê-las à fusão.

Outra operação unitária encontrada em processos de *downstream* cujo princípio fundamental assenta-se sobre um equilíbrio de fases é a extração líquido-líquido, incluindo-se nesta classificação as separações em sistemas aquosos bifásicos (formados pela adição de dois polímeros, de um único polímero termo-sensível, ou de um polímero e um sal) e as separações em sistemas micelares reversos. Nesse caso, a eficiência da separação é função da partição assimétrica da molécula alvo e dos contaminantes do meio em que inicialmente ela se encontra. O equilíbrio líquido-líquido que se estabelece é função da não-idealidade causada pela adição dos solutos que induzem a separação de fases, e a partição é função também dessa não-idealidade, sendo possível relacioná-la a propriedades dos constituintes, como tamanho, forma, hidrofobicidade e a presença (ou ausência) de interações específicas.

1.1. Não-idealidade de soluções

É sabido que o estudo de soluções proteicas com vistas a operações de recuperação e purificação de bioprodutos passa pelo estudo específico de propriedades

diretamente ligadas à não-idealidade da solução. Comunmente, nos processos de *downstream* a informação experimentalmente acessível e necessária pode ser condensada no segundo coeficiente virial da expansão da pressão osmótica em função da concentração. A pressão osmótica é o valor Π que satisfaz a relação de igualdade do potencial químico do solvente:

$$\hat{\mu}_s(T, P + \Pi, c_p) = \mu_s(T, P, c_p = 0) \quad (1)$$

em que $\hat{\mu}_s(T, P, \Pi + c_p)$ é o potencial químico do solvente em uma solução contendo soluto em concentração c_p (nesse trabalho, proteína, expressa em massa de proteína por volume de solução) e à pressão $P + \Pi$, e $\mu_s(T, P, c_p = 0)$ é o potencial químico do solvente puro na pressão de referência P , ambos à temperatura absoluta T . A partir da equação acima, pode-se estabelecer que:

$$\hat{\mu}_s(T, P + \Pi, c_p) - \hat{\mu}_s(T, P, c_p) = \int_P^{P+\Pi} \bar{V}_s dP \quad (2)$$

em que $\bar{V}_s$ é o volume parcial do solvente. Para sistemas em que $\bar{V}_s$ não seja função de concentração ou pressão, a equação acima resulta na clássica relação:

$$\Pi = -\frac{RT}{V_s} \ln a_s \quad (3)$$

em que a_s é a atividade do solvente (em T , P e concentração de proteína c_p , calculada com referência ao solvente puro em T e P), R é a constante dos gases e V_s é o volume do solvente puro. Conhecendo-se uma expressão da pressão osmótica em função de c_p , é possível conhecer a atividade do solvente e, pela equação de Gibbs-Duhem, a atividade do soluto. A pressão osmótica pode ser expressa por meio da equação virial:

$$\frac{\Pi}{c_p RT} = \frac{1}{M_p} + B_2 c_p + B_3 c_p^2 + \dots \quad (4)$$

em que M_p é a massa molar da proteína e B_2 é o segundo coeficiente virial. Termos de ordem superior são negligenciáveis, e mesmo o terceiro coeficiente (B_3) é difícil de ser determinado com suficiente precisão. O segundo coeficiente virial B_2 relaciona-se ao potencial intermolecular por meio da equação (Neal *et al.*, 1998):

$$B_2 = -\frac{2\pi N_{AV}}{M_p^2} \int_{\sigma}^{\infty} [e^{-W_{22}(r)/\kappa_B T} - 1] r^2 dr \quad (5)$$

em que $W_{22}(r)$ é o potencial de interação entre moléculas proteicas no solvente específico, função da distância centro-a-centro r (e σ é o diâmetro da molécula) N_{AV} é o número de Avogadro e κ_B , a constante de Boltzmann.

Caso o solvente seja único, a aplicação das equações (1) a (4) é direta. Entretanto, há casos em que o solvente, na verdade, é constituído por uma mistura – e são estes os sistemas de maior interesse: a adição de outras substâncias (principalmente sais e polímeros) é realizada justamente para promover a separação da biomolécula. Nesse caso, estas equações ainda se aplicam, com a ressalva de que por “solvente” deve ser subentendida a *mistura de solventes*. O segundo coeficiente virial da expansão osmótica, em sua definição, relaciona-se às interações entre pares de moléculas proteicas (equação 5); nesse caso, o meio (o solvente – ou a solução em que se encontram as moléculas proteicas) altera o potencial de atração intermolecular, alterando o segundo coeficiente virial, que será nesse caso função da composição do meio. Em um processo de separação que envolva equilíbrio de fases, o potencial químico da biomolécula nas fases em equilíbrio deve ser o mesmo e, *desde que o estado de referência seja o mesmo*, deverá ser igual também a atividade. No caso em que uma molécula distribua-se em fases líquidas e seu comportamento seja descrito pela abordagem de McMillan e Mayer, o estado de referência é diferente, sendo necessário estabelecer o relacionamento entre os diferentes estados.

Com o intuito de calcular o segundo coeficiente virial a partir do valor da pressão osmótica obtida experimentalmente, tem-se uma simplificação da equação 4:

$$\frac{\Pi}{RT\rho_p} = 1 + B'_2 \rho_p \quad (6)$$

em que ρ_p é a concentração molar da proteína e B'_2 é o segundo coeficiente, expresso em termos de concentração molar.

Mesmo no estudo de outras operações de separação, a não-idealidade entendida em sentido termodinâmico desempenha papel fundamental. Como exemplo,

na modelagem de técnicas cromatográficas como exclusão molecular e interação hidrofóbica, a partição entre a fase móvel e a fase estacionária pode ser aproximada pela condição de equilíbrio termodinâmico, e é possível estabelecer relações entre o coeficiente de distribuição e a concentração da biomolécula (Ahamed *et al.*, 2006). Relações também podem ser estabelecidas entre o coeficiente de retenção em coluna de permeação em gel e o coeficiente de partição em sistemas aquosos bifásicos (Shibukawa *et al.*, 2008). Essas observações são particularmente importantes ao se considerar que a modelagem de processos cromatográficos tem-se tornado etapa fundamental da síntese de processos de *downstream* em escala preparativa (Asenjo *et al.*, 2008).

Portanto, observa-se que o conhecimento da não-idealidade de soluções proteicas pode ser de fundamental importância para o estudo, a síntese, o projeto e a eventual otimização de processos de separação. É essa necessidade que motiva o presente trabalho.

2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho é o estudo experimental e teórico da não-idealidade termodinâmica de soluções proteicas, visando verificar a influência de alguns sais e polímeros no comportamento de proteínas em solução. Essa investigação foi feita por meio da determinação da pressão osmótica, com auxílio de medidas de fluorescência e espectros de dicroísmo, e seu ajuste por meio de modelos específicos para a descrição desta propriedade, em função das variáveis pertinentes de cada sistema em questão. Foram abordadas cinco proteínas: albumina de soro bovino, imunoglobulina G humana, ovalbumina, β -lactoglobulina e lisozima. Como co-solventes utilizaram-se polietileno glicol de diferentes tamanhos de cadeia (400, 600, 1000, 1500 e 2000 g·mol⁻¹), e os sais cloreto de sódio, sulfato de amônio e sulfato de sódio,

3. Revisão Bibliográfica

Deve-se reconhecer, inicialmente, que o estudo de processos de separação não é usualmente conduzido por meio do estudo de propriedades termodinâmicas de solução, mas principalmente pelo estudo direto de sistemas em equilíbrio visando à purificação de uma molécula determinada a partir de um meio. Tais estudos têm um viés específico – a eficácia de uma operação é quantificada por parâmetros relativos à separação desejada. A importância desse tipo de estudo não deve ser minimizada, pela usual complexidade do conjunto de operações de separação e por restrições envolvendo a certificação do processo (por exemplo, na produção de agentes terapêuticos): a maioria dos processos de *downstream* atualmente em operação foi estudada dessa maneira. Em muitos estudos, entretanto, o comportamento de uma biomolécula em determinada operação é analisado visando à sua separação, mas sem relação direta com um processo em si. Assim, podem ser mencionados estudos acerca da partição de proteínas em sistemas de duas fases aquosas (incluindo sistemas micelares) e em sistemas de micelas reversas (cf. a revisão apresentada em Mazzola *et al.*, 2008). Conforme salientam Curtis *et al.* (2001), a precipitação de proteínas induzida por sal e também sua cristalização induzida por sal são amplamente utilizadas como métodos de separação na bioquímica e biotecnologia. A precipitação de proteína induzida por sal é comumente usada como o primeiro passo na purificação de proteínas, devido à sua seletividade e baixo custo; já a cristalização de proteína induzida por sal é frequentemente utilizada para a obtenção de cristais de proteínas para estudos que envolvem difração de raios. Esses dados podem ser interpretados, por exemplo, com o auxílio de modelos de energia de Gibbs excedente, ou com modelos empíricos (Madeira *et al.*, 2008).

Embora nesse caso informações mais fundamentais possam ser obtidas – e, eventualmente, por meio do ajuste de modelos, possam ser entendidos com maior pertinência os fatores que afetam o comportamento de uma biomolécula em solução – o número de variáveis envolvidas em dados relacionados a operações de separação limita, por vezes, a análise nessa direção. Como exemplo, na partição de uma

biomolécula em sistemas aquosos bifásicos concorrem fatores distintos como a exclusão de volume, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, entre outros, e nem sempre é possível estudar isoladamente a influência de cada um desses fatores.

Tanto a separação em duas fases aquosas quanto a precipitação ou a cristalização são operações de equilíbrio de fases em que a proteína distribui-se desigualmente entre as fases em equilíbrio. A concepção e o funcionamento correto deste tipo de operações exigem o conhecimento de propriedades, tais como o ponto isoelétrico da proteína, solubilidade e hidrofobicidade. Outro parâmetro muito importante neste tipo de processo é o segundo coeficiente virial osmótico.

Há muitos métodos bem estabelecidos para a determinação experimental do segundo coeficiente de virial osmótico de proteínas em solução: osmometria membrana Lu *et al.* (2009), Zalar *et al.* (2006), Moon *et al.* (2000a,b), Wu e Prausnitz (1999) e Rešcic *et al.*, (2001); espalhamento de laser em baixo ângulo, Aymard *et al.*, (1996), Liu *et al.*, (2005), Demoruelle *et al.*, (2002), Asthagiri *et al.*, (2005) e Hamsa Priya *et al.* (2011); medidas de ponto de névoa, Prausnitz, (2003); cromatografia de auto-interação, Tessier *et al.*, (2002) e Martin e Lenhoff (2011); equilíbrio de sedimentação, Behlke e Ristau, (1999), Winzor *et al.*, (2007), Deszczynski *et al.* (2006). Inclusive, há exemplos de sua determinação por meio de curvas de solubilidade, Rosenbaum e Zukoski, (1996) e Mehta *et al.* (2012). Porém, há relativamente poucos dados disponíveis dos coeficientes virial de soluções contendo proteínas na literatura, especialmente considerando o grande número de proteínas de interesse industrial e à multiplicidade de condições que ocorrem em processos industriais.

Demoruelle *et al.*, (2002) abordaram a albumina sérica equina (ESA) e a ovalbumina, com sulfato de amônio em pH 5,4 e 22°C. Nesse referido trabalho, os autores correlacionaram o segundo coeficiente osmótico obtido pelo espalhamento de luz e pela solubilidade desses sistemas. Rosenbaum e Zukoski, (1996), também apresentaram valores de B₂ obtidos através da solubilidade de sistemas com a lisozima em pH de valores 4,6, 7,0, e 7,4 com a força iônica variando de 0,22 a 1,3M. Relações teóricas entre o segundo coeficiente virial osmótico e a solubilidade da proteína foram desenvolvidos por Guo *et al.* (1999), Haas *et al.* (1999) e Ruppert *et al.* (2001) e

Allahyarov et al. (2002). Além destes modelos teóricos, algumas equações empíricas foram recentemente propostos também na literatura por Mehta et al., (2012), que apresentaram os valores do segundo coeficiente osmótico virial obtidos pelas curvas de solubilidade das proteínas: α -amilase, ovalbumina e lisozima com cloreto de sódio e sulfato de amônio como co-solventes, com variação no valor da força iônica assim como do pH.

Vale ressaltar que, para solvente e soluto únicos, as técnicas anteriormente citadas usualmente fornecem resultados semelhantes – dentro do desvio experimental. No caso específico de proteínas, técnicas de espalhamento de luz têm sido mais utilizadas no estudo de interações específicas entre moléculas proteicas (Liu *et al.*, 2005, Paliwal *et al.*, 2005), pela rapidez em se obterem os dados. Sistemas contendo lisozima foram estudados por Liu *et al.* (2005) com cloreto de guanidínio (GdnHCl) como co-solvente e força iônica variando de 0, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 6,5, e 7,0M em pH igual a 4,5, também através de técnicas de espalhamento de luz dinâmico e estático. Aymard *et al.*, (1996) mediram sistemas contendo beta-lactoglobulina com força iônica 0,1M com $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ em pH 2,0 e 7,0 e temperatura variando de 5 a 76 °C. Asthagiri *et al.*, (2005) compara medidas experimentais de B_2 obtidos também por espalhamento de luz de sistemas contendo lisozima com pH igual a 5,0, 7,0 e 9,0 e força iônica de 7 a 60 mM a 25 °C na predição de um modelo proposto sobre interações proteína-proteína. Por fim, Hamsa Priya *et al.* (2011) estudaram o efeito da hidrofobicidade do grupo terminal do PEG (metil e hidroxila) como co-solvente em sistemas contendo lisozima através de medidas de espalhamento de luz. Os sistemas contendo lisozima e PEG 1000 em pH de valores 6,2 e 7,0 com NaCl como co-solvente, com força iônica variando de 0,01 a 0,8M

Outra maneira de obtenção do segundo coeficiente osmótico virial é o equilíbrio de sedimentação, Deszczynski *et al.*, (2006), estudaram sistemas contendo albumina sérica equina (ESA) em pH 5,6 e lisozima em pH 4,5, ambos com sulfato de amônio a concentração do co-solvente variou de 0 a 2,0M e de 0 a 1,0M, respectivamente e para a lisozima. Também apresentando resultados com a mesma técnica, Winzor *et al.*, (2007) abordaram sistemas com ovalbumina em pH igual a 4,6 e como co-solventes:

cloreto de sódio e sucrose, as concentrações variaram de 0,04 a 0,20M e 0,025 a 0,20M, respectivamente. Behlke e Ristau, (1999), utilizaram também do equilíbrio de sedimentação com a lisozima e ovalbumina. Com a lisozima realizaram estudos com a concentração do co-solvente, NaCl, variando de 0 a 5% em pH 4,5 e também somente variando o valor do pH de 4,5 a 7,5. Para a ovalbumina a abordagem foi realizada em pH de 8,5 e sem a presença co-solventes.

Outra maneira de se estudar o comportamento de biomoléculas em solução compreende a obtenção de dados relativos ao solvente e o posterior relacionamento com a atividade (em sentido termodinâmico) do soluto por meio de equações exatas derivadas da relação de Gibbs-Duhem. Na maioria dos casos, as medidas experimentais incluem a atividade de água ou a pressão osmótica – especialmente essa última, por razões práticas.

Um método mais recente para a medição do segundo coeficiente virial B_2 é a cromatografia de auto-interação (SIC), em que a proteína de interesse é imobilizada numa coluna cromatográfica. O tempo de retenção na coluna de um pulso da mesma proteína em condições de eluição isocrática fornece uma medida do atraso devido a interações entre a proteína livre e imobilizada. O método é uma variante da cromatografia de afinidade, e seu principal foco de utilização é a caracterização das interações proteína-proteína, conforme Martin e Lenhoff (2011), que apresentaram resultados com catalase em pH 7,0 e sulfato de amônio de 0 a 1M como co-solvente. Há estudos de comparação desse método de caracterização de interações proteína-proteína com base na determinação do segundo coeficiente osmótico virial pela cromatografia de auto-interação em relação aos dados obtidos a partir de espalhamento de luz estática em Le Brun *et al.* (2010), nesse referido trabalho os autores abordaram sistemas contendo IgG humana em pH 6,2 com diferentes soluções tampão (citrato, fosfato, succinato, histidina e histidina com EDTA), bem como com cloreto de sódio como co-solvente em 10 e 150mM. Tessier *et al.* (2002) comparam os valores para o segundo coeficiente do viral obtidos por cromatografia de auto-interação com espalhamento de luz estático, os autores estudaram sistemas contendo lisozima e α -quimotripsinogênio, com NaCl como co-solvente com sua concentração variando de 0,1

a 0,7M em pH de valores 3,0, 4,5, 6,0, 7,0, 7,8, e 9,0 para a lisozima e 0,1 a 0,3M em pH 3,0, 4,0, 5,0 e 6,8 para o quimotripsinogênio.

Apesar de não constituir a maioria dos experimentos ligados ao segundo coeficiente osmótico, medidas de pressão osmótica de soluções proteicas por meio de osmometria de membrana têm subsidiado vários estudos sobre soluções proteicas, inclusive pelo fato de ser o único método de medida do segundo coeficiente virial em que se obtém efetivamente o valor da pressão osmótica. Apesar de ser uma técnica relativamente simples, há diferenças justamente na interpretação dos desvios da idealidade; assim, por exemplo, McCarty e Adams (1987) mostram que dados de pressão osmótica de soluções de lisozima e ovalbumina em solução tampão cacodilato em pH 5,8 com 0,02 M de força iônica e temperatura variando de 30 e 37 °C, podem ser interpretados como uma evidência de associação cruzada ou como uma indicação da não-idealidade dessas soluções. A formação de dímeros de albumina sérica humana (HSA) também pôde ser inferida por dados de osmometria de membrana, em Reščic *et al.*, (2001) obtiveram medidas de osmometria também de HSA em tampão de fosfato (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) com força iônica que variava em 0,01, 0,1 e 1,0M. Também em Zalar *et al.*, (2006), os autores abordaram a proteína albumina sérica humana (HSA) com NaCl (0,15M), K_2HPO_4 e KH_2PO_4 (0,1M) como co-solventes, variando o pH em 4,0, 5,4 e 8,0. – mas nesses casos, evidência suplementar advém de experimentos de espalhamento de raio-X de baixo ângulo em soluções diluídas; similarmente, Schaink e Smit (2000) estudaram a dimerização da β -lactoglobulina por meio de medidas de pressão osmótica. Medidas diretas de pressão osmótica também podem ser utilizadas no estudo da influência de sais no comportamento de proteínas em solução, em soluções proteicas binárias (Youssef *et al.*, 2002) ou em soluções de uma única proteína (Chahine *et al.*, 2005). A interação entre moléculas proteicas e outros polímeros também é possível com essa técnica (Schaink e Smit, 2007). O uso de dados de osmometria de membrana para subsidiar o desenvolvimento de modelos é ilustrado pelo trabalho clássico de Haynes *et al.* (1992) e por Minton (2008). Moon *et al.* (2000a) apresentam dados de osmometria de membrana de soluções proteicas contendo lisozima e sais como co-solventes, dentre eles, sulfato de amônio, oxalato de amônio e

fosfato de amônio, em diferentes valores de força iônica 1 ou 3M e diversos valores de pH, 4,0, 7,0 e 8,0 a 25°C. Também (Moon *et al.*, 2000b) apresentaram os resultados para o segundo coeficiente virial proveniente de medidas de osmometria em sistemas contendo BSA e lisozima e sulfato de amônio como co-solvente, em que as interações proteicas cruzadas e entre si foram analisadas, variou-se a força iônica 1,0 ou 3,0M, bem como o pH, 4,0, 6,0, 7,0 e 8,0; também a 25°C. O uso de osmômetro coloidal também foi aplicado no trabalho apresentado por Wu e Prausnitz, (1999), em que sistemas contendo BSA e cloreto de sódio como co-solvente em diferentes valores de pH (4,5, 5,4 e 7,4) e força iônica (1,0, 3,0 e 5,0M), para posterior comparação com modelos termodinâmicos de potencial de força média e de van der Waals. E, por fim, Lu *et al.* (2009) realizaram medidas de osmometria de membrana em sistemas contendo BSA com sulfato de amônio como co-solvente, variando a concentração salina em 0,15, 0,50, 1,00 e 1,50 mol.L⁻¹; em valores de pH iguais a 4,8, 5,4 e 7,4; para posterior modelagem termodinâmica.

3.1. Termodinâmica de soluções proteicas

A abordagem termodinâmica diretamente relacionada às técnicas experimentais apresentadas anteriormente é aquela baseada no formalismo de McMillan e Mayer – em que se podem desenvolver equações que fornecem a pressão osmótica gerada pela presença de uma macromolécula considerando o solvente como um meio contínuo. Em grande parte, modelos desenvolvidos nesse formalismo compreendem expressões para a pressão osmótica calculadas, no contexto da teoria da perturbação, pela soma de um termo de referência – contribuição devida ao volume ocupado pelas moléculas – e um termo de perturbação – que leva em conta as diversas interações entre as moléculas, como as de curto alcance e eletrostáticas. Diversos autores têm apresentado expressões para os termos que compõe a expressão da pressão osmótica, entre os quais podem ser citados von Solms *et al.* (2002), Kim e Bae (2003) e Tavares e Prausnitz (2004). À parte o termo de referência de esferas rígidas, para o qual se considera, por exemplo, a equação de Carnahan e Starling (1969), os modelos

em geral diferem pelo termo de perturbação, que é função do potencial de interação $W_{22}(r)$, além das aproximações para a função de correlação $g(r)$ e truncamentos do termo de perturbação. Esse potencial pode incluir contribuições relativas à interação eletrostática, ao potencial de dispersão (de Hamaker), às interações específicas e ao potencial de volume excluído (também chamado de potencial osmótico). Outras abordagens podem ser encontradas, por exemplo, em Fornasiero *et al.* (1999), que usam um potencial atrativo único, e Sear (1999), que usa para o termo de perturbação a teoria de Wertheim (base da Teoria Estatística do Fluido Associativo).

Por meio desse tipo de estudo podem ser analisadas especificamente as interações entre as biomoléculas presentes e a influência do meio nessas interações, como no estudo da série de Hofmeister por Moreira *et al.* (2006). Algumas vezes, essa abordagem é utilizada em uma interpretação mais fundamental, como em Pokarowski *et al.* (2005) e Cellmer *et al.* (2005). Entretanto, deve-se também lembrar que há vozes discordantes sobre a aplicação de alguns dos princípios sobre os quais se assentam estes trabalhos – assim, uma crítica à separação entre contribuições eletrostáticas e interações específicas é apresentada em Boström *et al.* (2001), e Zhang e Cremer (2006) afirmam que a série de Hofmeister não pode ser explicada apenas por alterações na estrutura da água, mas que interações específicas entre íons e macromoléculas precisam ser levadas em conta explicitamente, o que em certo sentido contradiz um dos fundamentos da abordagem. Em uma vertente mais ligada à engenharia de processos, modelos de G^{EX} também são usados na modelagem do equilíbrio de fases em sistemas contendo proteínas: mencionem-se aqui a utilização da equação UNIQUAC por Avena *et al.*, (1997, 1999) em sua forma original e por Coutinho e Pessoa (2004), modificada para inclusão de um termo de longo alcance e pela adoção de novo termo combinatorial, e dos modelos de Flory-Huggins (Pessoa Filho e Mohamed, 2004) e Wilson (Madeira *et al.*, 2005) modificados para levar em conta aspectos peculiares do comportamento desses sistemas. Como pode ser observado, embora haja diversos estudos experimentais sobre o comportamento termodinâmico de proteínas em solução, e haja descrições termodinâmicas elaboradas deste comportamento, inexistente uma investigação experimental sistemática sobre a influência

de co-solventes nas propriedades termodinâmicas de proteínas em solução. Essa ausência se torna mais crítica na medida em que a própria interpretação de dados experimentais é por vezes incerta, em função das hipóteses feitas.

3.2. Interações entre moléculas proteicas e desenvolvimento de modelos

No passado, as medidas de pressão osmótica de soluções proteicas eram geralmente feitas em soluções diluídas e com a finalidade de obter peso molecular e conformação de dados, sendo poucos os exemplos de medições até concentrações moderadas – e poucos os modelos desenvolvidos para essas regiões. A abordagem tradicional da modelagem da pressão osmótica é o modelo de equilíbrio de membrana de Donnan. Neste contexto o tratamento de Scatchard (1946) do potencial químico de multicomponentes exato simplesmente correlaciona os dados dentro do intervalo experimental disponível; o mesmo vale para a interpretação semi-quantitativa dos coeficientes osmóticos virial de soluções proteicas em termos de exclusão de volume e efeitos de interação atrativa. Vilker *et al.*, (1980).

A abordagem mais promissora para a modelagem de dados de pressão osmótica é a teoria da solução de McMillan-Mayer, a partir do qual os coeficientes osmóticos virial podem ser estimados de maneira análoga à pressão de um gás não-ideal. Hill (1960) aplicou pela primeira vez essa teoria ao estudo de partículas coloidais carregadas que apresentam repulsão de camada dupla.

Na modelagem da pressão osmótica, muitas vezes, é assumido que as proteínas globulares em solução aquosa podem ser representadas por esferas rígidas. Esta suposição é apoiada pela observação feita por Wang e Bloomfield (1990), de que a pressão osmótica de várias soluções proteicas contendo sais obedece a uma equação de estado de esferas rígidas. Contudo, dependendo das condições do solvente as moléculas de proteína podem estar carregadas, e no ponto isoelétrico (pH no qual as moléculas não apresentam carga líquida) a interação proteína-proteína comumente será fracamente atrativa. Uma mudança nas condições do solvente pode influenciar as interações entre as moléculas de proteínas, o que pode resultar, por exemplo, em

soluções aquosas contendo proteínas e polímeros, em uma mudança no equilíbrio de fases, com a formação de uma fase sólida. O segundo coeficiente osmótico virial da solução proteica fornece informações diretas sobre a interação entre as moléculas de proteínas. Portanto, um exame cuidadoso da pressão osmótica é de grande importância para o estudo dos processos acima descritos, Schaink e Smith (2000).

Tessier *et al.* (2002) abordam a compreensão das interações fracas entre proteínas, que são importantes para o tratamento de distúrbios biológicos (Hirsch, 1988; Zhang, 1994), cristalização de proteínas (Durbin, 1996), inclusive para o desenvolvimento de fármacos (Oakley, 2000), purificação de misturas de proteínas (Mukai, 1998), para o entendimento da difusão de proteínas em soluções concentradas (Kuehner, 1997) e formulação de proteínas terapêuticas estabilizadas (Cleland, 1993). Essas interações fracas são freqüentemente caracterizadas em termos do segundo coeficiente virial (B_2), especialmente porque ele pode ser medido utilizando tradicionais técnicas de caracterização coloidal, tais como espalhamento de luz estático (SLS) (George, 1994; Bonnete, 1999; Guo, 1999; Hitscherich, 2000), raio-X de baixo ângulo (Porschel, 1977; Ducruix, 1996) ou nêutron (Receveur, 1998; Velev, 1998) dispersão e osmometria de membrana (Haynes, 1992; Schaink, 2000). Interações proteína-proteína também podem ser mensuradas por uma variedade de técnicas de cromatografia, incluindo cromatografia de auto-interação.

O segundo coeficiente osmótico virial é supostamente uma medida direta do potencial de força média e um valor negativo indica, portanto, uma interação proteína-proteína atrativa. Os tipos de interações que favorecem a cristalização de proteínas podem também ser significativos em soluções em que o segundo coeficiente osmótico altera-se conforme a solubilidade das proteínas, que faz com que o segundo coeficiente seja um parâmetro chave para o estudo de uma possível cristalização, Mollerup e Breil (2009b).

De modo geral, o valor de B_2 é caracterizado pelo potencial de força média W_{22} . A mecânica estatística fornece uma relação entre o potencial de força média e o segundo coeficiente virial. A função de estado de McMillan-Mayer tem variáveis independentes (T, V, n, μ_s), em que T é a temperatura, V é o volume, n é o número de

moles do soluto e μ_s é o potencial químico do solvente. O número de moles do solvente, n^0 , é uma variável dependente na teoria de McMillan-Mayer, Mollerup e Breil (2009b).

Na teoria de McMillan-Mayer o coeficiente osmótico virial é identificado por:

$$B_2^M = \frac{V}{2RT} \left(\frac{\partial \mu_p^r(T, V, \mu_s, n)}{\partial n_p} \right)_{T, V, \mu_s}^{\infty} \quad (7)$$

O subscrito r indica o potencial químico residual e o sobrescrito M refere-se à teoria de McMillan-Mayer. O resultado da expansão de Taylor da pressão osmótica é dado por:

$$\Pi^M = c_p RT + c_p^2 \frac{V}{2} \left(\frac{\partial \mu_p^r}{\partial n_p} \right)_{T, V, \mu_s}^{\infty} + c_p^3 \frac{V^2}{3} \left(\frac{\partial^2 \mu_p^r}{\partial n_p^2} \right)_{T, V, \mu_s}^{\infty} + \dots \quad (8)$$

Derivando o potencial residual obtém-se o segundo coeficiente osmótico para um solvente puro:

$$B_2^M = \frac{V}{2RT} \left(\frac{\partial \mu_p^r}{\partial n_p} \right)_{T, V, \mu_s}^{\infty} \quad (9)$$

De acordo com os autores uma desvantagem do uso da teoria de McMillan-Mayer é que os eletrólitos são considerados componentes do solvente. Esta limitação pode ser contornada por meio do desenvolvimento, pelos autores, de uma função Gibbs-McMillan-Mayer, em que ao contrário de McMillan-Mayer a presença de um sal na solução proteica é tratada de maneira direta, como solvente único.

Sumarizemos os resultados de Mollerup e Breil (2009a,b). Considerando uma mistura de N componentes. Os primeiros m componentes são solutos e os demais $m+1$ componentes são solventes. A relação da função de estado de Gibbs-McMillan-Mayer, Γ , é obtida através da transformada de Legendre da função de estado de Gibbs.

$$\Gamma(T, P, n, \mu_s) = G(T, P, n, n^0) - \sum_{j=m+1}^N \left(\frac{\partial G(T, P, n, n^0)}{\partial n_j^0} \right)_{T, P, n} n_j^0 \quad (10)$$

Os diferenciais das funções de estado são:

$$dG = -Sdt + VdP + \sum_{i=1}^m \mu_i dn_i + \sum_{j=m+1}^N \mu_j^0 dn_j^0 \quad (11)$$

$$d\Gamma = -Sdt + VdP + \sum_{i=1}^m \mu_i dn_i + \sum_{j=m+1}^N n_j^0 d\mu_{s,j} \quad (12)$$

em que S é a entropia, V o volume total. Derivando as equações 21 e 22:

$$\left(\frac{\partial \Gamma}{\partial n_i} \right)_{T,P,\mu_s} = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T,P,n^0} = \mu_i \quad i = (1, m) \quad (13)$$

Na equação (13) se $i \leq m$, tem-se:

$$\mu_i(T, P, n, \mu_s) = \mu_i(T, P, n, n^0) = \mu_i^{id} + \mu_i^{EX} \quad (14)$$

sendo os sobrescritos ID de mistura ideal e EX de propriedade em excesso. Os potenciais químicos de mistura serão:

$$\mu_i^{id}(T, P, n, \mu_s) = \mu_i^{id}(T, P, n, n^0) = \mu_i(T, P) + RT \ln x_i \quad (15)$$

em que $\mu_i(T, P)$ refere-se ao potencial químico de referência para espécies puras i , temperatura T , pressão P e x_i trata-se da fração molar do componente i . Considerando um sistema de duas células, α e β , isotérmico dividido por uma membrana semi-permeável, na célula α existe o soluto 1 e alguns solventes, na célula β há além dos componentes presentes na outra célula um ou mais solutos diferentes. A diferença de pressão osmótica na membrana é:

$$\Pi = P^\beta - P^\alpha \quad (16)$$

E a condição de equilíbrio para o soluto 1 na equação para o cálculo de pressão osmótica será:

$$\mu_1^\alpha(T, P^\alpha, n_1, \mu_s) = \mu_1^\beta(T, P^\beta, n, \mu_s) + \Pi \bar{V}_1 \quad (17)$$

Sendo $\bar{V}_1$ o volume parcial do soluto 1. Os potenciais químicos dos solventes são variáveis independentes. Introduzindo o potencial químico ideal e em excesso:

$$\Pi \bar{V}_1 = \mu_1^{EX,\alpha} - \mu_1^{EX,\beta} + RT \ln \left(\frac{x_1^\alpha}{x_1^\beta} \right) \quad (18)$$

Como a solução é diluída em relação aos solutos $i > 1$, pode-se aplicar expansão de Taylor do potencial químico $\mu_1^{EX,\beta}$, aplicando o teorema de Euler e realizando a simplificação de que o volume parcial molar do soluto é igual ao volume molar do soluto, quando $\bar{V}_b c_b \approx 1$, pode-se concluir que:

$$\Pi = c_p RT \ln \left(\frac{x_1^\alpha}{x_1^\beta} \right) - \frac{V}{2} \sum_{j=2}^m c_j \sum_{i=2}^m c_k \left(\frac{\partial \mu_j^{EX}}{\partial n_k} \right)_{T,P,\mu_s}^\infty - \frac{V^2}{3} \sum_{i=2}^m c_i \sum_{j=2}^m c_j \sum_{k=2}^m c_k \left(\frac{\partial^2 \mu_j^{EX}}{\partial n_j \partial n_k} \right)_{T,P,\mu_s}^\infty + \dots \quad (19)$$

em que o subscrito ∞ indica que a derivada deve ser estimada em concentrações de zero soluto, ou seja, no estado $(T, P^\alpha, n_i, \mu_s)$. Sendo o segundo coeficiente virial de Gibbs-McMillan-Mayer (GM):

$$B_2^{GM} = \frac{V}{2RT} \left(\frac{\partial \mu_p^{EX}(T, V, n, \mu_s)}{\partial n_p} \right)_{T,V,\mu_s}^\infty \quad (20)$$

Também relacionado à teoria de McMillan-Mayer, Curtis *et al.* (2001) apresentaram a mesma para uma solução proteica contendo sal como co-solvente. Sumarizemos os resultados desses autores. Sabe-se que as propriedades termodinâmicas dentro da solução são determinadas por uma função gerada que é energia cujas variáveis independentes são T , μ_1 , μ_3 , e c_2 , a energia livre de McMillan-Mayer, F , é dada pela equação:

$$F = A + p_0 V - \mu_w N_w - \mu_{sal} N_{sal} \quad (21)$$

em que A é a energia livre de Helmholtz, V é o volume da solução, N o número de moles do componente, μ_{sal} é o potencial químico do sal e nos demais potenciais, o subscrito w refere-se à água, p da proteína. A mesma equação pode ser relacionada com a pressão osmótica, Π , e o potencial químico da proteína como:

$$F = -\Pi V + \mu_p N_p \quad (22)$$

Todas as propriedades termodinâmicas são derivadas de um diferencial de F , obtido do diferencial total da equação 22:

$$dF = -\Pi dV + V dP - S dT - N_w d\mu_w + N_p d\mu_p - N_{sal} d\mu_{sal} \quad (23)$$

sendo S a entropia. A equação 23 possui seis variáveis independentes, entretanto, somente cinco são necessárias para especificar o estado de uma única fase com três componentes. A variável extra é resultado da transformada de Legendre da equação 21 com respeito à PV . Essa transformada é introduzida para obter variáveis conjugadas para F , logo, PV pode ser eliminado da equação 23 utilizando a relação de Gibbs-Duhem para fora da solução:

$$V_o dP = S_o dT + N_{w,o} d\mu_w + N_{p,o} d\mu_p \quad (24)$$

Sendo o subscrito o (“outside”) relacionado à solução externa, para distinguir das propriedades da solução o subscrito i (“inside”). Substituindo a equação 24 na equação 23 e relacionando com a energia livre de McMillan-Mayer extensiva com a forma intensiva, F/V , tem-se:

$$d\left(\frac{F}{V}\right) = \mu_p dc_p - (c_{w,i} - c_{w,o})d\mu_w - (c_{sal,i} - c_{sal,o})d\mu_{sal} - (s_i - s_o)dT \quad (25)$$

Em que c é concentração molar e s refere-se a entropia por unidade de volume. A partir de um modelo para energia livre de McMillan-Mayer todas as outras propriedades termodinâmicas de interesse podem ser obtidas a partir da manipulação das equações 22 e 25.

Para o diferencial parcial do potencial químico de uma proteína:

$$\mu_p = \left(\frac{\partial F/V}{\partial c_p} \right)_{T, \mu_w, \mu_{sal}} \quad (26)$$

A pressão osmótica é calculada a partir das equações 22 e 26 :

$$\Pi = -\frac{F}{V} + \mu_p c_p \quad (27)$$

Também no trabalho de Curtis *et al.* (2001) para calcular a interação proteína-proteína utilizou-se o seguinte potencial de força média, baseado em um modelo de esferas rígidas:

$$W_{22}(r) = \begin{cases} \infty & r \leq \sigma \\ -\epsilon \left(\frac{r}{\sigma} \right)^{-n} & r \geq \sigma \end{cases} \quad (28)$$

Sendo σ o diâmetro da proteína, r a distância de centro a centro, n uma constante chamada expoente do potencial da força e ϵ é força de interação da força de interação em contato. A aproximação da fase aleatória é usada para calcular as propriedades termodinâmicas do potencial da força. O termo de energia livre de McMillan-Mayer é dado por:

$$\frac{F}{V} = c_p \mu_p^\theta + c_p RT [\ln c_p - 1] + RT \frac{4\eta - 3\eta^2}{(1-\eta)^2} + \frac{1}{2} N_{AV}^2 c_p^2 \int_{\sigma}^{\infty} 4\pi R W_{22}(r) dr \quad (29)$$

em que η é a fração de empacotamento de esferas rígidas, N_{AV} é o número de Avogadro, R a constante dos gases, μ_p^θ refere-se à proteína em estado de diluição infinita, $W_{22}(r)$ refere-se à contribuição da lei de força atrativa; os primeiros dois termos da equação 29 são referentes à contribuição ideal. O termo de esferas rígidas é calculado pelo termo da equação de estado de Carnahan-Starling, representado pelo terceiro termo da equação 29, já o último termo relaciona a contribuição do termo de potencial atrativo. A pressão osmótica é obtida a partir do potencial químico da proteína na equação 27:

$$\frac{\Pi}{c_p RT} = \frac{1 + \eta + \eta^2 - \eta^3}{(1-\eta)^3} - 2\pi c_p N_{AV} \frac{\sigma^3}{n-2} \frac{\epsilon}{k_B T} \quad (30)$$

Lima *et al.* (2007b), apresentam um modelo utilizando o método de volumes finitos para a equação de Poisson-Boltzman em coordenadas bi-esféricas no cálculo do potencial de força média. No referido trabalho, as cargas na molécula proteica foram consideradas espalhadas na superfície, embora essa aproximação seja melhor quando houver grandes separações entre as moléculas de proteína-íon. Esse método permite a investigação da força de interação proteína-proteína e o segundo coeficiente osmótico virial em diferentes valores de pH e soluções contendo diferentes sais. Não foram

includos os potenciais especficos do ion. A equao de Poisson-Boltzman nessas condies :

$$\nabla^2 \psi = \frac{1}{2} [\exp(\psi - U_-) - \exp(-\psi - U_+)] \quad (31)$$

Em que ∇^2 o operador laplaciano expresso em coordenadas bi-esfricas como:

$$\nabla^2 \psi = \frac{(\cosh \eta - \cos \theta)^3}{\beta^2 \sin \theta} \left[\frac{\partial}{\partial \theta} \left(\frac{\sin \theta}{\cosh \eta - \cos \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right) + \sin(\theta) \frac{\partial}{\partial \eta} \left(\frac{1}{\cosh \eta - \cos \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right) \right] \quad (32)$$

em que $\psi = \phi e z_{ion} / (k_B T)$ o potencial eletrosttico em forma adimensional, e a carga eltrica, z_{ion} a carga do ion i , k_B a constante de Boltzman e T a temperatura absoluta. U_+ e U_- so a disperso das interaes de Van der Waals entre um ction e protena (+) e entre o nion e protena (-), respectivamente. As coordenadas bi-esfricas (η, θ) so relacionadas com as coordenadas cartesianas (x, z) :

$$x = \frac{\kappa \sigma \sin(\eta_0) \sin \theta}{2(\cosh \eta - \cos \theta)} \quad (33)$$

$$z = \frac{\kappa \sigma \sin(\eta_0) \sin \eta}{2(\cosh \eta - \cos \theta)} \quad (34)$$

sendo, $-\eta_0$ e η_0 valores de η , frao de empacotamento, em cada superfcie esfrica, obtidos a partir da equao, $\cos(\eta_0) = 1 + h/\sigma$, em que h a distncia mais prximas entre as molculas de protena, κ o inverso do comprimento de Debye, σ o dimetro da protena, $0 \leq \theta \leq \pi$ e $-\infty \leq \eta \leq \infty$. A integrao feita de η_0 a η e de $\theta = 0$ a $\theta = \pi$.

O potencial interinico escrito por:

$$U_{\pm} = \frac{-\beta_{\pm 1}}{\kappa^3 (r_1 - \sigma_1/2)^3 [1 + (2r_1 - \sigma_1)^3 / (2\sigma_1)^3]} + \frac{-\beta_{\pm 2}}{\kappa^3 (r_2 - \sigma_2/2)^3 [1 + (2r_2 - \sigma_2)^3 / (2\sigma_2)^3]} \quad (35)$$

em que β_{+1}, β_{+2} so os coeficientes de disperso ction-macroion para os macroions 1 e 2 respectivamente e β_{-1}, β_{-2} so coeficientes de disperso nion-macroion para os macroions 1 e 2 respectivamente. Para protenas iguais estes coeficientes so os mesmos, e podem ser calculados utilizando a polarizabilidade inica de excesso e as

propriedades dielétricas da água e da proteína. Como as proteínas diferentes possuem composições químicas similares, esses coeficientes de dispersão iônica devem ser semelhantes para diferentes proteínas. Também na equação anterior os subscritos 1 e 2 referem-se aos casos em que haja duas proteínas diferentes, mas no caso deste trabalho elas são iguais.

A equação de Poisson-Boltzman é resolvida utilizando o método de volume finito descrito em Lima et al. (2007a). Uma vez que o potencial eletrostático adimensional é calculado usando a equação 31, utiliza-se a expressão de força adimensional:

$$f(\eta) = 2\pi \int_0^\pi \left[\frac{a^2 (\cosh(\psi) - 1)}{(\cosh(\eta) - \cos(\theta))^2} + \frac{1}{2} \left(\left(\frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right)^2 - \left(\frac{\partial \psi}{\partial \eta} \right)^2 \right) \right] \times [1 + \cosh(\eta) \cos(\theta) + \frac{\sin(\theta) d\theta}{\cosh(\eta) - \cos(\theta)}] \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \frac{\partial \psi}{\partial \eta} \sinh(\eta) \sin(\theta) \quad (36)$$

em que $a = k\sigma \sinh(\eta_0)/2$ e f é a força adimensional eletrostática avaliada na superfície $\eta = 0$. Para obter a força em forma dimensional F utiliza-se a seguinte expressão:

$$F = \varepsilon \varepsilon_0 \left(\frac{\kappa_B T}{e} \right)^2 f \quad (37)$$

em que ε a constante dielétrica dependente da força iônica e ε_0 a permissividade no vácuo. A força média obtida a partir das equações 36 e 37 é específica, pois o potencial eletrostático é gerado pela resolução da equação 31, cuja equação contém as interações de dispersão proteína-íon, contribuição que é pequena em baixas concentrações de sal ou de soluções contendo íons com polarizabilidade baixa. A integral da equação 46 foi calculada utilizando o método de Simpson e as derivadas foram calculadas usando diferenciais finitos. Partindo as força média obtém-se o potencial de força média de Poisson-Boltzman, W_{PB} , calculado por:

$$\frac{W_{PB}}{\kappa_B T} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 \kappa_B T \sigma}{e^2} \int_{\infty}^{R/\sigma} f \cdot d\left(\frac{R}{\sigma}\right) \quad (38)$$

O potencial total de força média $W_{22}(r)$ é:

$$W_{22}(r) = W_{PB} + W_{Ham} + W_{hs} \quad (39)$$

Sendo W_{hs} , a contribuição do termo de esferas rígidas e W_{Ham} interação de dispersão de Hamaker, isto é, o potencial direto entre duas moléculas de proteína devido a interação não-eletrostática:

$$W_{Ham} = \begin{cases} -\frac{H}{12} \left(\frac{\sigma^2}{(\sigma + 2\kappa)^2 - \sigma^2} + \frac{\sigma^2}{(\sigma + 2\kappa)^2} + 2 \ln \left(1 - \frac{\sigma^2}{(\sigma + 2\kappa)^2} \right) \right) & r \leq \sigma + 2\kappa \\ -\frac{H}{12} \left(\frac{\sigma^2}{R^2 - \sigma^2} + \frac{\sigma^2}{R^2} + 2 \ln \frac{R^2 - \sigma}{R^2} \right) & r > \sigma + 2\kappa \end{cases} \quad (40)$$

em que k é a espessura da camada de hidratação, r a distância de centro a centro entre duas moléculas de proteína e H a constante de Hamaker.

Como citado anteriormente, sabe-se que as interações entre as moléculas de proteína podem ser obtidas através da Teoria da Solução de McMillan-Mayer. A equação virial osmótica é definida como:

$$\Pi = RT \left(\frac{c_p}{M_p} + B_2 c_p^2 + B_3 c_p^3 + \dots \right) \quad (4)$$

Segundo Lu et al. (2009), para moléculas esféricas, o segundo coeficiente virial é definido pelo potencial de força média $W_{22}(r)$:

$$B_2 = -\frac{2\pi N_{AV}}{M_b^2} \int_{\sigma}^{\infty} [e^{-W_{22}(r)/\kappa_B T} - 1] r^2 dr \quad (5)$$

sendo o potencial global de força média, $W_{22}(r)$, entre moléculas de proteína é dado pela soma dos quatro potenciais de força média:

$$W_{22}(r) = W_{hs}(r) + W_{elec}(r) + W_{disp}(r) + W_{osmotic}(r) \quad (41)$$

O potencial de esferas rígidas, $W_{hs}(r)$, é dado por:

$$W_{hs}(r) = \begin{cases} \infty & \text{para } r \leq \sigma \\ 0 & \text{para } r > \sigma \end{cases} \quad (42)$$

em que σ é o diâmetro da molécula de proteína. O potencial de repulsão eletrostática, $W_{elec}(r)$ é representado por:

$$W_{elec}(r) = \frac{z_p^2 e^2 \exp[-\kappa(r - \sigma)]}{4\pi\epsilon_0 r (1 + \kappa\sigma/2)^2} \quad (43)$$

em que z_p é valência da proteína, e a unidade de carga elementar, ϵ_0 a permissividade do vácuo e ϵ a constante dielétrica dependente da força iônica, e κ é o parâmetro de Debye.

$$\kappa^2 = \frac{2e^2 N_{AV} I}{\epsilon_0 \epsilon \kappa_B T} \quad (44)$$

em que I refere-se à força iônica. O potencial de dispersão atrativo, $W_{disp}(r)$:

$$W_{disp}(r) = -\frac{H}{12} \left(\frac{\sigma^2}{r^2 - \sigma^2} + \frac{\sigma^2}{r^2} + 2 \ln \frac{r^2 - \sigma}{r^2} \right) \quad \text{para } r > \sigma \quad (45)$$

O potencial do volume excluído, $W_{osmotic}(r)$, é dado por:

$$W_{osmotic}(r) = \begin{cases} \infty & r < \sigma \\ -\frac{4\pi}{3} \sigma_{ps} \Pi \left(1 - \frac{3r}{4\sigma_{ps}} + \frac{r^3}{16\sigma_{ps}^3} \right) & \sigma < r < 2\sigma_{ps} \\ 0 & r \geq 2\sigma_{ps} \end{cases} \quad (46)$$

em que σ_{ps} é :

$$\sigma_{ps} = (\sigma + \sigma_{ion}) / 2 \quad (47)$$

a média ponderada pela composição no diâmetro do íon:

$$\sigma_{ion} = (v_{cátion} \sigma_{cátion} + v_{ânion} \sigma_{ânion}) / 2 \quad (48)$$

sendo $v_{cátion}$ e $v_{ânion}$ os coeficientes estequiométricos do cátion e do ânion, respectivamente.

Park e Choi (2009) apresentam um modelo semelhante ao de Lu et al. (2009) algumas diferenças no cálculo do potencial total:

$$W = W_{hs}(r) + W_{elec}(r) + W_{disp}(r) + W_{esp}(r) \quad (49)$$

Os potenciais de esferas rígidas, W_{hs} , de repulsão eletrostática, W_{elec} , possuem as mesmas equações 42 e 43 respectivamente. O potencial de dispersão atrativo é descrito por:

$$W_{disp}(r) = \begin{cases} -\frac{H}{12} \left[\frac{\sigma^2}{(\sigma + 2\kappa)^2 - \sigma^2} + \frac{\sigma^2}{(\sigma + 2\kappa)^2} + 2 \ln \left(1 - \frac{\sigma^2}{(\sigma + 2\kappa)^2} \right) \right] & r \leq \sigma + 2\kappa \\ -\frac{H}{12} \left[\frac{\sigma^2}{r^2 - \sigma^2} + \frac{\sigma^2}{r^2} + 2 \ln \left(1 - \frac{\sigma^2}{r^2} \right) \right] & r > \sigma + 2\kappa \end{cases} \quad (50)$$

O potencial de poço quadrado é dado por:

$$W_{spec}(r) = \begin{cases} -\epsilon_{spec} & \sigma \leq r \leq \sigma + \delta \\ 0 & r > \sigma + \delta \end{cases} \quad (51)$$

sendo ϵ_{spec} a profundidade e δ a largura. Valores positivos de profundidade correspondem a um potencial atrativo e valores negativos, a um potencial repulsivo.

Moon et al. (2000a) também usaram uma equação virial para a pressão osmótica, mas introduziram outras considerações. No caso de soluções diluídas, as proteínas são fortemente hidratadas e a distância entre as moléculas de proteína inclui uma ou duas camadas de moléculas de água, de modo que uma boa descrição para a interação proteína-proteína é dada pela teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek, Verwey e Overbeek (1948).

Nesse caso, as proteínas são modeladas como esferas rígidas com carga de superfície uniforme imersas em um meio contínuo dielétrico contendo cargas pontuais que representam os íons de sal dessa teoria, e o potencial total de força médio:

$$W_{22}(r) = W_{hs}(r) + W_{elec}(r) + W_{disp}(r) \quad (52)$$

Estes autores observam que para estudos de pressão osmótica em soluções proteicas contendo sal como co-solvente, os íons de sal e proteína competem pela hidratação da mesma molécula de água. Se os íons de sal interagem fortemente com as moléculas de água, a superfície da proteína é desidratada e as forças de curto alcance entre moléculas de proteína passam a ser muito significantes. A capacidade de uma molécula de sal interagir com uma de água está relacionada à sua posição de série liotrópica ou de Hofmeister. Os sais com alta posição na série liotrópica

(cosmotrópicos) interagem fortemente com a água, pois os mesmos tendem a se desidratar as superfícies de proteínas e retirar os sais nela existente, logo em soluções salinas concentradas contendo proteína as interações entre moléculas de proteína são mais fortes devido a uma redução na distância e reforço das interações de curto alcance hidrofóbicas. Para soluções proteicas mais concentradas a equação osmótica do viral truncada não é aplicável devido às interações significativas de ordem superior. Nesse caso é preferível o uso da teoria da mecânica estatística com base no potencial de força médio de dois corpos, em vez de ajuste dos dados a uma ordem polinomial superior para determinar os coeficientes virial. Além disso, a contribuição dominante para o potencial de força média em soluções salinas concentradas são forças de solvatação, que não são levadas em consideração pela teoria do DLVO. No entanto, expressões pra essas forças de solvatação não existem devido à natureza da força. Para resolver esse impasse, é somado ao potencial de força média um termo repulsivo de esferas rígidas e um termo atrativo de curto alcance na forma potencial de esfera rígida adesiva de Baxter (AHS). A vantagem deste potencial é que apenas um parâmetro é necessário para descrever o decaimento característico da distância e a magnitude da interação atrativa. O potencial adesivo é dado por, Baxter (1968):

$$\frac{1}{\kappa_B T} W_{22}(r) = \begin{cases} +\infty & 0 < r < \sigma \\ \ln \frac{12\tau(a-\sigma)}{a} & \sigma < r < a \\ 0 & a < r \end{cases} \quad (53)$$

sendo τ^{-1} é um parâmetro reduzido que caracteriza a força de atração, σ é o diâmetro da proteína, a é o intervalo de interação proteica, κ_B a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta. O potencial tem como limite $a \rightarrow \sigma$ com τ e σ com valores fixos. τ^{-1} refere-se à razão entre aa força de interação atrativa e a energia térmica. Substituindo na equação do segundo coeficiente osmótico tem-se:

$$B_2 = \frac{N_{AV}}{3M_p^2} \pi \sigma^3 \left(1 - \frac{2}{3\tau} \right) \quad (54)$$

De acordo com Barboy (1974) Para uma solução contendo uma única proteína, a equação de compressibilidade da pressão osmótica é:

$$\frac{\Pi}{\kappa_B T \rho_p} = \frac{1 + \eta + \eta^2}{(1 - \eta^3)} - \eta \lambda \frac{18(2 + \eta) - \eta \lambda^2}{36(1 - \eta)^3} \quad (55)$$

Em que ρ_b refere-se a densidade da proteína e η é a fração de empacotamento da pela equação:

$$\eta = \pi \sigma^3 \frac{\rho_p}{6} \quad (56)$$

e o parâmetro λ é um número adimensional que é uma função da fração de empacotamento e do parâmetro de energia λ :

$$\lambda = 6 - \tau - \tau \eta^{-1} - [(6 - \tau + \tau \eta^{-1})^2 - 6(1 + 2\eta^{-1})]^{1/2} \quad (57)$$

O primeiro termo do lado direito da equação refere-se à compressibilidade de esferas rígidas e o segundo termo se deve à adesão, que desaparece quando τ tende ao infinito.

Em Wu et al.(1999) foram utilizadas duas equações de estado de Van der Waals de Vilker *et al.*, (1980), ambas contendo o termo de Carnahan e Starling (1969) para interações repulsivas de curto alcance. No primeiro modelo, o potencial de DVLO é considerado através de uma parte da perturbação do segundo coeficiente do viral, B_2 , O fator de compressibilidade osmótico Z é dado por:

$$Z = \frac{\Pi}{\rho_p kT} = \left\{ \left[\left(\frac{z_p \rho_p}{2} \right)^2 + \rho_s^2 \right]^{1/2} - \rho_s \right\} + \frac{1 + \eta + \eta^2 + \eta^3}{(1 - \eta)^3} + B_2 \rho_p \quad (58)$$

O primeiro termo da equação 68 é o efeito Donnan ideal para uma solução de eletrólito 1:1. O parâmetro δ corresponde à distância mínima entre duas superfícies de proteínas. A parte de perturbação do segundo coeficiente virial é:

$$B_{2,pert} = 2\pi \int_{\sigma+\delta}^{\infty} \left\{ 1 + \exp \left[-\frac{W_{DLVO}(r)}{kT} \right] \right\} r^2 dr \quad (59)$$

Quando se aplica a teoria de McMillan-Mayer para calcular a pressão osmótica de soluções de proteínas ou outras soluções com solutos que possuem carga, deve-se considerar que há diferença de solventes. Nesse caso o termo acrescentado de efeito

Donnan prevê uma correção de primeira ordem simples. Outro modelo também abordado pelos autores para cálculo de pressão osmótica em soluções proteicas foi a consideração explícita da interação entre proteína e íons pequeno de Amos et al., (1998); à equação 68 agregou-se o termo de aproximação de fase randômica (RPA) de Vlachy *et al.*, (1993), tem-se:

$$Z = \frac{\Pi}{\rho_p kT} = \left\{ \left[\left(\frac{z_p \rho_p}{2} \right)^2 + \rho_s^2 \right]^{1/2} - \rho_s \right\} + \frac{1 + \eta + \eta^2 + \eta^3}{(1 - \eta)^3} + \rho_p \frac{U_1}{2kT} \quad (60)$$

em que o parâmetro U_1 é análogo à constante a na equação de estado de van der Waals com dimensão energia x volume.

$$U_1 = 4\pi \int_{\sigma+\delta}^{\infty} [W_{dis}(r) + W_{dl}(r)] r^2 dr \quad (61)$$

sendo o $W_{dis}(r)$ o parâmetro referente ao potencial de dispersão atrativa e $W_{dl}(r)$ interação de dupla camada.

Como conclusão da revisão bibliográfica, observa-se que existem modelos bastante completos para a descrição do comportamento de proteínas em solução. Entretanto, deve-se notar que são raros os conjuntos de dados experimentais de pressão osmótica de proteínas em soluções salinas, e inexistentes os estudos de pressão osmótica em soluções poliméricas. Ademais, não existem estudos sobre a manutenção da estrutura secundária e terciária em soluções desses solventes nas mesmas condições estudadas, o que significa admitir que a principal hipótese por trás desses modelos – a manutenção da integridade estrutural ao longo de um diagrama de fases – simplesmente nunca foi observada.

3.3. Fluorescência

Neste trabalho serão realizados estudos de fluorescência para verificar a integridade estrutural de proteínas em solução. De acordo com Chang (1977), a palavra fotoluminescência significa o emprego de fótons para excitar a emissão de luz. Se a excitação de uma molécula pela luz não provoca uma reação química ou uma

transferência de energia por colisão, então a molécula poderá eventualmente regressar ao estado fundamental por perda de energia, isto é, este processo se apresenta como uma emissão luminescente. Existem dois caminhos principais para que a molécula excitada alcance o estado fundamental, e deles se originam os fenômenos fluorescência e fosforescência. Com o objetivo de estudar o efeito na estrutura da molécula de proteína diante adição de polímeros e sais abordou-se a técnica de fluorescência.

O fenômeno de fluorescência é caracterizado por dois fenômenos: a absorção de luz que promove a excitação eletrônica e a emissão de radiação quando o elétron excitado regressa ao seu estado de base. Dado que algo da energia absorvida inicialmente se perde em forma não radiante em transições vibracionais (conversão interna), a luz emitida sempre apresenta uma longitude de onda superior ao da luz absorvida. A eficiência da emissão é dada pelo rendimento quântico e trata-se do quociente dos fótons emitidos pelos absorvidos. Muitas moléculas biológicas apresentam fluorescência, tais como o dinucleótido de nicotilamida reduzido (NADH), os mononucleótidos ou dinucleótido de flavina oxidados (FAD e FMN) e as proteínas. Nesse último caso a fluorescência intrínseca que as proteínas apresentam se origina de seus aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, sendo esse último particularmente o mais importante por apresentar o maior rendimento quântico. A fluorescência devido à presença de triptofanos é muito sensível à polaridade do seu entorno e deslocamentos no espectro de emissão para menores longitudes de ondas (deslocamento ao azul) são interpretados como reflexo de incremento na hidrofobicidade de seu entorno, Dekker (1971). Em termos de emissão de fluorescência, bem como de localização na molécula de proteína, os resíduos de triptofano se classificam em acessíveis, ocultos e parcialmente ocultos. Sabe-se que essa diferença de posição na molécula interfere no pico emissivo de fluorescência, ou seja, os triptofanos acessíveis da proteína emitem longitude de onda entre 345-350nm, já os resíduos de triptofano ocultos emitem uma menor longitude de onda, 325-330nm. As mudanças nos espectros de emissão das proteínas podem refletir transições conformacionais proteicas, associação de subunidades, união de ligantes,

desnaturalização e todos esses fenômenos que podem afetar o entorno dos anéis indólicos dos triptofanos.

Dekker (1971) também cita que quando as moléculas são irradiadas com luz por frequências apropriadas, as mesmas podem sofrer uma absorção desde o estado eletrônico fundamental ao primeiro estado eletrônico excitado. Ainda que à temperatura ambiente a maioria das moléculas esteja em seu nível vibracional fundamental, depois da excitação elas podem terminar em qualquer dos níveis. Como todos esses estados excitados são instáveis as moléculas podem voltar diretamente ao estado eletrônico fundamental emitindo luz, portanto, se observando os espectros de fluorescência que é o processo contrário ao de absorção.

Conforme Chang (1977) define-se rendimento de fluorescência Φ como a razão entre os fótons emitidos por fluorescência ao número total de fótons absorvidos. A intensidade da radiação emitida, depois que a luz estimulante é interrompida em um tempo t , é dada por:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (62)$$

Sendo τ é o período de desestimulação média. Observa-se que quando $t = \tau$,

$$I(t) = \frac{I_0}{e} \quad (63)$$

em que I_0 é a intensidade de luz emitida em $t = 0$. O tempo de desestimulação é dado em segundos pela equação 64:

$$\tau = \frac{1,5}{f\lambda^2} s \quad (64)$$

em que f é a força do oscilador para a absorção e λ é o comprimento de onda.

Se a fluorescência não é o único caminho para desestimulação, como ocorre normalmente, Φ é menor que uma unidade e diz-se que há inibição da fluorescência.

Existem vários estudos sobre fluorescência em proteínas e peptídeos. De acordo com Lakowicz (1983) esta ênfase é resultado da presença de fluoróforos naturais em quase todas as proteínas, como a tirosina e o triptofano. A fluorescência das proteínas é predominantemente resultado dos resíduos de triptofano, cujo núcleo é um fluoróforo

excepcionalmente sensível. O triptofano e seus derivados são altamente sensíveis à polaridade do solvente, e parece estar sujeito tanto a efeitos gerais e específicos de solventes. Como resultado, os espectros de emissão de resíduos de triptofano podem refletir a polaridade do seu ambiente circundante. Os espectros de emissão de proteínas são sensíveis à ligação dos substratos, às reações de associação e de desnaturação. Medidas de polarização de resíduos de triptofano refletem o tempo de correlação média desses resíduos, apesar das dificuldades experimentais representadas no seu complexo espectro de polarização. Portanto, medidas de polarização podem revelar os efeitos dos desnaturantes sobre a estrutura da proteína e as reações associação das proteínas com ligantes e também com outras macromoléculas. Finalmente, o triptofano parece ser singularmente sensível à extinção por uma variedade de substâncias tais como acrilamida, succinimida, hidrogênio, água oxigenada, dicloroacetamida, o cloridrato de piridínio, cisteína, hidrocarbonetos clorados, NO_3^- , IO_3^- , Cs^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , e Mn^{2+} . Esta sensibilidade a uma variedade de supressores parece ser resultado de uma propensão do núcleo estimulado a doar elétrons, enquanto no estado excitado. A sensibilidade de supressores permite a determinação da acessibilidade dos resíduos de triptofano em proteínas por meio de medidas de extinção.

A análise detalhada de fluorescência da proteína pode tornar-se complexa pelos vários fatores que afetam a fluorescência. Além disso, deve-se contar com a presença de vários resíduos de triptofano na maioria das diferentes proteínas: uma vez que o ambiente de cada um é distinto, as propriedades espectrais de cada resíduo de triptofano são geralmente diferentes. É importante ressaltar a ausência na literatura e estudos de estabilidade de soluções proteicas por fluorescência que deem alguma indicação de manutenção da atividade nesses meios.

3.4. Dicroísmo circular

O dicroísmo circular corresponde a uma forma de espectroscopia que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou no sentido anti-horário. Este fenômeno é rotineiramente utilizado no estudo da estrutura secundária de proteínas, Chang (1977) . Esse estudo visa também o entendimento do efeito do acréscimo de co-solventes na estrutura da molécula de proteína, por isso, aplicou-se o método de dicroísmo circular no presente trabalho.

Conforme Corrêa e Ramos (2008), a luz linearmente polarizada é composta de duas componentes circularmente polarizadas de mesma intensidade. Em cada uma dessas componentes, o vetor eletromagnético gira na direção de propagação. Observando-se o perpendicularmente a variação no vetor elétrico com o tempo, percebe-se que a ponta deste vetor segue uma hélice, girando no sentido horário para a luz polarizada circularmente para a direita e anti-horário para a esquerda. A absorção de luz não polarizada é descrita pela absorbância, A , definida como:

$$A = \log(I_0/I) \quad (65)$$

em que I_0 é a intensidade da luz incidente e I a intensidade após a luz percorrer uma distancia L no meio. Segundo a lei de Beer-Lambert, Shellman (1975), temos a seguinte relação:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot L \quad (66)$$

em que c é a concentração molar da espécie que absorve a luz e ε é o coeficiente de extinção molar. Da mesma forma podemos definir um coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda, respectivamente, ε_R e ε_L . O dicroísmo circular molar, $\Delta\varepsilon$:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{(A_L - A_R)}{cL} \quad (67)$$

é definido como a diferença entre os coeficientes de extinção entre os dois tipos de luz polarizada (o coeficiente de extinção molar para a luz não-polarizada é simplesmente a média aritmética entre ε_l e ε_r . Todos os instrumentos comerciais de dicroísmo circular

(CD) medem $\Delta A = A_L - A_R$. Por razões históricas, entretanto, os aparelhos de CD são calibrados para elipticidade, θ :

$$\theta = 32,98\Delta A \quad (68)$$

em que θ é dado em graus. Para eliminar os efeitos do caminho óptico e da concentração define-se a elipticidade molar, θ_m :

$$\theta_m = \frac{100\theta}{Lc} = 3298\Delta\epsilon \quad (69)$$

A elipticidade molar é dada em graus.cm²/dmol.

O dicroísmo circular é usado principalmente para o estudo da estrutura secundária das proteínas, embora possa também ser utilizada nos estudos sobre a conformação de peptídeos e ácidos nucleicos (Johnson, 1985; Woody, 1995; Woody, 1996). Esta técnica é amplamente utilizada porque requer amostras de baixa concentração (1-10 mg.ml⁻¹), permite o estudo de uma ampla série de variáveis como temperatura, pH, etc., e também fornece informações sobre o efeito dos ligantes adicionados. Para proteínas os resultados são geralmente expressos como elipticidade molar residual média:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M_p}{c \times L \times n_r} \quad (70)$$

em que $[\theta]$ é a elipticidade em graus, L é o caminho óptico em cm, c é a concentração em mg.mL⁻¹, M_p é a massa molecular da proteína e n_r é o número de resíduos na proteína. A elipticidade molar residual média, $[\theta]$, é dada em deg.cm².dmol⁻¹. Essa padronização permite a comparação independente dos resultados obtidos em condições distintas.

Uma das principais aplicações do dicroísmo circular para o estudo de soluções proteicas é a estimativa da estrutura secundária de proteínas, especificamente a fração de resíduos na estrutura que estão envolvidos em formação de hélices α , folhas β e formação desordenada. Também oferece informações adicionais importantes sobre o efeito da temperatura (Balan *et al.*, 2006), pH (Ramos, 2004), carga (Regis *et al.*, 2005), etc. Muitos métodos foram desenvolvidos para prever a estrutura secundária de uma

proteína a partir de seu espectro de dicroísmo circular, com base em sua sequência primária, por meio de estatística e informações físico-químicas, Kelly *et al.* (2005).

Novamente vale ressaltar que, assim como na fluorescência, não existem estudos de estabilidade de proteínas por dicroísmo circular que indiquem a conservação da atividade nesses meios.

3.5. Proteínas

A escolha das proteínas para o presente trabalho têm também razões práticas. A utilização de diferentes proteínas tem a finalidade de permitir o discernimento da influência de parâmetros, visto que propriedades físicas, químicas e funcionais fornecem bases para as variações no segundo coeficiente virial das mesmas, como:

- Tamanho – sabe-se que o massa molecular das proteínas varia em uma faixa bastante elevada. Por exemplo, a insulina possui peso molecular 5700 Da, já a IgG tem peso molecular por volta de 150000 Da.
- Forma – A forma das proteínas varia, desde linear (proteínas fibrosas) até a forma aproximadamente esférica (proteínas globulares). Essa propriedade é altamente influenciada pelos aspectos físicos e químicos do ambiente em que se encontra, tal como o pH.
- Carga – Visto que todas as proteínas contêm grupos terminais amina e ácido carboxílico, além de muitas cadeias laterais carregadas, as soluções proteicas possuem comportamento ácido-base. A carga líquida média das proteínas depende do pH em que se encontram, sendo que, no ponto isoelétrico, essa carga líquida média é nula.
- Hidrofobicidade – O número, tipo e distribuição dos resíduos não polares de aminoácidos determinam o caráter hidrofóbico da proteína.
- Solubilidade – Cada proteína possui essa característica distinta bem como a presença de alterações no meio (tipo de solvente, força iônica, temperatura, etc) podem alterá-la.

Perante esses diferentes aspectos a serem considerados, as proteínas a serem abordadas neste trabalho foram: albumina de soro bovino. Imunoglobulina G humana, ovalbumina, beta-lactoglobulina e lisosima.

3.5.1 Albumina sérica bovina

A albumina de soro bovino (BSA) é uma das proteínas mais amplamente estudadas, e, também, uma das proteínas mais abundantes no plasma, com concentração típica de 5g/100mL. São inúmeros os estudos sobre sua estrutura e as propriedades dessa proteína assim como suas interações com outras proteínas. A palavra albumina é usada para descrever a proteína ou grupo de proteínas, sendo definida pela sua característica de solubilidade em água. A albumina é a proteína mais abundante do sistema circulatório e contribui com 80% da pressão sanguínea osmótica coloidal, é sabido também, que a albumina do soro, é, sobretudo, responsável pela manutenção da pressão sanguínea, Michnik *et al.*, (2005).

A BSA possui peso molecular de 66400 Da sendo que a sua estrutura primária é a de uma cadeia única de polipeptídeo que consiste em aproximadamente 583 resíduos de aminoácidos, sendo 2 triptofanos. A BSA possui propriedades importantes como o ponto isoelétrico 4,9 em água a 25°C e que sua estrutura secundária possui aproximadamente 50% de hélice alfa e 15% folhas beta, Friedli (1996).

3.5.2 Imunoglobulina G humana

No que diz respeito à relevância da imunoglobulina G humana (IgG), suas prescrições terapêuticas são indicadas nos seguintes casos, Kempf *et al.* (2007):

- imunodeficiências congênitas ou adquiridas, onde o paciente pode apresentar deficiência global ou de algumas subclasses de IgG;
- tratamento de deficiência seletivas de anticorpos, como no caso de inflamações crônicas, no qual a produção de anticorpos é insuficiente para combater a doença;

- tratamento de doenças auto-imunes, como por exemplo a Púrpura trombocitopênica idiopática.
- tratamento de alguns tipos de câncer (ex. leucemia linfocítica crônica).

A imunoglobulina G (IgG) apresenta uma meia-vida relativamente longa (23 dias), é a única classe de imunoglobulina que pode atravessar a placenta em humanos, sendo responsável pela proteção do recém-nascido durante o primeiro mês de vida. Esta classe de imunoglobulinas contribui para a imunidade contra muitos agentes infecciosos que têm uma disseminação através do sangue, incluindo bactérias, vírus, parasitas e alguns fungos.

A estrutura básica da molécula de IgG é constituída de 1328 resíduos de aminoácidos, sendo 9 triptofanos. Cada cadeia pesada contém 450 resíduos de aminoácidos e cada cadeia leve contém 214. Em que sua estrutura secundária se caracteriza por aproximadamente 5% destes resíduos se encontram em forma hélice alfa e 45% folhas beta. A molécula é flexível em forma de Y com massa molar de aproximadamente 150000 Da, Todorova-Balvay *et al.* (2004).

3.5.3. Ovalbumina

A ovalbumina ou albumina do ovo de galinha é uma albumina pertencente à classe das albuminas solúveis, proveniente da coagulação de proteínas. A separação da ovalbumina, assim como das albuminas séricas, ou outras proteínas sangüíneas, é realizada por eletroforese ou precipitações fracionadas com vários sais (Bahr e Johnson, 1991).

A ovalbumina é a maior proteína constituinte da clara, participa com 54% da constituição de toda a porção branca do ovo. É considerada uma fosfoproteína (o grupo prostético é o ácidofosfórico) com 386 aminoácidos, sendo 6 triptofanos. Seu peso molecular é 45000 Da. O ponto isoelétrico 4,6 em água a 25°C e que sua estrutura secundária possui aproximadamente 20% de hélice alfa e 30% folhas beta.

3.5.4. Beta-lactoglobulina

A β -lactoglobulina pertence à família das lipocalinas, possui a forma de cálice, é de caráter hidrofóbico, de grande utilidade na indústria alimentícia, com grande capacidade de emulsificação, geleificação, formação de espuma e ligação de aroma e sabor, que são de extrema importância para o beneficiamento lácteo na indústria, Sgarbieri (2005). Essa família de proteína é responsável pelo transporte de moléculas e possui baixa identidade sequencial e alta similaridade estrutural.

Trata-se de uma proteína globular que representa 50% da proteína total do soro e 12% da proteína total do leite, Fox e McSweeney, (1998). É sintetizada na glândula mamária e é formada por 162 resíduos de aminoácidos, sendo dois triptofanos, Hambling *et al.* (1992). Apresenta-se na natureza na forma de dímeros e monômeros com peso molecular de aproximadamente 18400 Da e ponto isoelétrico igual a 5,3. A composição da sua estrutura secundária é 10% hélice alfa e 40% folhas beta.

3.5.5. Lisozima

A lisozima é uma enzima encontrada na clara de ovo, na lágrima e em outras secreções. O nome lisozima é devido ao poder de lisar, ou dissolver, a parede celular bacteriana e assim servir como agente bactericida. Esta característica antibacteriana determina a sua importância na proteção a muitos tipos de infecção, agindo como catalisador, ela promove a hidrólise da cadeia quebrando a ligação glicosídica e destruindo a integridade estrutural das paredes celulares dessas bactérias. Lehninger *et al.*, (1995). Trata-se da proteína mais usada em estudos de cristalização de macromoléculas (Pusey *et al.*, 2001).

A lisozima é uma proteína globular, compactamente enovelada e que tem a maioria de seus grupos de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos voltados para o interior da macromolécula, protegidos da água, e a maioria dos seus grupos hidrofílicos voltados para a superfície de contato com o exterior. A baixa hidrofobicidade da lisozima é refletida em seu índice médio de hidropatia ("Grand Average of

Hydropathicity” - GRAVY) fortemente negativo (-0,415), típico de uma proteína hidrofílica.

É uma enzima de massa molecular igual a 14.400 Da e ponto isoelétrico igual a 11,1. Formada por uma cadeia peptídica de 129 aminoácidos, dentre eles 6 triptofanos. (Qasba e Kumar, 1997). Sua estrutura secundária é composta por 30% dos seus resíduos de aminoácidos estão em segmentos na forma de hélice alfa e 20% em folhas beta.

Além disso, de modo geral, todas as proteínas escolhidas têm importância comercial elevada e são bastante solúveis em água. Como a cristalização é bastante dependente do pH das soluções-mãe, e existem relações entre a janela de cristalização (isto é, as condições necessárias à formação de cristais) e o segundo coeficiente virial (Tardieu et al., 2002), investigou-se também a dependência de seu segundo coeficiente virial com respeito a pH nesses meios.

3.5.6. Co-solventes

Entre os co-solventes eleitos destacam-se três sais: cloreto de sódio, sulfato de amônio e sulfato de sódio. Todos possuem ampla utilização na indústria de transformação biotecnológica e são utilizados para induzir a precipitação (etapa de concentração inicial) e a cristalização (purificação final) de proteínas – os sulfatos são mais utilizados para essa finalidade, e o cloreto de sódio é especialmente importante em processos de produção de agentes terapêuticos, Wang (1999). Além disso, esses sais são comumente utilizados para induzir a separação de duas fases aquosas, e o sulfato de amônio tem papel relevante em etapas de cromatografia de interação hidrofóbica, Tardieu, (2002).

Outro co-solvente escolhido foi o polietileno glicol, que é o polímero mais amplamente utilizado em processos de *downstream*. Ele também é amplamente utilizado para induzir a diminuição da solubilidade de proteínas, e em conjunto com sulfatos, citratos e fosfatos, e é empregado para induzir a separação de duas fases aquosas em processos de extração líquido-líquido, Zielenkiewicz *et al.*, (2006).

Também no caso dos polímeros, as opções tiveram o intuito de abranger diferentes tamanhos de cadeias poliméricas em diferentes valores de concentrações; inclusive testes foram realizados com cadeias poliméricas e concentrações maiores, porém foram inviabilizadas pelas limitações do equipamento.

Neste presente trabalho as escolhas experimentais foram tomadas com o objetivo de criar um banco de dados em que estivesse presente uma variedade de proteínas sendo que, houvesse presença de diversos co-solventes. Entre sais e polímeros as alternativas foram selecionadas também diante experimentos de fluorescência e dicroísmo circular, realizados para a análise da permanência da integridade estrutural das proteínas perante o acréscimo de co-solventes nos sistemas.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

Estudaram-se cinco proteínas: a albumina de soro bovino (BSA), imunoglobulina G humana (IgG), ovalbumina, beta-lactoglobulina e a lisozima, proteínas de estrutura conhecida e que permitem a avaliação da influência de parâmetros específicos (por exemplo, influência do ponto isoelétrico, tamanho e hidrofobicidade de cadeia).

A albumina de soro bovino, ovalbumina, beta-lactoglobulina e a lisozima foram adquiridas de Sigma Aldrich códigos - A3059 (96% de pureza), A5503 (98% de pureza), L2506 (80% de pureza) e L6876 (90% de pureza) respectivamente. A imunoglobulina G humana foi adquirida da CSL Behring, na forma comercial de nome Beriglobina com concentração de 160 mg/ml em soro fisiológico contendo 0,9% em massa de cloreto de sódio. Polietileno glicol de massas molares 400 e 600 foram adquiridos da Merck, os polímeros de massa 1000, 1500 e 2000 g.mol⁻¹ são também da Sigma Aldrich, assim como cloreto de sódio P.A, sulfato de sódio e sulfato de amônio P.A. Água deionizada (MilliQ) foi utilizada em todos os experimentos. Todos os outros reagentes (tampões) eram de grau analítico. Um osmômetro de membrana, (4420 Colloid Osmometer Wescor, EUA), utilizando uma membrana com diâmetro de corte de 30 ou 5 kDa foram usados nas determinações de pressão osmótica. Para ambas as proteínas cada ponto foi determinado em triplicata. O desvio padrão entre as medidas é estimado em 0,2 mmHg, ou 25 Pa.

Para a obtenção de medidas experimentais de fluorometria utilizou-se o espectrofluorômetro Aminco-Bowman Series 2, com velocidade 100 nm/min, usando uma cubeta de quartzo de 1cm de abertura óptica e termostatizada a 25°C. Já as medidas de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-810, as medidas ocorreram entre 190 e 270 nm trabalhando em uma velocidade 50 nm/min com passo de 0,5 nm. Foi utilizada uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico termostatizada a 25°C.

A composição da estrutura secundária das proteínas foi estimada a partir da análise dos espectros utilizando o software CDSSTR (Johnson, 1985). Este software junto aos programas SELCON3 e CONTILL são provenientes de um pacote informático, CDPro, desenvolvido por Sreerama e Woody (2000), da Colorado State University, gerado para analisar os espectros de dicroísmo circular de proteínas bem como determinar as frações da estrutura secundária; utilizou-se também um programa de determinação da estrutura terciária (CLUSTER) no qual se encontra disponível no website: <http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main>.

4.2. Métodos

4.2.1. Ultra-filtração da amostra

A BSA foi pré-tratada por meio de dessalinização, em protocolo desenvolvido para este propósito, que corresponde a uma seqüência de operações de ultra-filtração a 25°C por 30 minutos na centrifuga em tubos VivaspinTM (Sartorius, EUA) com diâmetro de corte de 5 kDa e subsequente diluição até que a condutividade elétrica do filtrado permanecesse constante. Após esse procedimento a amostra seguia para a etapa de liofilização. A dessalinização foi realizada pois compostos de baixa massa molar podem alterar significativamente as medidas de pressão osmótica.

4.2.2. Eletroforese

Após o procedimento de dessalinização, a proteína albumina de soro bovino foi analisada e comparada com a sua forma comercial por meio da técnica de eletroforese em gel (SDS-PAGE), conforme o procedimento descrito em Laemmli, (1970). A Figura 1 apresenta o resultado obtido, para as proteínas BSA e IgG bovina, nota-se que a técnica aplicada não alterou o perfil das bandas.

Figura 1. Eletroforese em gel da BSA. a – proteína BSA dessalinizada e b – proteína BSA em forma comercial.

4.2.3. Obtenção de dados de pressão osmótica

A pressão osmótica de soluções proteicas foi obtida para soluções contendo sais e polímeros como co-solventes. No caso específico de soluções poliméricas, a dimensão de corte da membrana escolhida foi específica que permitisse a permeação das moléculas poliméricas, por essa razão, estudaram-se apenas soluções cujas moléculas poliméricas possuíam tamanho pequeno de cadeia. No caso de, BSA e IgG humana, a membrana de corte utilizada foi 30 kDa, já para a ovalbumina, beta-lactoglobulina e lisozima, a membrana possuía corte de 5kDa.

Um conjunto de dados, nesse caso, compreende valores de pressão osmótica uma mesma concentração salina ou polimérica em diversas concentrações tanto de proteína quanto de co-solvente. Cada molécula proteica foi investigada em três valores de pH – no ponto isoelétrico (pI), acima e abaixo desse valor. Os valores específicos de

concentração proteica, salina e polimérica investigados foram determinados com base na solubilidade da proteína no meio em questão, que foi determinada previamente, e no limite inferior de detecção do aparelho. Foram feitas comparações com dados da literatura para soluções de albumina de soro bovino, de Lu *et al.* (2009), para validação da metodologia.

Para a albumina de soro bovino a solução referência contém polietilenoglicol 2000 e sulfato de sódio como co-solventes. Foram estudadas cinco concentrações distintas de PEG, e cada conjunto de pontos compreendeu em outros seis pontos com concentrações proteicas diferentes. A molécula proteica em questão foi investigada em três valores de pH – no ponto isoelétrico (pI), acima e abaixo desse valor: 5,0, 6,0 e 4,0, respectivamente. No caso do sulfato de sódio abordou-se quatro diferentes concentrações salinas e cada conjunto com também seis pontos de concentrações proteicas distintas somente em pH igual a 5,0. As soluções (proteica e de referência) eram tamponadas com tampão citrato de sódio 50mM.

No caso da imunoglobulina G humana o co-solvente considerado foi o cloreto de sódio. Foram estudadas seis concentrações distintas de co-solventes para o pH = 7,0, com solução tampão de citrato também de 50mM. No caso dos valores de pH 6,0 e 8,0 a solução tampão foi de fosfato 50mM, e consideraram-se três concentrações distintas da solução de referência. Cada conjunto de pontos compreendeu de quatro a dez pontos de concentrações proteicas diferentes, conforme a diluição da proteína permitia.

Para a ovalbumina, foram utilizadas soluções de referência com PEG 400, 600, 1000 e 2000, que foram estudadas duas concentrações distintas de PEG 1% e 2% em massa, bem como se abordou também como co-solvente o sulfato de amônio, em duas concentrações em massa 1% e 5%. Cada conjunto de pontos compreendeu em outros seis pontos com concentrações proteicas diferentes. A proteína foi investigada no ponto isoelétrico (pI) 4,6. As soluções (proteica e de referência) foram tamponadas com tampão acetato 50mM.

A proteína β -lactoglobulina foi estudada em pH 5,30, próximo ao pI, com soluções de referência de PEG 600 e 2000 também em duas concentrações 1% e 2% em massa. Utilizou-se também do sulfato de amônio como co-solvente em duas concentrações em

massa 1% e 5% similarmente às demais abordagens em que cada conjunto de dados foi formado por seis pontos de distintas concentrações de proteína. As soluções proteica e de referência foram tamponadas com tampão de acetato 50 mM.

No caso da lisozima, foram utilizadas soluções de referência de PEG 400 e 1500, também em duas concentrações distintas de PEG 1% e 2% em massa. Estudou-se solução de referência com sulfato de amônio com concentrações em massa de 1% e 5%. Sendo, cada conjunto de pontos compreendeu em outros seis pontos com concentrações proteicas diferentes. Nesse caso a proteína foi investigada próximo ao ponto isoelétrico (pI) 11,0, acima (11,5) e abaixo do mesmo (10,5). As soluções (proteica e de referência) foram tamponadas com tampão Na_2HPO_4 100mM. A Tabela 1 a seguir apresenta os sistemas abordados.

Tabela 1 – Curvas de pressão osmótica obtidas.

Proteína	pH	Co-solvente	Concentração (w/w)
BSA	4,0	PEG 2000	0,5%
			1,0%
			2,0%
			4,0%
			6,0%
	5,0	Buffer	1,0%
		Na_2SO_4	5,0%
			10,0%
			15,0%
IgG humana	6,0	NaCl	0,9%
			5,0%
			10,0%
	7,0	NaCl	0,9%
			2,0%
			3,0%
			5,0%
			10,0%
			15,0%
Ovalbumina	4,6	Buffer	
		PEG 400	1,0%
		PEG 600	2,0%
			1,0%

			2,0%
		PEG 1000	1,0%
			2,0%
		PEG 2000	1,0%
			2,0%
		(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0%
β-Lactoglobulina	5,3		5,0%
		Buffer	
		PEG 600	1,0%
			2,0%
		PEG 2000	1,0%
			2,0%
Lisozima	10,5	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0%
			5,0%
		Buffer	
	11,0	PEG 400	1,0%
			2,0%
		PEG 1500	1,0%
	11,5		2,0%
		(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0%
			5,0%

4.2.4. Medidas de fluorescência

Estudaram-se as cinco proteínas: albumina de soro bovino, β-lactoglobulina, lisozima, ovalbumina e imunoglobulina G humana.

A leitura da fluorescência de soluções proteicas foi obtida para soluções contendo sais e polímeros como co-solventes.

Um conjunto de dados, nesse caso, compreendeu valores de fluorescência em função de concentração polimérica ou salina para um mesmo “soluto” – ou seja, para uma mesma concentração salina ou polimérica em diversas concentrações tanto de proteína quanto de co-solvente. Cada molécula proteica foi investigada em três valores de pH. Todas as medidas de fluorescência foram realizadas em repetição em média 40 minutos depois com o intuito de investigar a presença de mudança de estrutura da molécula de proteína com o tempo de interação com os co-solventes.

Para o preparo das soluções foi utilizada a alíquota de 2,5 mL, em que os valores de concentrações poliméricas foram 0,50% e 10,0% em massa, e utilizou-se o polietileno glicol, PEG com os seguintes tamanhos de cadeias poliméricas: 400, 600, 1000, 1450 e 2000 g.mol⁻¹. No caso de soluções salina utilizou-se o sulfato de sódio em concentração e sulfato de amônio ambos a 50mM e 10% em massa. No caso da IgG humana a solução proteica continha cloreto de sódio em 20mM e 10% em massa.

As soluções proteicas em questão foram investigadas em três valores de pH: 4,0 5,0 e 6,0, respectivamente, nas medidas de soluções proteica de BSA (com e sem o procedimento anterior de ultra-filtração), ovalbumina e β -lactoglobulina. As soluções (proteica, polimérica e salina) foram tamponadas com tampão acetato 10mM. No caso da lisozima e imunoglobulina G humana as soluções (proteica, polimérica, salina) foram tamponadas em fosfato 20mM em valores de pH: 6,0, 7,0 e 8,0. A concentração de proteínas abordadas no experimento foi 9 μ M e as amostras era preparadas no momento em que o experimento iniciava com o objetivo de evitar a formação de multímeros, bem como a desnaturação das mesmas.

Tabela 2. Espectros de fluorescência obtidos

Proteína	pH	Co-solvente	Concentração (w/w)
BSA	4,0 5,0 6,0	PEG 400	0,50%
			10,0%
		PEG 600	0,50%
			10,0%
		PEG 1000	0,50%
			10,0%
		PEG 1500	0,50%
			10,0%
		PEG 2000	0,50%
			10,0%
		Na ₂ SO ₄	50mM
			10,0%
		(NH ₄) ₂ SO ₄	50mM
			10,0%
IgG humana	6,0	NaCl	20mM
	7,0		10,0%

	8,0		
Ovalbumina	4,0 5,0 6,0	PEG 400	0,50%
			10,0%
		PEG 600	0,50%
			10,0%
		PEG 1000	0,50%
			10,0%
		PEG 1500	0,50%
			10,0%
		PEG 2000	0,50%
			10,0%
		Na ₂ SO ₄	50mM
			10,0%
		(NH ₄) ₂ SO ₄	50mM
			10,0%
β-lactoglobulina	4,0 5,0 6,0	PEG 400	0,50%
			10,0%
		PEG 600	0,50%
			10,0%
		PEG 1000	0,50%
			10,0%
		PEG 1500	0,50%
			10,0%
		PEG 2000	0,50%
			10,0%
		Na ₂ SO ₄	50mM
			10,0%
		(NH ₄) ₂ SO ₄	50mM
			10,0%
Lisozima	6,0 7,0 8,0	PEG 400	0,50%
			10,0%
		PEG 600	0,50%
			10,0%
		PEG 1000	0,50%
			10,0%
		PEG 1500	0,50%
			10,0%
		PEG 2000	0,50%
			10,0%
		Na ₂ SO ₄	50mM
			10,0%
		(NH ₄) ₂ SO ₄	50mM
			10,0%

4.2.5. Medidas de dicroísmo circular

Estudaram-se as cinco proteínas: albumina de soro bovino (BSA), β -lactoglobulina, lisozima, ovalbumina e imunoglobulina G humana, usando polímeros e sais como co-solventes.

Para o preparo das soluções foi utilizada a alíquota de 1,5 mL, em que os valores de concentrações poliméricas foram 0,50% e 5,0% em massa, utilizou-se o polietileno(glicol), PEG com os seguintes tamanhos de cadeias poliméricas: 400, 600, 1000, 1450 e 2000. No caso de soluções salinas utilizou-se o sulfato de sódio e sulfato de amônio em concentração igual a 50mM e cloreto de sódio a 20mM.

Assim como no caso das medidas de fluorescência as soluções proteicas em questão foram investigadas em três valores de pH: 4,0 5,0 e 6,0, respectivamente, nas medidas de soluções proteica de BSA (com e sem o procedimento anterior de ultra-filtração) ovalbumina e β -lactoglobulina. As soluções (proteica, polimérica e salina) foram tamponadas com tampão acetato 10mM. No caso da lisozima e imunoglobulina G humana as soluções (proteica, polimérica, salina) foram tamponadas em fosfato 20mM em valores de pH: 6,0, 7,0 e 8,0. As concentrações de proteínas abordadas no experimento variaram de 3 μ M e 10 μ M (dependendo da proteína).

Um conjunto de dados, nesse caso, compreende valores de espectro em função de concentração polimérica ou salina para um mesmo “soluto” – ou seja, para uma mesma concentração salina ou polimérica em diversas concentrações tanto de proteína quanto de co-solvente. Cada molécula proteica foi investigada em três valores de pH. Todas as medidas de dicroísmo circular foram realizadas em concentrações específicas indicadas da literatura, Corrêa e Ramos (2009) de modo que a concentração dos co-solventes fosse distinta da faixa de concentrações em que não é possível discernir o efeito da presença dos mesmos e o que provém da alteração da estrutura secundária (por isso, a ausência de medidas com concentrações salinas maiores). E também, de cada espectro resultante foi subtraído o espectro correspondente ao meio de referência em questão: polimérico ou salino. Durante as medidas no espectropolarímetro

supervisionou-se os valores de voltagens atingidos de modo a conciliá-los com os valores de comprimento de onda de interesse.

Tabela 3. Espectros de dicroísmo circular obtidos.

Proteína	pH	Co-solvente	Concentração (w/w)
BSA	4,0 5,0 6,0	PEG 400	0,50%
			5,0%
		PEG 600	0,50%
			5,0%
		PEG 1000	0,50%
			5,0%
		PEG 1500	0,50%
			5,0%
		PEG 2000	0,50%
			5,0%
		Na ₂ SO ₄	50mM
		(NH ₄) ₂ SO ₄	50mM
IgG humana	6,0	NaCl	20mM
	7,0		
	8,0		
Ovalbumina	4,0 5,0 6,0	PEG 400	0,50%
			5,0%
		PEG 600	0,50%
			5,0%
		PEG 1000	0,50%
			5,0%
		PEG 1500	0,50%
			5,0%
		PEG 2000	0,50%
			5,0%
		Na ₂ SO ₄	50mM
		(NH ₄) ₂ SO ₄	50mM
Beta-lactoglobulina	4,0 5,0 6,0	PEG 400	0,50%
			5,0%
		PEG 600	0,50%
			5,0%
		PEG 1000	0,50%
			5,0%
		PEG 1500	0,50%
			5,0%
		PEG 2000	0,50%
			5,0%

			5,0%
		Na ₂ SO ₄	50mM
		(NH ₄) ₂ SO ₄	50mM
Lisozima	6,0 7,0 8,0	PEG 400	0,50%
			5,0%
		PEG 600	0,50%
			5,0%
		PEG 1000	0,50%
			5,0%
		PEG 1500	0,50%
			5,0%
		PEG 2000	0,50%
			5,0%
		Na ₂ SO ₄	50mM
		(NH ₄) ₂ SO ₄	50mM

5. Resultados

No contexto deste trabalho foram geradas no total 71 curvas de pressão osmótica (compostas por 446 pontos realizados em triplicata); 630 espectros de fluorescência (realizados em duplicata) e 550 espectros de dicroísmo circular. A seguir serão apresentados alguns resultados mais relevantes.

5.1. Albumina sérica bovina

Como dito anteriormente, esta proteína foi previamente ultrafiltrada e posteriormente liofilizada antes dos experimentos de pressão osmótica. Curvas foram obtidas para a BSA em sistemas com água deionizada bem como com polietileno(glicol) 2000 (PEG 2000) em pH 4,0, 5,0 e 6,0, com as concentrações poliméricas variando em 0,5%, 1,0%, 2,0%, 4,0% e 6,0% em massa. Utilizou-se também como co-solvente o sulfato de sódio em concentrações 1%, 5%, 10% e 15% em massa e pH igual a 5,0. As Figuras seguintes sumarizam os resultados obtidos.

Figura 2. Pressão osmótica para sistemas contendo BSA, variando a concentração de PEG 2000 em pH = 4,0 a 298,15 K. $\diamond$ - 0,5%, $\square$ - 1,0%, Δ - 2,0%, $\circ$ - 4,0%, $\times$ - 6,0% em massa de PEG 2000.

Figura 3. Pressão osmótica para sistemas contendo BSA, variando a concentração de PEG 2000 em pH = 5,0 a 298,15 K. $\diamond$ - 0,5%, $\square$ - 1,0%, Δ - 2,0%, $\circ$ - 4,0%, $\times$ - 6,0% em massa de PEG 2000.

Figura 4. Pressão osmótica para sistemas contendo BSA, variando a concentração de PEG 2000 em pH = 6,0 a 298,15 K. $\diamond$ - 0,5%, $\square$ - 1,0%, Δ - 2,0%, $\circ$ - 4,0%, $\times$ - 6,0% em massa de PEG 2000.

Figura 5. Pressão osmótica para sistemas contendo BSA, variando a concentração de Na_2SO_4 em pH = 5,0 a 298,15 K. $\blacksquare$ - solução tamponada, $\diamond$ - 1,0%, $\square$ - 5,0%, Δ - 10,0%, $\times$ - 15,0% em massa de sulfato de sódio.

Pode-se observar que, para pH = 4,0, os valores de pressão osmótica apresentam um declínio em valor absoluto conforme a concentração polimérica do sistema aumenta. Para as menores concentrações (0,5% e 1,0%) os valores são muito semelhantes, bem como para as concentrações de 4,0% e 6,0% (entre si). Para os demais valores de pH verifica-se, porém, que para a concentração polimérica de 4,0% as medidas obtidas são mais elevadas que para outras concentrações de PEG 2000. A respeito do efeito do aumento de pH nos valores de pressão osmótica pode-se destacar que houve semelhança nos valores obtidos para as mesmas concentrações, com exceção para o caso de concentração polimérica 4,0%.

É possível estimar a massa molar de um soluto a partir da curva de pressão osmótica, tomando-se o limite da equação (5) em que a concentração de soluto se aproxima de zero. Nesse caso específico, conhece-se de antemão esse valor, de modo que o valor da massa molar pode ser utilizado para verificar a confiabilidade do método experimental, calculando-se pelo meio do coeficiente linear da equação seguinte:

$$\frac{1}{M_p} = \lim_{c_p \rightarrow 0} \frac{\Pi}{c_p RT} \quad (71)$$

A Tabela 4 abaixo apresenta os resultados obtidos por meio da equação anterior.

Tabela 4 – Dados obtidos de valores de massa molar da proteína para o sistema contendo BSA a 298,15K.

pH	<i>W_{co-solvente}</i>	<i>M_p</i>
4,0	0,50%	81000
	1,00%	69000
	2,00%	148000
	4,00%	144000
	6,00%	201000
5,0	0,50%	74000
	1,00%	69000
	2,00%	106000
	4,00%	33000
	6,00%	133000
6,0	0,50%	78000
	1,00%	127000
	2,00%	112000

4,00%	64000
6,00%	204000

Observa-se que os resultados são razoáveis, embora erros grandes sejam observados, principalmente para concentrações mais altas de polímero. Não se deve exagerar a importância da diferença: afinal, o valor calculado resulta de uma extrapolação, para concentração zero, dos resultados de soluções relativamente concentradas ($>10 \text{ mg.mL}^{-1}$). Como, para alguns pontos em baixas concentrações proteicas a pressão osmótica lida aproximava-se de zero, é possível que a cinética mais lenta para que o equilíbrio seja atingido (em razão da maior viscosidade da mistura, para as altas concentrações poliméricas) tenha aumentado o erro relativo do osmômetro.

O abaixamento da pressão osmótica pela adição de polímero era previsto na literatura (Pessoa Filho, 2006), mas até o momento não havia nenhuma confirmação experimental deste fato.

Na Figura 5, podem-se analisar os resultados com o sulfato de sódio como co-solvente. Em concentração igual ou menor que 5,0% de sal os valores de pressão osmótica aumentam com o aumento da quantidade de sal presente no sistema. Contudo, para a concentração salina de 10,0% e 15,0% as medidas obtidas são mais baixas que para outras concentrações salinas.

Na literatura a pressão osmótica de BSA é abordada por alguns autores (Park e Choi, 2009, Wu e Prausnitz, 1999 e Lu *et al.* 2009), mas não existem publicações de conjuntos de dados envolvendo qualquer proteína após a realização de ultrafiltração ou contendo o polímero como co-solvente. Especificamente no que diz respeito à ultrafiltração, a comparação de dados experimentais nas condições apresentadas por Lu *et al.* (2009) mostra que o procedimento altera significativamente os resultados, modificando os valores absolutos da pressão osmótica e por consequência, os valores do segundo coeficiente virial.

Os valores de Π podem ser utilizados para a obtenção do segundo coeficiente virial. O cálculo do segundo coeficiente virial é feito conforme a metodologia clássica

apresentada em Van Ness e Abbot (1982), tomando-se o limite da função ψ quando a densidade tende a zero:

$$B'_2 = \lim_{\rho_p \rightarrow 0} \psi = \lim_{\rho_p \rightarrow 0} \rho_b^{-1} \left(\frac{\Pi}{\rho_p RT} - 1 \right) \quad (72)$$

A Figura 6 apresenta o cálculo do segundo coeficiente osmótico para a BSA em soluções de PEG 2000 em pH igual a 4,0. Os dados para concentrações de polímero 4,0% e 6,0% são apresentados por ilustração, pois não são confiáveis, conforme demonstrado pela aplicação anterior. Nota-se que é difícil realizar uma extrapolação confiável – o que também é atestado na literatura, cf. Lu *et al.* (2009). De modo geral, nota-se um decréscimo no valor de ψ conforme ocorre o aumento da concentração de PEG.

Figura 6. Função ψ para cálculo do segundo coeficiente virial osmótico da BSA em soluções de PEG 2000 em pH = 4,0. ◇ – 0,5% de PEG; □ – 1,0% de PEG; △ – 2,0 % de PEG, ○ – 4,0% de PEG, ◆ – 6,0% de PEG.

Os valores obtidos para o segundo coeficiente do virial conforme a equação (72), isto é como sendo o coeficiente linear de cada curva da Figura 6 bem como seus

desvios encontram-se na Tabela 5 a seguir. Com o intuito de aumentar a eficiência do intervalo de confiança do valor do parâmetro B_2 , no cálculo do desvio do mesmo desprezou-se o primeiro ponto de cada sistema, isto é, as menores concentrações de BSA foram retiradas do cálculo.

Tabela 5- Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema BSA com PEG 2000 a 298,15 K.

<i>pH</i>	<i>w_{PEG}</i>	<i>B₂</i>
4,0	0,50%	-1,1 ± 0,062
	1,00%	-0,52 ± 0,075
	2,00%	-3,2 ± 0,22
	4,00%	-
	6,00%	-
5,0	0,50%	-0,48 ± 0,046
	1,00%	-0,27 ± 0,11
	2,00%	-2,4 ± 0,090
	4,00%	-
	6,00%	-
6,0	0,50%	-0,24 ± 0,076
	1,00%	-2,8 ± 0,32
	2,00%	-2,4 ± 0,18
	4,00%	-
	6,00%	-

Tabela 6- Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema BSA com Na₂SO₄ a 298,15 K em pH 5,0.

<i>W_{co-solvente}</i>	<i>B₂</i>
BUFFER	1,4 ± 0,13
Na ₂ SO ₄ 1%	0,21 ± 0,14
Na ₂ SO ₄ 5%	-0,16 ± 0,038
Na ₂ SO ₄ 10%	-0,035 ± 0,058
Na ₂ SO ₄ 15%	0,12 ± 0,087

Verifica-se na Tabela 5 uma tendência nos valores obtidos para o segundo coeficiente osmótico virial. Para soluções proteicas com 0,50% em massa de polímero

como co-solvente o valor é menor que para 1,0% em massa de PEG 2000. Nota-se por fim que à medida que essa quantidade de PEG aumenta, há novamente um decréscimo do valor do parâmetro B_2 . Como exemplo, na Figura 6, pode-se situar B como $-0,5 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (0,5%), $-0,3 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (1,0%) e $-2,4 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, notando um decréscimo acentuado com o aumento da concentração de PEG. Esses valores obtidos são coerentes com os resultados encontrados na literatura para a BSA próximo ao ponto isoelétrico em soluções salinas: por exemplo, com sulfato de amônio a 0,15 M (Lu *et al.*, 2009) o segundo coeficiente osmótico é de $-0,26 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, e com cloreto de sódio a 0,15M (Vilker *et al.*, 1980), tem-se $0,50 \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, aproximadamente. Obviamente, não existem dados na literatura sobre os sistemas investigados (eles são inéditos), mas é digno de nota que os resultados tenham a mesma ordem de grandeza de sistemas com alguma semelhança. No sistema de BSA com sulfato de sódio o valor do segundo coeficiente osmótico varia muito perante a presença do co-solvente, porém, em relação ao seu comportamento diante da variação do sal, nota-se que quando a variação aumenta de 1% para 5% o valor de B_2 diminui; já quando a concentração em massa do sal sobe tanto para 10%, quanto para 15% em massa, o valor de B_2 aumenta novamente. Pode-se observar, entretanto, que o valor de B_2 nesse caso é influenciado pelos pontos de menor concentração, para os quais parece haver um desvio na curva de pressão osmótica (Figura 5).

Para analisar a permanência da integridade estrutural da BSA, analisemos os espectros de fluorescência. A Figura 7 mostra os espectros de emissão da BSA a diferentes pHs: 4,0, 5,0 e 6,0.

Figura 7. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo BSA em soluções tamponadas a 20mM acetato a 298,15K. Linha tracejada - pH = 4,0; linha contínua - pH =5,0; linha pontilhada - pH = 6,0

Nota-se para os diferentes valores de pH o pico emissivo está próximo a 338 nm, valor compatível com a presença de dois triptofanos, sendo um exposto e outro oculto. Como citado anteriormente, quando todos triptofanos estão ocultos o pico de emissão decai para 325-330 nm, caso contrário (todos expostos) o pico estaria entre 345-350 nm. Os espectros correspondentes aos pHs 5 e 6 são praticamente sobreponíveis, entretanto o gráfico correspondente ao pH 4 evidencia uma ligeira diminuição do máximo de emissão, o qual indicaria um incremento na acessibilidade de seu triptofano oculto ao solvente e logo uma maior suscetibilidade a sofrer extinção da sua fluorescência.

Os efeitos da presença de um co-solvente, como nesse caso o polietileno (glicol), no espectro de emissão proteica a pH 4,0 são apresentados abaixo nas Figuras 8 e 9.

Figura 8. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 9. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Em baixas concentrações o PEG praticamente não modifica o sinal de fluorescência da BSA, sugerindo que nestas condições o polímero não induz nenhuma alteração conformacional na proteína. Entretanto, nos experimentos no mesmo pH e em maior concentração polimérica (10% em massa), como se pode observar na Figura 8, nota-se que para as cadeias poliméricas menores, isto é, PEG 400, 600 e 1000; há uma redução do valor da intensidade do sinal de fluorescência, bem como, um deslocamento da curva do espectro, ou seja, o pico de emissão (maior valor de fluorescência) ocorre em um comprimento de onda menor. Praticamente nenhuma mudança ocorre nos polímeros de maior cadeia, PEG 1450 e PEG 2000, provavelmente devido a um fenômeno de exclusão por tamanho.

A diminuição do valor da intensidade do sinal de fluorescência é denominado *Quenching*. De acordo com Lorente (2003), esse fenômeno pode ocorrer por dois mecanismos:

- *Quenching* dinâmico ou colisional - em que o *quencher* (substância agregada, nesse caso, o co-solvente, PEG ou sal) choca com o fluoróforo (substância que fluoresce, nesse caso os triptofanos excitados das proteínas) e faz com que perca como calor, parte da energia que os fluoróforos iam emitir como luz fluorescente, fazendo então com que a quantidade de fluoróforos que emitem luz seja menor, fornecendo um sinal mais tênue. Esse fenômeno é chamado de dinâmico já que o *quencher* deve difundir até o fluoróforo para chocar e fazer perder sua energia
- *Quenching* estático.- em que o *quencher* forma um complexo com o fluoróforo em seu estado basal (ou fundamental, antes de excitar-se). Esse complexo não pode excitar, logo somente serão excitados os fluoróforos que não formaram complexos com o *quencher*, portanto, o sinal será menor.

Há casos em que há presença dos dois fenômenos de *quenching* simultaneamente. Também conforme Lorente (2003), para saber que tipo de *quenching* ocorreu, existem experimentos de longitude de onda de excitação e emissão fixas a

diferentes concentrações de *quencher*, e a análise é feita a partir chamados gráficos de Stern Volmer, Lakowicz (1983).

Quando se obtém um espectro de emissão, como no caso deste trabalho, se pode observar se esse *quenching* ocorreu ou não com alteração no pico de emissão (deslocamento). Isso não ocorre sempre que há *quenching* e pode ocorrer devido a mudanças na polaridade do entorno do fluoróforo ocasionado pela presença de um *quencher* próximo. A alteração no entorno faz mudar o salto de energia que emite o fluoróforo e se muda o salto, altera também a longitude de onda de emissão.

Em pH 5,0 e 6,0, para todas as cadeias polimérica, não se verificou alteração nos espectros de emissão. Logo, pode-se dizer que a presença de PEG não ocasiona nenhuma modificação no entorno dos aminoácidos responsáveis de sinal de fluorescência. Outros co-solventes utilizados foram os sais sulfato de sódio e sulfato de amônio. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 10 a seguir:

Figura 10. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha cinza contínua – sulfato de amônio 50mM; linha cinza tracejada – sulfato de amônio 10%; linha vermelha contínua – sulfato de sódio 20mM; linha vermelha tracejada – sulfato de sódio 10%.

De maneira semelhante ao observado para o PEG, a presença de sais somente produz modificações significativas em pH 4,0, valor abaixo do ponto isoelétrico da

proteína (4,9), ou seja, condição em que a carga líquida da solução é positiva. Este fato permite supor que neste pH a proteína adota uma conformação suficientemente aberta como para admitir o acesso de moléculas de PEG de menor cadeia e sais ao entorno do triptofano, praticamente inacessível em pH 5,0 e 6,0. A Figura 11 apresenta o espectro de dicroísmo circular correspondente da BSA em pH 6,0 na ausência e presença de PEG's de diferentes pesos moleculares. Por tratar-se de uma proteína com uma elevada quantidade de hélices alfa, notam-se os picos negativos característicos a 209 e 220nm respectivamente.

Figura 11. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Pode-se afirmar de modo geral que a presença de diferentes PEG's e sais geram mudanças pequenas no padrão espectral observado, sugerindo que a interação com estes solutos não induz uma perda significativa do grau de estruturação proteica. Resultados similares foram obtidos para o pH igual a 5,0. As alterações mais

significativas são observadas em pH 4,0, como mostram as Figuras 12, 13 e 14 a seguir.

Figura 12. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 13. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 14. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha vermelha – sulfato de amônio 50mM; linha cinza – sulfato de sódio 20mM.

A deconvolução dos espectros citados segundo a metodologia descrita previamente, permitiu estimar as quantidades de hélices alfa, folhas beta, giros e formação desordenada em presença e ausência dos diferentes co-solventes, os quais são dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo BSA.

<i>Co-solvente</i>	<i>Alfa</i>	<i>Beta</i>	<i>Giro</i>	<i>Desordem</i>
Buffer	47,2%	10,2%	16,2%	26,4%
PEG 400 0,5%	48,0%	9,5%	15,7%	26,8%
PEG 400 5,0%	48,5%	9,6%	15,3%	26,5%
PEG 600 0,5%	51,2%	9,0%	14,7%	25,1%
PEG 600 5,0%	39,5%	13,9%	17,9%	28,7%
PEG 1000 0,5%	52,8%	8,4%	14,6%	24,3%
PEG 1000 5,0%	32,9%	17,7%	19,3%	30,1%
PEG 1450 0,5%	51,7%	7,7%	15,0%	25,6%
PEG 1450 5,0%	45,0%	10,7%	16,5%	27,8%
PEG 2000 0,5%	30,9%	9,0%	23,3%	36,6%
PEG 2000 5,0%	42,4%	11,9%	17,6%	28,1%
(NH ₄) ₂ SO ₄	49,2%	9,1%	15,4%	26,3%
Na ₂ SO ₄	43,4%	10,2%	16,8%	28,7%

A análise destes resultados permite observar que a presença de PEG 600, 1000 e 1450 induz a proteína a uma conversão de parte do componente hélice alfa para folha beta, comportamento observado na literatura para a BSA diante do incremento na temperatura (Friedli, 1996). Paralelamente verifica-se um sensível aumento em fração de cadeia estatística, o qual indicaria uma abertura da molécula de BSA. Esses resultados são coerentes com os observados mediante espectroscopia de fluorescência e permitem concluir que o fato dos co-solventes estarem presentes, praticamente não afeta o estado conformacional da proteína em questão, pois as diferenças observadas são muito pequenas (e provavelmente não afetariam a modelagem termodinâmica, permitindo que se considere, nesse caso, a integridade estrutural dessas moléculas). Somente algumas modificações, a maioria não significativa, são observadas em pH

igual a 4,0, mas devidas provavelmente à transição que ocorre abaixo do ponto isoelétrico da proteína.

5.2. Imunoglobulina G humana

A imunoglobulina G humana utilizada é a forma comercial (de nome Beriglobina) com concentração 160 mg.mL^{-1} em soro fisiológico contendo 0,9% de cloreto de sódio. Como co-solvente foi usado o cloreto de sódio adquirido na Sigma-Aldrich, e água deionizada. O motivo de que somente o NaCl foi considerado como co-solvente nesse sistema é relacionado o fato de que, por se tratar de uma proteína de uso medicinal, outros co-solventes não têm aplicação prática. A molécula proteica foi investigada em seis concentrações distintas de cloreto de sódio em pH 7,0, e cada conjunto de pontos compreendeu em outros cinco a onze pontos com concentrações proteicas diferentes, variando conforme a quantidade de sal era adicionada – a concentração salina variou em 0,9%, 2,0%, 3,0%, 5,0%, 10,0% e 15,0%. A proteína também foi estudada em outros dois valores de pH (6,0 e 8,0, abaixo e acima do pH fisiológico da molécula).

Assim como nos demais experimentos realizados, cada ponto obtido correspondeu a uma alíquota média de 1 mL da solução proteica com cloreto de sódio. Todos os pontos foram realizados em triplicata a fim de validar os resultados obtidos. O desvio padrão entre as medidas é estimado em 0,2 mmHg, ou 25 Pa.

Para exemplificar os resultados obtidos de medidas de pressão osmótica para a IgG humana, as Figuras 15, 16 e 17 a seguir apresentam os dados para o pH igual a 6,0, 7,0 e 8,0, respectivamente.

Figura 15 - Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 6,0 a 298,15K. ● - NaCl 0,9%; □ - NaCl 5,0%; ◇ - NaCl 10,0%.

Figura 16 - Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 7,0 a 298,15K. ● - NaCl 0,9%; ◇ - NaCl 2,0%; ○ - NaCl 3,0%; △ - NaCl 5,0%; □ - NaCl 10,0%; ◆ - NaCl 15,0%

Figura 17 - Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 8,0 a 298,15K. ● - NaCl 0,9%; □ - NaCl 5,0%; ◇ - NaCl 10,0%.

Pode-se observar que, para pH = 7,0, os valores de pressão osmótica apresentam um brando declínio do valor absoluto conforme a concentração salina do sistema aumenta. Para a concentração igual ou menor que 5,0% de sal os valores de pressão osmótica aumentam com o aumento da quantidade de sal presente no sistema. Observa-se, porém, que para a concentração salina de 10,0% e 15,0% as medidas obtidas são mais baixas que para outras concentrações de cloreto de sódio. Nos valores de pH 6,0 e 8,0 na concentração salina de 0,9% e 5,0% verifica-se um acréscimo no valor obtido de pressão osmótica, já no caso de 10,0% de cloreto de sódio há uma diminuição da mesma. Nota-se que apesar de existir uma diferença significativa nos valores de concentração de cloreto de sódio (0,9% à 15%) as curvas são visualmente muito próximas, comportamento este esperado, pois é sabido que o NaCl não causa o efeito de salting-out.

Assim como realizado para a BSA, realizou-se para a proteína em questão o cálculo da massa molar por meio da equação (71). Os dados obtidos encontram-se

representados na Tabela 8. Nesse caso específico, observa-se que as diferenças encontradas são relativamente pequenas.

Tabela 8 – Dados obtidos de valores de massa molar da proteína para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio+ água deionizada a 298,15K.

<i>pH</i>	<i>w_{NaCl}</i>	<i>M_p</i>
6	0,90%	193000
	5,00%	167000
	10,00%	208000
7	0,90%	217000
	2,00%	219000
	3,00%	229000
	5,00%	223000
	10,00%	226000
	15,00%	175000
8	0,90%	199000
	5,00%	177000
	10,00%	250000

Na literatura a pressão osmótica de IgG humana não é abordada, não existindo publicações de conjuntos de dados envolvendo-a.

Os valores obtidos para o segundo coeficiente virial conforme a equação (72), bem como seus desvios, encontram-se na Tabela 9 a seguir. Com o intuito de aumentar o intervalo de confiança do valor do parâmetro B_2 , no cálculo do desvio do mesmo desprezou-se o primeiro ponto de cada sistema, isto é, as menores concentrações de IgG humana foram retiradas do cálculo.

Tabela 9 - Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema IgG humana + NaCl + água deionizada a 298,15 K.

<i>pH</i>	<i>w_{NaCl}</i>	<i>B₂</i>
6,0	0,90%	-0,78 ± 0,054
	5,00%	-0,45 ± 0,030
	10,00%	-1,2 ± 0,089
7,0	0,90%	-1,6 ± 0,14
	2,00%	-1,2 ± 0,099

	3,00%	$-1,4 \pm 0,12$
	5,00%	$-1,3 \pm 0,087$
	10,00%	$-1,8 \pm 0,087$
	15,00%	$-2,1 \pm 0,15$
8,0	0,90%	$-0,90 \pm 0,054$
	5,00%	$-0,60 \pm 0,050$
	10,00%	$-1,8 \pm 0,089$

Verifica-se na Tabela 9 uma tendência nos valores obtidos para o segundo coeficiente osmótico virial, sendo que para soluções proteicas com 0,90% em massa de cloreto de sódio como co-solvente o valor é menor que para 5,0% em massa e nota-se por fim que à medida que essa quantidade de sal aumenta, há novamente um decréscimo do valor do parâmetro B_2 . O comportamento para altas concentrações mostra que o NaCl tem um efeito de *salting-out*, mas muito pequeno – a variação no valor de B_2 é pequena.

A respeito dos espectros de fluorescência, a Figura 18 mostra os espectros de emissão da IgG humana em pH 6,0, 7,0 e 8,0. Nota-se que para os diferentes valores de pH o pico emissivo está próximo a 329 nm, valor compatível com a presença de nove triptofanos, todos ocultos. Os espectros correspondentes aos pHs 6, 7 e 8 são muito semelhantes, não indicando nenhuma alteração na acessibilidade aos triptofanos na presença do solvente.

Figura 18. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo IgG humana em soluções tamponadas a 50mM fosfato a 298,15K. Linha contínua - pH =6,0; linha tracejada - pH=7,0; linha pontilhada - pH = 8,0

A presença de um co-solvente, como nesse caso o cloreto de sódio, no espectro de emissão proteica, em duas concentrações (50mM e 10%) não resultou em nenhuma alteração na suscetibilidade a sofrer fluorescência.

Sabe-se que a Imunoglobulina G humana tem como característica apresentar maior quantidade de folhas beta, por esse motivo o espectro dessa proteína é caracterizado pela ausência de picos, apresentando assim um espectro com pouca curvatura. A respeito das análises de espectro de dicroísmo circular os resultados obtidos são apresentados na figura 19 seguinte.

Figura 19. Espectro de dicroísmo circular a 298,15K para o sistema contendo IgG humana em soluções de NaCl 50mM. Linha preta - pH = 6,0; linha vermelha - pH = 7,0; linha azul – pH = 8,0; linhas contínuas –solução tamponada; linha tracejadas – solução salina.

A deconvolução dos espectros obtidos, em presença e ausência de cloreto de sódio, é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo IgG humana.

<i>pH</i>	<i>Co-solvente</i>	<i>Alfa</i>	<i>Beta</i>	<i>Giro</i>	<i>Desordem</i>
6,0	Buffer	3,3%	41,9%	21,4%	33,4%
	NaCl 50mM	3,2%	42,7%	21,3%	32,8%
7,0	Buffer	2,9%	41,8%	21,5%	33,8%
	NaCl 50mM	3,0%	42,6%	21,2%	33,2%
8,0	Buffer	3,9%	42,3%	21,8%	32,0%
	NaCl 50mM	3,9%	43,3%	21,0%	31,8%

Os resultados obtidos mostram que, apesar do espectro do dicroísmo circular sugerir alguma alteração na estrutura proteica, a mudança do pH, bem como a

presença NaCl como co-solvente, não muda a distribuição da estrutura secundária da proteína. Esses resultados também são coerentes com os observados na análise de espectro de fluorescência.

Desse modo, a aplicação de modelos que considerem uma mesma forma e mesmos potenciais de interação seria adequada para a modelagem de IgG.

5.3. Ovalbumina

No caso da ovalbumina, como co-solvente foi usado o polietileno glicol em diversos tamanhos de cadeias poliméricas (400, 600, 1000 e 2000). A molécula proteica foi investigada no ponto isoelétrico (pI), sendo estudadas seis concentrações distintas de PEG em pH 4,6, em tampão 50mM de acetato, sendo que cada conjunto de pontos compreendeu em outros seis pontos com concentrações proteicas diferentes, variando conforme a quantidade de polímero adicionado, que variou em 1,0% e 2,0%. Também investigou-se o sulfato de amônio como co-solvente, no ponto isoelétrico, em seis diferentes concentrações proteicas, com concentração salina de 1% e 5% em massa.

A fim de exemplificar os resultados obtidos de medidas de pressão osmótica para a ovalbumina, as Figuras 20 e 21 apresentam os dados para o pH igual a 4,6 com polímero e sal como co-solvente, respectivamente.

Figura 20 - Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo ovalbumina + PEG + água deionizada em pH = 4,6 a 298,15K. * - solução tamponada; Δ - PEG 400 1%; $\blacktriangle$ - PEG 400 2%; $\circ$ - PEG 600 1%; $\bullet$ - PEG 600 2%; $\square$ - PEG 1000 1%; $\blacksquare$ - PEG 1000 2%; $\diamond$ - PEG 2000 1%; $\blacklozenge$ - PEG 2000 2%.

Figura 21 - Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo ovalbumina + $(NH_4)_2SO_4$ + água deionizada em pH = 4,6 a 298,15K. $\blacksquare$ - solução tamponada; Δ - $(NH_4)_2SO_4$ 1%; $\blacktriangle$ - $(NH_4)_2SO_4$ 5%

Pode-se observar que os valores de pressão osmótica apresentam um decréscimo em valor absoluto conforme o tamanho da cadeia polimérica do sistema aumenta (exceto para o PEG 2000). Outra questão interessante é que somente para o PEG 1000 notou-se que o aumento da concentração polimérica de 1% para 2% levou a um decréscimo da pressão osmótica. Para os demais tamanhos de cadeia os valores de pressão osmótica aumentam um pouco com o aumento da concentração do co-solvente.

Nos casos em que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ esteve presente como co-solvente, nota-se que os valores de pressão osmótica aumentaram diante o aumento da concentração mássica do sal, comportamento este já observado nos demais casos de outras proteínas na presença de sal na solução de referência.

Os valores encontrados para o valor de massa molecular da proteína estão apresentados na Tabela 11:

Tabela 11 – Dados obtidos de valores de massa molar da proteína para o sistema contendo ovalbumina a 298,15K.

<i>$W_{co-solvente}$</i>	<i>M_p</i>
BUFFER	83000
PEG 400 1%	95000
PEG 400 2%	148000
PEG 600 1%	114000
PEG 600 2%	157000
PEG 1000 1%	116000
PEG 1000 2%	112000
PEG 2000 1%	39000
PEG 2000 2%	64000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%	94000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5%	148000

Os valores obtidos para o segundo coeficiente virial conforme a equação (72), bem como seus desvios encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12- Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema ovalbumina a 298,15 K.

$W_{co-solvente}$	B_2
BUFFER	-2.5 ± 0.64
PEG 400 1%	-2.6 ± 0.32
PEG 400 2%	-3.6 ± 0.61
PEG 600 1%	-3.0 ± 0.35
PEG 600 2%	-3.9 ± 0.61
PEG 1000 1%	-3.3 ± 0.29
PEG 1000 2%	-3.5 ± 0.45
PEG 2000 1%	1.3 ± 0.12
PEG 2000 2%	-0.19 ± 0.41
$(NH_4)_2SO_4$ 1%	-2.2 ± 0.29
$(NH_4)_2SO_4$ 5%	0.90 ± 0.24

Pela Tabela 12, observa-se que o segundo coeficiente osmótico virial diminui com o aumento do tamanho do polímero e com o acréscimo em sua concentração (com exceção do PEG 1000). Observa-se também que o comportamento dos sistemas contendo PEG 2000 é anômalo; não se sabe a razão pela qual o coeficiente virial torna-se positivo em suas soluções.

Os espectros de fluorescência obtidos indicam, de modo geral, que em baixas concentrações (0,5%), assim como no caso da BSA, o PEG praticamente não modifica o sinal de fluorescência, sugerindo que nestas condições o polímero não induz nenhuma alteração na estrutura da proteína. Porém, quando a concentração polimérica aumenta para 10% com polímeros de menor tamanho (inferiores a PEG 1000), não há deslocamento, mas se verifica uma diminuição no valor do pico de emissão. No caso da presença de sais não foi observada nenhuma mudança conformacional na proteína.

Figura 22. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

A Figura 22 mostra os espectros de emissão de ovalbumina em pH 6,0. Nota-se o pico emissivo está próximo a 330 nm, valor compatível com a presença de seis triptofanos, sendo um exposto parcialmente e os demais ocultos. Os espectros correspondentes aos pHs 4,0 e 5,0 não apresentam alteração na acessibilidade na extinção da fluorescência, os resultados encontram-se no Apêndice B.

Apesar de se tratar de um tipo de albumina, o espectro de dicroísmo circular da ovalbumina difere bastante quando comparado ao da BSA. Trata-se de uma proteína que se caracteriza pela presença de maior quantidade de folhas beta, apresentando assim um espectro menos curvado sem a presença de picos marcados. Pode-se afirmar de modo geral que a presença de diferentes PEG's e sais, em pH 4,0 e 6,0 não geram mudanças estruturais expressivas, sugerindo que a interação com estes solutos não induz perdas significativas do grau de estruturação proteica nestas condições. A

exceção é o pH 5,0, situação em que é verificada alteração na estrutura secundária proteica na presença de sulfato de sódio, como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.

A deconvolução dos espectros de dicroísmo é apresentada na Tabela 13:

Tabela 13 – Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo ovalbumina em pH 5,0.

Co-solvente	Alfa	Beta	Giro	Desordem
Buffer	18,2%	29,8%	22,4%	29,6%
PEG 400 0,5%	18,2%	28,8%	23,2%	29,8%
PEG 400 5,0%	11,4%	33,4%	24,0%	31,3%
PEG 600 0,5%	18,2%	29,9%	22,5%	29,2%
PEG 600 5,0%	17,8%	31,2%	22,9%	28,0%

PEG 1000 0,5%	18,1%	30,0%	22,3%	29,7%
PEG 1000 5,0%	18,3%	30,2%	22,8%	28,7%
PEG 1450 0,5%	18,0%	29,5%	22,2%	30,3%
PEG 1450 5,0%	18,8%	29,4%	22,4%	29,5%
PEG 2000 0,5%	13,3%	31,9%	22,2%	32,6%
PEG 2000 5,0%	14,6%	29,4%	22,6%	33,4%
(NH ₄) ₂ SO ₄	16,9%	31,0%	22,3%	29,7%
Na ₂ SO ₄	6,5%	28,6%	25,3%	39,6%

Os resultados acima apresentados apontam uma significativa alteração conformacional da estrutura secundária da proteína em presença do sulfato de sódio como co-solvente em concentração igual a 20mM, observando-se principalmente a conversão de sinal de hélice alfa para o aumento de estruturas randômicas, o que indica desnaturação da proteína pela adição desse co-solvente. Para os demais resultados obtidos não foi notada mudança significativa nos valores da distribuição conformacional, bem como – visualmente – nos espectros de dicroísmo circular.

5.4. Beta-lactoglobulina

No caso dessa proteína, as curvas de pressão osmótica foram obtidas em sistemas com água deionizada, em soluções de polietileno glicol 600 e 2000, e em soluções de sulfato de amônio em pH 5,30, com as concentrações poliméricas variando em 1,0% e 2,0% e salinas em 1,0% e 5,0% em massa. As Figuras a seguir apresentam os resultados obtidos.

Figura 24. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo β - lactoglobulina + PEG + água deionizada em pH = 5,3 a 298,15K. ■ - solução tamponada; ○ - PEG 600 1%;● - PEG 600 2%; △ - PEG 2000 1%; ▲ - PEG 2000 2%.

Figura 25. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo β - lactoglobulina + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + água deionizada em pH = 5,3 a 298,15K. ■ - solução tamponada; △ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%; ▲ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5%.

Verifica-se que as medidas de pressão osmótica aumentaram seus valores absolutos tanto diante o aumento cadeia polimérica, ou seja, PEG 600 para PEG 2000, quanto em relação ao acréscimo da concentração mássica do co-solvente, sendo essa última observação válida inclusive para sistemas com sulfato de amônio presente. A mesma tendência de comportamento observada nos resultados obtidos com outras proteínas.

Os valores obtidos para o segundo coeficiente virial conforme a equação (72), bem como seus desvios, encontram-se na Tabela 14 a seguir.

Tabela 14 - Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema Beta-lactoglobulina em pH 5,3 a 298,15 K.

$W_{co-solvente}$	B_2
BUFFER	-1.5 ± 0.31
PEG 600 1%	-0.69 ± 0.18
PEG 600 2%	-0.51 ± 0.13
PEG 2000 1%	0.46 ± 0.20
PEG 2000 2%	1.3 ± 0.37
$(NH_4)_2SO_4$ 1%	-0.81 ± 0.096
$(NH_4)_2SO_4$ 5%	-0.083 ± 0.060

Pela Tabela 14, observa-se o segundo coeficiente osmótico virial aumenta seu valor perante o aumento do tamanho da cadeia do polímero, fato também observado diante o acréscimo da concentração da solução de referência tanto polimérica quanto salina.

A Figura 26 mostra que os experimentos de fluorescência realizados indicam, de maneira geral, que frente à mudança no valor de pH há uma diminuição no valor absoluto do sinal de fluorescência: quanto maior o valor do pH, maior o valor no pico emissivo de fluorescência. O espectro de fluorescência para diferentes valores de pH, indica a presença de quenching em pH de valores iguais a 5,0 e 6,0, isto é, os resíduos de triptofano tornam-se mais acessíveis nesses valores que são próximos do ponto isoelétrico da proteína, 5,3. Para pH 4,0, abaixo do ponto isoelétrico, verifica-se um aumento no valor da intensidade da fluorescência.

Figura 26. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções tamponadas a 20mM acetato a 298,15K. Linha tracejada – pH = 4,0; linha contínua - pH = 5,0; linha pontilhada - pH = 6,0

Com o intuito de exemplificar, as Figuras a seguir apresentam o sistema beta-lactoglobulina em pH igual a 4,0, em que se verificou uma alteração mais significativa. No caso de baixas concentrações (0,5%), o PEG praticamente não modifica o sinal de fluorescência (com exceção do PEG 600); mesmo em maiores concentrações (10%), os gráficos obtidos sugerem que nestas condições os polímeros e nem os sais não induzem nenhuma alteração na estrutura da proteína.

Figura 27. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 28. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 29. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.

As Figuras 27, 28 e 29 indicam os espectros de emissão de β -lactoglobulina em pH 4,0. Nota-se o pico emissivo está próximo a 325 nm, valor compatível com a presença de dois triptofanos, sendo ambos ocultos. Nota-se a presença de *quenching* apenas diante a presença de PEG's a 0,5% em massa, em especial no caso de PEG 600 em que o pico emissivo diminui significativamente. Os espectros correspondentes aos pHs 5,0 e 6,0 não apresentam alteração na acessibilidade na extinção da fluorescência.

Assim como a ovalbumina, a β -lactoglobulina é uma proteína que se caracteriza pela presença de maior quantidade de folhas beta, por isso, apresenta um espectro menos curvado sem a presença de picos marcados. Pode-se afirmar de modo geral que a presença de diferentes PEG's e sais, em todos os valores de pH estudados (4,0, 5,0 e 6,0) não gera alterações estruturais significativas, sugerindo que a interação com estes solutos não induz perdas significativas do grau de estruturação conformacional proteica nestas condições.

Figura 30. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 31. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 32. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha vermelha – sulfato de sódio a 50mM; linha cinza– sulfato de amônio 50mM.

A Tabela 15 apresenta os valores obtidos da deconvolução dos espectros de dicroísmo circular do sistema contendo β - lactoglobulina.

Tabela 15 – Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo β -lactoglobulina em pH 5,0.

Co-solvente	Alfa	Beta	Giro	Desordem
Buffer	11,90%	41,70%	21,20%	26,20%
PEG 600 0,5%	10,80%	39,30%	21,40%	28,50%
(NH ₄) ₂ SO ₄	9,00%	39,60%	22,00%	29,40%
Na ₂ SO ₄	9,70%	42,10%	21,90%	30,80%

Apesar de a presença de sais visualmente indicar uma alteração significativa no espectro anterior, observa-se que quando realizada a deconvolução dos dados do sistema os valores obtidos não indicam a mudança na estrutura secundária da β -lactoglobulina.

5.5. Lisozima

Para a lisozima, foram estudadas soluções de referência de PEG 400 e 1500, 1% e 2% em massa. Estudou-se também como co-solvente o sulfato de amônio com concentrações em massa de 1% e 5%. Nesse caso os sistemas contendo a proteína foram abordados próximo ao ponto isoelétrico (pI), acima e abaixo do mesmo, 11,0, 10,5 e 11,5, respectivamente.

Figura 33. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em $\text{pH} = 10,5$ a $298,15\text{K}$. ■ - solução tamponada; ○ - PEG 400 1%; ● - PEG 400 2%; △ - PEG 1500 1%; ▲ - PEG 1500 2%.

Figura 34. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + água deionizada em pH = 10,5 a 298,15K. ■ - solução tamponada; Δ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%; ▲ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5%.

Figura 35. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em pH = 11,0 a 298,15K. ■ - solução tamponada; ○ - PEG 400 1%; ● - PEG 400 2%; ◻ - PEG 1500 1%; ▲ - PEG 1500 2%.

Figura 36. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + água deionizada em pH = 11,0 a 298,15K. ■ - solução tamponada; Δ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%; $\blacktriangle$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5%.

Figura 37. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em pH = 11,5 a 298,15K. ■ - solução tamponada; $\circ$ - PEG 400 1%; $\bullet$ - PEG 400 2%; Δ - PEG 1500 1%; $\blacktriangle$ - PEG 1500 2%.

Figura 38. Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima+ $(NH_4)_2SO_4$ + água deionizada em pH = 11,5 a 298,15K. ■ - solução tamponada; Δ - $(NH_4)_2SO_4$ 1%; ▲ - $(NH_4)_2SO_4$ 5%.

De modo geral, pode-se afirmar que em pH igual a 10,5, ou seja, abaixo do ponto isoelétrico, na presença de polímeros como co-solventes os valores de pressão osmótica obtidos são maiores do que na sua ausência, e a variação na concentração de PEG não induz uma diferença grande nos resultados, exceto para altas concentrações de PEG 400 (~30g/L). Na presença de sulfato do amônio observou-se que quanto maior a concentração de sal, maior o valor obtido para a pressão osmótica.

No caso de sistemas em pH igual ao ponto isoelétrico da proteína, verificou-se que no caso do PEG 1500 em maior concentração há um decaimento significativo nos valores auferidos. Em soluções de sulfato de amônio, o valor absoluto da pressão aumenta com o aumento da concentração salina.

Por fim, em pH 11,5, acima do ponto isoelétrico, com as moléculas proteicas negativamente carregadas, com o PEG 400 o aumento da concentração aumenta o valor da pressão, mas com o co-solvente de maior cadeia, PEG 1500, ocorre o inverso – o aumento da concentração polimérica diminui o valor da pressão osmótica obtido. Na

presença do sal, notou-se que o aumento da concentração salina ocasionou a redução no valor da pressão osmótica obtida.

As Tabelas 16, 17 e 18 a seguir apresentam os resultados obtidos dos valores do segundo coeficiente osmótico virial para os sistemas contendo lisozima em pH 10,5, 11,0 e 11,5 respectivamente.

Tabela 16- Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema lisozima a 298,15 K em pH 10,5.

$W_{co-solvente}$	B_2
BUFFER	-1.4 ± 0.2289
PEG 400 1%	-1.4 ± 0.2447
PEG 400 2%	-1.3 ± 0.2246
PEG 1500 1%	-1.4 ± 0.2299
PEG 1500 2%	-1.5 ± 0.2513
$(NH_4)_2SO_4$ 1%	-1.4 ± 0.1755
$(NH_4)_2SO_4$ 5%	-1.2 ± 0.1640

Tabela 17- Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema lisozima a 298,15 K em pH 11,0.

$W_{co-solvente}$	B_2
BUFFER	-1.4 ± 0.2325
PEG 400 1%	-1.4 ± 0.2406
PEG 400 2%	-1.3 ± 0.2161
PEG 1500 1%	-1.5 ± 0.2306
PEG 1500 2%	-1.7 ± 0.2327
$(NH_4)_2SO_4$ 1%	-1.3 ± 0.1886
$(NH_4)_2SO_4$ 5%	-1.3 ± 0.1940

Tabela 18- Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e seus respectivos desvios para o sistema lisozima a 298,15 K em pH 11,5.

$W_{co-solvente}$	B_2
BUFFER	-1.5 ± 0.2263
PEG 400 1%	-1.6 ± 0.2490
PEG 400 2%	-1.5 ± 0.2358
PEG 1500 1%	-1.4 ± 0.1943
PEG 1500 2%	-1.4 ± 0.1997
$(NH_4)_2SO_4$ 1%	-1.3 ± 0.1831
$(NH_4)_2SO_4$ 5%	-1.5 ± 0.2162

É possível observar que os valores do segundo coeficiente osmótico são muito próximos, mesmo entre diferentes valores de pH, e que a presença do co-solvente bem como a variação na sua concentração pouco alteraram os valores obtidos.

A Figura 39 a seguir apresenta os resultados obtidos dos espectros de fluorescência do sistema contendo lisozima em pH igual a 6,0 diante a presença de polímeros em concentração igual a 0,5% em massa. De modo geral, a presença de co-solventes em sistemas com lisozima, bem como a alteração no valor do pH, não causaram alteração no valor absoluto do pico emissivo de fluorescência e nem o deslocamento da curva de fluorescência. Em suma, a presença de polímeros ou sais na solução não resulta em alteração significativa na estrutura proteica.

Figura 39. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Verifica-se que o pico emissivo está próximo a 335 nm, valor compatível com a presença de seis triptofanos, sendo dois expostos parcialmente e os demais ocultos. Como dito anteriormente, sabe-se que quando existem triptofanos ocultos o pico de

emissão decai, caso contrário (todos expostos) o pico estaria entre 345-350 nm. Na Figura anterior, observa-se que não há alteração significativa no comportamento do espectro, apenas um incremento na intensidade de fluorescência indicando que a presença de co-solventes, nesse caso, polímeros, aumentam a acessibilidade ao triptofano da proteína, isto é, este comportamento pode indicar um possível abertura da molécula de lisozima.

Com o objetivo de exemplificar esse efeito, as Figuras 40, 41 e 42 a seguir apresentam os resultados dos espectros de dicroísmo em sistemas contendo lisozima em pH igual a 8,0.

Figura 40. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja-PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000

Figura 41. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja- PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 42. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.

Os espectros de dicroísmo circular, assim como os de fluorescência, também indicam que a presença de co-solventes, sejam eles sais ou polímeros, independente de sua concentração, não altera significativamente a estrutura secundária da proteína em questão. A mudança na estrutura conformacional da lisozima, é apresentada na Tabela 19 a seguir, com os valores estruturais:

Tabela 19 – Resultados obtidos da deconvolução do programa CONTINLL para os dados do sistema contendo lisozima em pH 8,0.

Co-solvente	Alfa	Beta	Giro	Desordem
Buffer	28,80%	20,70%	21,00%	29,60%
PEG 1450 5,0%	19,20%	27,80%	21,70%	31,30%
PEG 2000 5,0%	16,80%	29,10%	22,50%	31,60%
Na ₂ SO ₄	21,00%	26,70%	21,90%	30,40%

É importante também destacar, antes de afirmar algo sobre as mudanças observadas na estrutura das proteínas, é que, em geral, ainda que haja exceções, as alterações na estrutura conformacional ocorrem quando as proteínas adquirem carga líquida elevada, positiva ou negativa, que provocam repulsão e expansão. Diante das condições realizadas, principalmente do caso da lisozima, quando comparamos os resultados obtidos com as demais proteínas estudadas, nota-se a presença de alterações de hélice alfa em folhas beta, a soma de ambas não se altera significativamente, bem como a porcentagem de estrutura desordenada se mantém. Isto induz a concluir que a presença dos co-solventes não induz uma desestruturação ou perda da estrutura secundária, mas somente induz em alguns casos uma interconversão da cadeia alfa em beta, cf. Sethuraman *et al.* (2004).

Um ponto considerável a destacar é a existência de um relacionamento entre o abaixamento do valor da pressão osmótica e a capacidade de um co-solvente em ocasionar o efeito *salting-out*, ou seja, da diminuição da solubilidade da proteína, método amplamente utilizado para o isolamento e purificação destes compostos. Neste caso, a estrutura da fase rica em proteína pode depender de vários parâmetros, como,

por exemplo, a quantidade de sal adicionada, o pH e temperatura, cf. Watanabe et al. (2008). Este fato deve ser levado em conta tanto na discussão dos resultados quanto na modelagem termodinâmica.

Outro destaque é que existem estudos sobre a relação entre a solubilidade da proteína e o segundo coeficiente virial osmótico. Esta relação é totalmente baseada na termodinâmica clássica e implica a validade da equação de Cohn (Cohn, 1925), o que limita o desenvolvimento para a região de diagramas de fase, em que o aumento da concentração de sal resulta na diminuição da solubilidade da proteína. A relação entre o segundo coeficiente virial osmótico e parâmetros de interesse, tais como a solubilidade da proteína e a concentração de agentes precipitantes, pode ser desenvolvido a partir de relações termodinâmicas clássicas. O modelo resultante é válido na região de salting-out de diagramas de fase, Franco e Pessôa Filho (2012).

6. Modelagem Termodinâmica

O modelo utilizado como base para a modelagem termodinâmica deste trabalho foi o modelo de esferas rígidas adesivas (AHS), proposto por Barboy (1974), acrescido de um termo relativo à teoria da perturbação de van der Waals, (McQuarrie, 1973).

Moon et al. (2000a) também apresentaram dados de pressão osmótica com o modelo AHS. Conforme a equação (62) citada anteriormente, o potencial de interação entre moléculas proteicas no solvente específico, $W(r)$, é definido como sendo a somatória de alguns potenciais médios de força:

$$W(r) = W_{hs}(r) + W_{elec}(r) + W_{disp}(r) \quad (52)$$

Conforme Moon *et al.* (2000a), para o cálculo do potencial total, tem-se:

$$B_2 = \frac{N_A}{3M_p^2} \pi \sigma^3 \left(1 - \frac{2}{3\tau} \right) \quad (54)$$

Para o caso de interação entre esferas com o potencial AHS, uma expressão para a função de correlação é obtida com a aproximação de Percus-Yevick, tornando possível o cálculo de propriedades termodinâmicas do sistema. De acordo com Barboy (1974), para um sistema de solução proteica simples, a equação de cálculo da pressão osmótica é dada por:

$$\frac{\Pi}{kT\rho_p} = \frac{1 + \eta + \eta^2}{(1 - \eta)^3} - \eta\lambda \frac{18(2 + \eta) - \eta\lambda^2}{36(1 - \eta)^3} \quad (55)$$

em que η é o fator de empacotamento calculado por:

$$\eta = \frac{\pi \sigma^3 \rho_p}{6} \quad (56)$$

sendo ρ a densidade da proteína e λ , um número adimensional que é função do fator de empacotamento e do parâmetro de energia τ , em que:

$$\lambda = 6 - \tau + \tau\eta^{-1} - [(6 - \tau + \tau\eta^{-1})^2 - 6(1 + 2\eta^{-1})]^{1/2} \quad (57)$$

O primeiro termo do lado direito da equação (67) é o fator de compressibilidade e o segundo é devido à adesão, termo que desaparece em casos que o parâmetro $\tau \rightarrow \infty$. Logo, de acordo com os dados obtidos por Moon *et al.* (2000a), verifica-se que ao

extrapolarmos os valores de τ^{-1} , percebe-se que para força iônica baixa (como no caso dos experimentos utilizados nas soluções tampão de 50mM) esse valor é muito baixo, tendendo a zero.

Fornasiero *et al.* (1999) discute aplicações para soluções aquosas coloidais ou proteicas globulares que podem conter sais ou polímeros para a indução da precipitação, acrescentando à modelagem termodinâmica, um termo de perturbação característico da teoria molecular de van der Waals. Partindo nesse caso, da desigualdade de Gibbs-Bogoliubov, em que o limite superior da energia de Helmholtz é tomado como estimativa da energia do sistema, sistema esse referenciado por esferas rígidas, bem como todas as correlações entre as moléculas do potencial atrativo são negligenciadas, isto é, aproximação de fase randômica.

Tavares e Prausnitz (2004) também acrescentaram um termo relativo à teoria da perturbação, dado pela aproximação de van der Waals (McQuarrie, 1973), na qual se assume que a probabilidade de uma molécula central encontrar-se com outras moléculas é diretamente proporcional à densidade, independente da distância entre moléculas de proteína, que engloba diversos efeitos presentes nos sistemas, como por exemplo, a presença do co-solvente e sua respectiva quantidade, a alteração do pH entre outros. Ressalvando que, para casos de sistemas protéicos em que eletrólitos estão presentes, a contribuição da dupla camada para a interação entre proteínas não pode ser desprezada. Mesmo nas proximidades do ponto isoelétrico, as interações não eletrostáticas entre íons e partículas existem e podem ser importantes e são mensuradas nesse parâmetro de atrativo.

Com o intuito de aumentar a eficácia do desempenho do modelo AHS, o termo de perturbação de van der Waals de ordem zero será acrescido na equação (55). O que permite que se escreva:

$$\frac{\Pi}{k_B T \rho_p} = \frac{1 + \eta + \eta^2}{(1 - \eta)^3} - \eta \lambda \frac{18(2 + \eta) - \eta \lambda^2}{36(1 - \eta)^3} - a \rho_p \quad (74)$$

em que a é o parâmetro atrativo considerado (parâmetro de perturbação de ordem zero).

O modelo eleito foi implementado em MatLab. Com o intuito de exemplificar, a tabela abaixo apresenta os valores obtidos para o parâmetro a na modelagem dos dados experimentais obtidos para a BSA com PEG 2000:

Tabela 20 - Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e para o termo atrativo para o sistema BSA+ PEG 2000 + água deionizada a 298,15 K.

pH	w_{PEG}	B_2	a
4,0	0,50%	-1,1	750
	1,00%	-0,52	600
	2,00%	-3,2	1100
5,0	0,50%	-0,48	400
	1,00%	0,27	350
	2,00%	-2,4	1000
6,0	0,50%	-0,24	350
	1,00%	-2,8	900
	2,00%	-2,4	1200

Tabela 21 - Valores obtidos para o segundo coeficiente virial e para o termo atrativo para o sistema BSA+ sulfato de sódio + água deionizada a 298,15 K.

W_{sal}	B_2	a
0,00%	1,4	500
1,00%	0,21	500
5,00%	-0,16	200
10,0%	0,035	1100
15,0%	0,12	300

Na Tabela 20, nota-se que o valor do termo atrativo aumenta à medida que há a presença de maior quantidade de polímero no sistema, ou seja, 2,0%, os valores para a são os maiores. Na presença de sulfato de sódio como co-solvente a Tabela 21 permite observar que os valores do parâmetro atrativo seguem a tendência dos valores do

segundo coeficiente osmótico, ou seja, quando B_2 aumenta, a também aumenta, exceto na concentração 15,0% em massa.

A fim de comparar a eficiência do modelo proposto, calcularam-se os também os valores de pressão osmótica para o comportamento ideal:

$$\Pi_{ideal} = RT\rho_p \quad (75)$$

Bem como da equação virial:

$$\Pi_{virial} = \Pi_{ideal} + B_2 RT\rho_p^2 \quad (76)$$

Alguns resultados obtidos são apresentados nas Figuras a seguir:

Figura 43. Correlação dos modelos para o sistema composto por BSA+ PEG 2000 a 0,5 % em massa em pH 4,0 a 298,15 K. □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.

Figura 44. Correlação dos modelos para o sistema composto por BSA+ PEG 2000 a 0,5 % em massa em pH 5,0 a 298,15 K. $\square$ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.

Figura 45. Correlação dos modelos para o sistema composto por BSA+ PEG 2000 a 0,5 % em massa em pH 6,0 a 298,15 K. $\square$ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.

Figura 46. Correlação dos modelos para o sistema composto por BSA+ Na₂SO₄ a 10,0 % em massa em pH 5,0 a 298,15 K. □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.

Figura 47. Correlação dos modelos para o sistema composto por IgG humana + NaCl a 5,0 % em massa em pH 8,0 a 298,15 K. □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.

Figura 48. Comparação de modelos para correlação de Π (ovalbumina + PEG 2000 1% em pH 4,6). $\square$ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.

Figura 49. Comparação de modelos para correlação de Π (β -lactoglobulina + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% em pH 5,3). $\square$ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.

Figura 50. Comparação de modelos para correlação de Π (lisozima + PEG 400 2% em pH 11,0). □ - pontos experimentais; linhas contínuas - modelo ideal; linhas tracejadas – equação virial; linhas pontilhadas - predição do modelo proposto.

O modelo proposto neste trabalho mostrou melhor desempenho que a equação virial, bem como do modelo de comportamento ideal em todos os casos, exceto para Imunoglobulina G humana em que o modelo prediz valores de pressão osmótica muito altos para concentrações acima de 80 g.L^{-1} ($\approx$ densidade $0,6 \text{ mol.m}^{-3}$). Para os demais sistemas abordados, nota-se o modelo proposto pela equação (74) tem concordância maior que os demais modelos correlacionados, em presença de todos os co-solventes, especialmente em maiores concentrações de polímero. Deste fato, se pode concluir que, na faixa de concentrações usuais em processos de purificação, o uso de um termo de perturbação de ordem zero com o termo repulsivo de esferas adesivas pode ser suficiente para a modelagem dos dados, e que dificilmente se justificaria o uso de termos de perturbação de ordem superior para a modelagem de soluções proteicas.

7. Conclusões Finais e Recomendações para trabalhos relacionados

Com base nos resultados experimentais obtidos, na formulação e no desempenho do modelo testado, pode-se concluir que:

- Os dados de osmometria mostram, de maneira geral, que a pressão osmótica se altera diante a adição de co-solventes.
- No caso da concentração do polímero obtiveram-se dados confiáveis até 4% em massa polimérica.
- De modo geral, verificou-se que o aumento da concentração de co-solvente gera um leve decréscimo da pressão osmótica.
- Na presença de sais como co-solventes verificou-se que para concentrações salinas de até 5,0% os valores de pressão osmótica, na maioria dos sistemas abordados, aumentam conforme há o aumento da concentração do sal, para valores acima, para sistemas contendo BSA e IgG humana, nota-se uma diminuição do valor da pressão osmótica.
- Notou-se também diante os espectros de fluorescência obtidos que apesar de apresentar algumas brandas mudanças nas curvas, a presença de co-solventes não induz nenhuma alteração conformacional na estrutura secundária da proteína.
- Os espectros de dicroísmo circular mostram as proteínas mantêm a integridade estrutural, exceto para a ovalbumina em presença de sulfato de sódio.
- Na modelagem termodinâmica observou-se que o uso de um termo de perturbação de primeira ordem em conjunto com AHS foi eficaz na predição dos dados experimentais.
- Embora a modelagem termodinâmica tenha se mostrado eficaz e promissora, tal como está o modelo ainda precisa ser melhorado, a fim de que permita uma futura extensão para a efetiva modelagem de processos de purificação de bioprodutos em que esses sistemas estejam presentes.

Como sugestão para trabalhos futuros pode-se citar o estudo da modelagem do equilíbrio sólido-líquido a partir de alterações no modelo AHS, inclusive utilizando os termos de ordem superior apresentados em Tavares e Prausnitz (2004), ou até mesmo sugerir novas equações desde que as mesmas atendam às restrições necessárias, e incrementem a eficiência do modelo proposto neste trabalho, como por exemplo, no caso da Imunoglobulina G humana em que para concentrações maiores que 80g.L^{-1} a modelagem não apresentou desempenho satisfatório.

Referências Bibliográficas

AGENA, S. M., BOGLE, I. D. L., PESSOAS, F. L. P., An activity coefficient model for proteins. *Biotechnology and Bioengineering* 55 (1), PP. 65-71, 1997.

AGENA, S. M., PUSEY, M. L., BOGLE, I. D. L., Protein solubility modeling. *Biotechnology and Bioengineering* 55 (1), PP. 65-71, 1999.

AHAMED, T., OTTENS, M., NFOR, B. K., VAN DEDEM, G.W.K., VAN DER WIELEN, L.A.M., A Generalized approach to thermodynamic properties of biomolecules for use in bioseparation process design. *Fluid Phase Equilibria* 241 (1-2), pp. 268-282, 2006.

ALLAHYAROV, E.; LÖWEN, H.; LOUIS, A. A.; HANSEN, J. P., Discrete charges patterns, Coulomb correlations and interactions in protein solutions. *Europhysics. Letters.*, 57, 731-737, 2002.

AMOS, D. A., RADKE, C. J., LYNN, S. Osmotic pressure and interparticle in ionic micellar surfactant solutions. *Journal. Physical Chemistry B* ,102, 2739–2753, 1998.

ASENJO, J.A., ANDREWS, B.A., Challenges and trends in bioseparations. *Journal of Chemical Technology and biotechnology*, 83 (2), pp. 117-120, 2008.

ASTHAGIRI, D., PALIWAL, A., ABRAS, D., LENHOFF, A. M., PAULAITIS, M. E., A Consistent Experimental and Modeling Approach to Light-Scattering Studies of Protein-Protein Interactions in Solution. *Biophysical Journal*, Vol. 88, 3300–3309, 2005.

AYMARD, P., DURAND, D., NICOLAI, T., The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules* 19 213-221, 1996.

BAHR, J.M.; JOHNSON, P.A. Reproduction in poultry. In: CUPPS, P.T. (Ed.) *Reproduction in domestic animals*.4.ed. San Diego: Academic Press, 1991. p.555-575.

BALAN, A., SANTACRUZ, C. P., MOUTRAN, A., FERREIRA, R. C. C., MEDRANO, F. J., PÉREZ, C. A., RAMOS, C. H. I., FERREIRA, L. C. S., The molybdate-binding protein (ModA) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Protein Expression and Purification* 50 (2), pp. 215-222, 2006.

BARBOY, B. On a representation of the equation of state of fluids in terms of the adhesive hard-spheres model. *The Journal of Chemical Physics*, vol. 61, n°8, 3194-3196, 1974

BAXTER, R. J. Percus-Yevick Equation for Hard Spheres with Surface Adhesion. *The Journal of Chemical Physics* vol. 49, n° 15, 2770-2774, 1968.

BEHLKE, J., RISTAU, O., Analysis of the thermodynamic non-ideality of proteins by sedimentation equilibrium experiments. *Biophysical Chemistry*, 76 , 13-23, 1999.

BONNETÉ, F., FINET, S., TARDIEU, A., Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions. *Journal of Crystal Growth* 196 (2-4), pp. 403-414, 1999.

BOSTROM, M., WILLIAMS, D. R. M., NINHAM, B. W., Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems. *Physical Review Letters* 87 (16), art n°168193/1- 168193/4, 2001.

CARNAHAN, N. F., STARLING, K. E. Equation of State for Nonattracting Rigid Spheres *Journal of Chemical Physics*. 51, 635–636, 1969,

CELLMER, T., BRATKO, D., PRAUSNITZ, J. M., BLANCH, H., Thermodynamics of folding and association of lattice-model proteins. *The Journal of Chemical Physics* 122 (7), pp. 174908, 2005.

CHAHINE, N. O., CHEN, F. H., HUNG, C. T., ATESHIAN, G. A., Osmotic pressure of glycosaminoglycan solutions by membrane osmometry at room temperature. *Biophysical journal* 89, pp. 1543-1550, 2005.

CHANG, R., Principios Básicos de espectroscopia. AC Madrid España, Primera Edición, 1977.

CLELAND, J. L., POWELL, M. F., SHIRE, S. J., The development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10 (4), pp. 307-377, 1993.

CORRÊA, H. A., RAMOS, C.H.I., The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research* Vol.3 (5), pp. 164-173, 2009.

COUTINHO, J. A. P., PESSOA, F. L. P., A modified extended UNQUAC model for proteins. *Fluid Phase Equilibria* 222-223, pp. 127-133, 2004.

CURTIS, R.A., NEWMANA, J., BLANCH, H.W., PRAUSNITZ, J.M., McMillan-Mayer solution thermodynamics for a protein in a mixed solvent. *Fluid Phase Equilibria* 192, pp. 131-153, 2001.

DEKKER, M., *Fluorescence Spectroscopy: An Introduction for Biology and Medicine*, New York, 1971.

DEMORUELLE, K.; GUO, B.; KAO, S.; McDONALD, M.; NIKIC, D. B.; HOLMAN, S. C.; WILSON, W. W., Correlation between the osmotic second virial coefficient and solubility for equine serum albumin and ovalbumin. *Acta Crystallographica. D*, 58, 1544-1548, 2002.

DESZCZYNSKI, M., HARDING, S. E., WINZOR, D. J., Negative second virial coefficients as predictors of protein crystal growth: Evidence from sedimentation equilibrium studies that refutes the designation of those light scattering parameters as osmotic virial coefficients. *Biophysical Chemistry* 120 , 106 -113, 2006.

DUCRUIX, A., GUILLOTEAU, J. P., RIES-KAUTT, M., TARDIEU, A., Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis. *Journal of Crystal Growth* 168, pp. 28-39, 1996.

DURBIN, S. D., FEHER, G., Protein Crystallization. *Annual Review of Physical Chemistry* 47, pp. 171-204, 1996.

FORNASIERO, F., ULRICH, J., PRAUSNITZ, J. M., Molecular thermodynamics of precipitation. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 38 (4-6), pp. 463-475, 1999.

FOX, P. F., McSWENWEY, P. L. H., Dairy Chemistry and Biochemistry. London, Blackie Academic & Professional, 478, 1998

FRANCO, L. F. M., PESSÔA FILHO, P. A., On the relationship between the solubility of proteins and the osmotic second virial coefficient. Brazilian Journal of Chemical Engineering , Impress, 2012.

FRIEDLI, G. Interaction of deamidated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals. Thesis (PhD). The University of Surrey. Surrey, 1996.

GEORGE, A., WILSON, W. W., Predicting protein crystallization from a dilute-solution property. Acta Crystallography 50, pp. 361-365, 1994.

GUO, B., KAO, S., McDONALD, H., ASSANOV, A., COMBS, L. L., WILSON, W. W., Correlation of second virial coefficients and solubilities useful in protein crystal growth. Journal of Crystal Groth 196 (2-4), pp. 424-433, 1999.

HAAS, C.; DRENTH, J.; WILSON, W. W., Relation between the solubility of proteins in aqueous solutions and the secons virial coefficient of the solution. *Journal of Physical Chemistry. B*, 103, 2808-2811, 1999.

HAMBLING, S. G., MCALPINE, A. S., SAWYER, L., Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, 141-189, 1992.

HAMSA PRIYA, M. H., PRATT, L. R., PAULAITIS, M. E., Effect of PEG End-Group Hydrophobicity on Lysozyme Interactions in Solution Characterized by Light Scattering. Langmuir, 27, 13713–13718, 2011.

HAYNES, C. A., TAMURA, K., KORFER, H. R., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Thermodynamic properties of aqueous α -chymotrypsin solutions from membrane osmometry measurements. *The Journal Physical Chemistry* 96 (2), pp. 905-912, 1992.

HAYNES, C. A., BENITEZ, F. J., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Application of integral-equation theory to aqueous two-phase partitioning systems. *AIChE Journal* 39 (9), pp. 1539-1557, 1993.

HILL, T. L., *Introduction to Statistical Thermodynamics*. Ed. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts, 1960.

HIRSCH, R. E., LIN, M. J., NAGEL, R. L., The inhibition of hemoglobin C crystallization by hemoglobin F. *Journal of Biological Chemistry* 263 (12), pp. 5936-5939, 1988.

HITSCHERICH, C., KAPLAN, J., ALLAMAN M., WIENCEK, J., LOLL, P., Static light scattering studies of OmpF porin, implications for integral membrane protein crystallization. *Protein Science* 9, pp. 1559-1566, 2000.

JOHNSON JR, W. C., *Circular dichroism and its empirical application to biopolymers*. *Methods of Biochemical Analysis* 31, pp. 61-163, 1985.

KELLY, S. M., JESS, T. J., PRICE, N. C., How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751, pp. 119-139, 2005.

KEMPF, C.; STUCKI, M.; BOSCHETTI, N. Pathogen inactivation and removal procedures used in the production of intravenous immunoglobulins. *Biologicals*, vol. 35, p. 35-42, 2007.

KIM, S. G., BAE, Y. C., Salt-induced protein precipitation in aqueous solution: single and binary protein systems. *Macromolecular Research* 11(1), pp. 53-61, 2003.

KUEHNER, D. E., HEYER, C., RAMSCH, C., FORNEFELD, U. M., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Interactions of lysozyme in concentrated electrolyte solutions from dynamic light-scattering measurements. *Biophysical Journal* 73 (6), pp. 3211-3224, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.277, p.680-685, 1970.

LAKOWICZ, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Editorial Plenum Press. New York(1983).

LE BRUN, v., FRIESS, W., BASSARAB, S., MÜHLAU, S., GARIDEL, P., A critical evaluation of self-interaction chromatography as a predictive tool for the assessment of protein–protein interactions in protein formulation development: A case study of a therapeutic monoclonal antibody. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75, 16–25, 2010.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M., *Princípios da bioquímica*, 2ª ed., São Paulo, Sarvier, 1995.

LIMA, E. R. A., BISCAIA JR, E. C., BOSTROM, M., TAVARES, F. W., PRAUSNITZ, J. M., Osmotic second virial coefficients and phase diagrams for aqueous proteins from a much-improved Poisson-Boltzmann equation. *J. Phys. Chem.* 111, pp. 16055-16059, 2007.

LIU, W., CELLMER, T., KEERL, D., PRAUSNITZ, J. M., BLANCH, H. W., Interactions of Lysozyme in Guanidinium Chloride Solutions From Static and Dynamic Light-Scattering Measurements. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 90, 4, 482-490, 2005.

LORENTE, C., *Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa*, Universidad Nacional de La Plata, 2003.

LU, Y., CHEN, D., WANG, G., YAN, C., Study of interactions of bovine serum albumin in aqueous (NH₄)₂SO₄ solution at 25° C by osmotic pressure measurements. *Journal Chemical Engineering Data* 54, pp. 1975-1980, 2009.

McCARTY, B.W., ADAMS JR, E.T., Osmotic pressure measurements of ovalbumin and lysozyme mixtures. *Biophysical Chemistry* 28, pp. 149-159, 1987.

MADEIRA, P. P., XU, X., TEIXEIRA, J. A., MACEDO, E. A., Prediction of protein partition in polymer/salt aqueous two-phase systems using the modified Wilson model. *Biochemical Engineering Journal* 24 (2), pp. 147-155, 2005.

MADEIRA, P.P., TEIXEIRA, J.A., MACEDO, E.A., MIKHEEVA, L.M., ZASLAVSKY, B.Y., Correlations between distribution coefficients of various biomolecules in different polymer-polymer aqueous two-systems. *Fluid Phase Equilibria* 267 (2), pp. 150-157, 2008.

MARTIN, C., LENHOFF, A. M., Self-interaction chromatography of proteins on a microfluidic monolith. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 216-222, 2011.

MAZZOLA, P.G., LOPES, A.M., HASMANN, F.A., JOZALA, A.F., PENNA, T.C.V., MAGALHÃES, P.O., RANGEL-YAGUI, C.O., PESSOA JR, A., Liquid-liquid extraction of biomolecules: An overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and biotechnology*, 83 (2), pp. 143-157, 2008.

MEHTA, C. H.; WHITE, E. T.; LISTER, J. D., Correlation of Second Virial Coefficient with solubility for proteins in salt solutions, *Biotechnology Progress.*, 28 , 163-170, 2012.

MICHNIK, A., MICHALIK, K., DRZAZGA, Z., Stability of bovine serum albumin at different pH, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 80, 399-406, 2005.

MINTON, A. P., Effective hard particle model for the osmotic pressure of highly concentrated binary protein solutions. *Biophysical Journal: Biophysical Letters* 94, L57-L59, 2008.

MOLLERUP, J. M., Applied thermodynamics: A new frontier for biotechnology. *Fluid Phase Equilibria* 241 (1-2), pp. 205-215, 2006.

MOLLERUP, J. M., BREIL, M. P., On thermodynamics of the McMillan-Mayer state function. *Fluid Phase Equilibria* 276, pp. 18-23, 2009a.

MOLLERUP, J. M., BREIL, M. P., The osmotic second virial coefficient and the Gibbs-McMillan-Mayer framework. *Fluid Phase Equilibria* 286, pp. 88-94, 2009b.

MOON, Y. U., ANDERSON, C. O., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Osmotic pressures and second virial coefficients for aqueous saline solutions of lysozyme. *Fluid Phase Equilibria* 168, pp. 229-239, 2000a.

MOON, Y. U., CURTIS, R. A., ANDERSON, C. O., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Protein-protein interactions in aqueous ammonium sulfate solutions. Lysozyme and bovine serum albumin (BSA). *Journal of Solution Chemistry* 29 (8), pp. 699-717, 2000b.

MOREIRA, L. A., BOSTROM, M., NINHAM, B. W., BISCAIA, E. C., TAVARES, F. W., Hofmeister effects: why protein charge, pH titration and protein precipitation depend on the choice of background salt solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 282-283, pp. 457-463, 2006.

MUKAI, Y., IRITANI, E., MURASE, T., Fractionation characteristics of binary protein mixtures by ultrafiltration. *Separation Science and Technology* 33 (2), pp. 169-185, 1998.

NEAL, B. L., ASTHAGIRI, D., LENHOFF, A. M., Molecular origins of osmotic second virial coefficients of proteins. *Biophysical Journal* 75 (5), pp. 2469-2477, 1998.

OAKLEY, A. J., WILCE, M. C. J., Macromolecular crystallography as a tool for investigating drug, enzyme and receptor interactions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27 (3), pp. 145-151, 2000.

PALIWAL, A., ASTHAGRI, D., ABRAS, D., LENHOFF, A. M., PAULAITIS, M. E., Light-Scattering Studies of Protein Solutions: Role of Hydration in Weak Protein-Protein Interactions. *Biophysical Journal*, Vol. 89, 1564–1573, 2005.

PARK, Y., CHOI, G., Effects on pH, salt type, and ionic strength on the second virial coefficients of aqueous bovine serum albumin solution. *Korean Journal Chemical Engineering* 26 (1), pp. 193-198, 2009.

PESSÔA FILHO, P. A., MOHAMED, R. S., Thermodynamic modeling of the partitioning of biomolecules in aqueous two-phase systems using a modified Flory-Huggins equation. *Process Biochemistry* 39 (12), pp. 2075-2083, 2004.

PESSÔA FILHO, P. A., A differential approach to calculating osmotic equilibrium for multisolvent systems. *Thermochimica Acta*, 450, 22-34, 2006.

POKAROWSKI, P., DROSTE, K., KOLINSKI, A., A minimal proteilike lattice model: an alpha-helix motif. *The Journal of Chemical Physics* 122 (21), pp. 214915, 2005.

PORSCHER, H. V., DAMSCHUN, G., Determination of virial coefficients of protein solutions by means of X-ray small-angle scattering and interpretations. *Stud. Biophysical* 62-69, 1977.

PRAUSNITZ, J. M., Molecular thermodynamics for some applications in biotechnology. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 35 , 21-39, 2003.

PUSEY, M. L., A Model for Tetragonal Lysozyme Crystal Nucleation and Growth. *Crystal Growth & Design*, Vol. 2, No. 6, 475-483, 2002.

QASBA, P. K., PRADMAN, K., Molecular Divergence of Lysozymes and α -Lactalbumin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 32, Vol.4, 255-306, 1997.

RAMOS, C. H. I., A spectroscopic-based laboratory course for protein conformational studies. *Biochemical and molecular Biology. Education* .32, pp. 31-34, 2004.

RECEVEUR, V., DURAND, D., DESMADRIL, M., CALMETTES, P., Repulsive interparticle interactions in a denatured protein solution revealed by small angle neutron scattering. *FEBS Letters* 426 (1), pp. 57-61, 1998.

RÉGIS, W. C. B., FATTORI, J., SANTORO, M. M., JAMIM, M., RAMOS, C. H. I., On difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 436 (1), pp. 168-177, 2005.

RESCIC, J., VLACHY, V., JAMMIK, A., GLATTER, O., Osmotic pressure, small-angle, and dynamic light scattering studies of human serum albumin in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 239, pp. 49-57, 2001.

RITO PALOMARES, M., Bioseparation: The limiting step in bioprocess development. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83 (2), pp. 115-116, 2008.

ROSEBAUM, D.F., ZUKOSKI, C.F., Protein interactions and crystallization. *Journal of Crystal Growth* 169, 752-758, 1996.

RUPPERT, S.; SANDLER, S. I.; LENHOFF, A. M., Correlation between the osmotic second virial coefficient and the solubility of proteins. *Biotechnology Progress*, 17, 182-187, 2001

SADOWSKI, G., Editorial. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 47 (6), pp. 979, 2008.

SCATCHARD, G. Physical Chemistry of Protein Solutions. I. Derivation of the Equations for the Osmotic Pressure. *Journal of the American Chemical Society*, 68, vol. 11, 2315-2319, 1946.

SCHAIK, H. M., SMIT, J. A. M., Determination of the osmotic second virial and the dimerization of β -lactoglobulin in aqueous solutions with added salt at the isoelectric point. *Physical Chemistry*, 2, pp. 1537-1541, 2000.

SCHAIK, H. M., SMIT, J. A. M., Protein-polysaccharide interactions: The determination of the osmotic second virial coefficients in aqueous solutions of β -lactoglobulin and dextran. *Food Hydrocolloids*, 21, pp. 1389-1396, 2007.

SEAR, R. P., Phase behavior of a simple model of globular proteins. *Journal Chemical Physics* 111 (10), pp. 4800-4806, 1999.

SETHURAMAN, A., VEDANTHAM, G., IMOTO, T., PRZYBYCIEN, T., BELFORT, G., Protein unfolding at interfaces: slow dynamics of alpha-helix to beta-sheet transition. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 56, 669 – 678, 2004.

SGARBIERI, V. C., Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. Brazilian Journal of food technology, Vol. 8, n. 1, 43-56, 2005.

SHIBUKAWA, M., ICHIKAWA, R., BABA, T., SAKAMOTO, R., SAITO, S., OGUMA, K., Separation selectivity of aqueous polyethylene glycol- based separation systems: DSC, LC and aqueous two-phase extraction studies. Polymer 49 (19), pp. 4168-4173, 2008.

SREERAMA, N., WOODY, R. W., Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. Analytical Biochemistry. 287, 252-260, 2000.

TARDIEU, A., BONNETÉ, F., FINET, S., VIVARÉS, D. Understanding salt or PEG induced attractive interactions to crystallize biological macromolecules, Acta Crystallography, D 58, 1549-1553, 2002.

TAVARES, F. W., PRAUSNITZ, J. M., Analytic calculation of phase diagrams for solutions containing colloids or globular proteins. Colloid and Polymer Science 282 (6), pp. 620-632, 2004.

TESSIER, P. M., LENHOFF, A. M., SANDLER, S. I., Rapid measurement of protein osmotic second virial coefficients by self-interaction chromatography. Biophysical Journal 82, pp. 1620-1631, 2002.

TODOROVA-BALVAY, D., PITIOT, O., BOURHIM, M., SRIKRISHNAN, T., VIJAYALAKSHMI, M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. Journal of Chromatography B, Vol. 808, 57-62, 2004.

VAN NESS, H. C., ABBOTT, M. M., Classical Thermodynamics of Nonelectrolyte Solutions. McGraw-Hill, New York, 1982.

VELEV, O. D., KALER, E. W., LENHOFF, A. M., Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: Comparison of lysozyme and chymotrypsinogen. Biophysical Journal 75 (6), pp. 2682-2697, 1998.

VILKER, V. L., COLTON, C. K., SMITH, K. A. The Osmotic Pressure of Concentrated Protein Solutions: Effect of Concentration and pH in Saline Solutions of Bovine Serum Albumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 79, n° 2, 548-566, 1980.

VLACHY, V., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M. Liquid-liquid phase separations in aqueous solutions of globular proteins. *AIChE Journal*, 39, 215–223, 1993.

VERWEY, E. J. W., OBERBEEK, J. T. G. Theory of Stability of Lyophobic Colloids. Elsevier, Amsterdam, 1948.

VON SOLMS, N., ANDERSON, C. O., BLANCH, H. W., PRAUSNITZ, J. M., Molecular thermodynamics for fluid-phase equilibria in aqueous two-protein systems. *AIChE Journal* 48 (6), pp. 1292-1300, 2002.

YOUSEF, M. A., DATTA, R., RODGERS, V. G. J., Model of osmotic pressure for high concentrated binary protein solutions. *AIChE Journal* vol. 48 (4), pp. 913-917, 2002.

WANG, L., BLOOMFIELD, V. A., Osmotic pressure of semidilute solutions of flexible, globular, and stiff-chain polyelectrolytes with added salt. *Macromolecules* 23 (1), pp. 194-199, 1990.

WANG, L., BLOOMFIELD, V. A., Osmotic pressure of polyelectrolytes without added salt. *Macromolecules* 23 (3), pp. 804-809, 1990.

WANG, W.. Instability, stabilization and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal Pharmaceutics*, 185, 129-188, 1999.

WATANABE, E. P., DESCZCZYNSKI, M., HARDING, S. E., WILLS, P. R., Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: Effect of salt concentration and pH. *Chemical Engineering and Processing* 47, 1026–1033, 2008.

WEST., A. P., BJORKMAN, P., J., Crystal Structure and Immunoglobulin G Binding Properties of the Human Major Histocompatibility Complex-Related Fc Receptor, *Biochemistry*, 39, 9698-9708, 2000.

WINZOR, D. J., DESZCZYNSKI, M., HARDING, S. E., WILLS, P. R., Nonequivalence of second virial coefficients from sedimentation equilibrium and static light scattering studies of protein solutions. *Biophysical Chemistry*, 128, 46-55, 2007.

WOODY, R. W., Circular dichroism. *Methods in Enzymology* 246, pp. 34-71, 1995.

WOODY, R. W., Theory of circular dichroism of proteins. In Fasman GD (ed) circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Plenum Press Publisher, New York, 1996.

WU, J., PRAUSNITZ, J. M., Osmotic pressures of aqueous bovine serum albumin solutions at high ionic strength. *Fluid Phase Equilibria* 155, pp. 139-154, 2000.

ZALAR, P., TOMSIC, M., JAMMIK, A., RESCIC, J., Osmometry and small-angle X-ray scattering of human serum albumin in buffer solutions. *Acta Chim. Slov.* 53, pp. 344-349, 2006.

ZHANG, W. Z., AUGUSTEYN, R. C., On the interaction of α -crystallin with membranes. *Current Eye Research*, 13 (3), pp. 225-230, 1994.

ZHANG, Y., CREMER, P. S., Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (6), pp. 658-663, 2006.

ZIELENKIEWICZ, W. SWIERZEWSKI, R., ATTANASIO, F., RIALDI, G. Thermochemical, volumetric and spectroscopy properties of lysozyme - poly (ethylene) glycol systems. *Journal of Thermal Analysis and Calometry*, v. 83, n°3, 587-595, 2006.

APÊNDICE A - Tabelas de resultados de pressão osmótica obtidos.

Tabela 1 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo BSA + PEG 2000 + água deionizada em pH = 4,0 a 298,15K.

w_{PEG}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
0,50%	7,034	1,87	0,15275
	12,505	3,00	0,00000
	17,385	4,23	0,05774
	23,139	5,53	0,11547
	28,368	7,23	0,05774
	34,756	8,67	0,05774
1,00%	7,617	2,13	0,05774
	13,202	3,40	0,00000
	18,533	4,93	0,15275
	24,442	6,47	0,20817
	30,137	7,47	0,20817
	36,721	9,67	0,05774
2,00%	7,203	1,20	0,10000
	12,938	1,87	0,11547
	17,807	2,83	0,05774
	23,500	4,33	0,05774
	29,319	5,57	0,15275
	35,530	6,97	0,05774
4,00%	6,370	0,10	0,00000
	11,444	1,20	0,10000
	15,876	1,93	0,11547
	20,137	2,43	0,11547
	26,046	3,20	0,07071
	31,713	3,90	0,10000
6,00%	6,994	0,00	0,15275
	12,277	0,07	0,05774
	17,268	1,83	0,20817
	22,578	2,53	0,15275
	28,112	3,07	0,15275
	34,263	4,27	0,25166

Tabela 2 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo BSA + PEG 2000 + água deionizada em pH = 5,0 a 298,15K.

w_{PEG}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
0,50%	7,754	2,33	0,05774
	13,842	3,70	0,00000
	19,222	5,20	0,17321
	25,098	7,13	0,11547
	31,242	9,00	0,00000
	38,007	11,57	0,15275
1,00%	7,827	2,40	0,15275
	14,145	4,33	0,05774
	19,655	5,53	0,05774
	25,632	7,27	0,25166
	31,793	9,27	0,05774
	38,558	11,27	0,05774
2,00%	6,571	1,47	0,05774
	11,559	2,27	0,05774
	16,084	3,13	0,11547
	21,519	4,23	0,11547
	26,632	5,27	0,11547
	32,161	7,03	0,11547
4,00%	7,651	5,47	0,20817
	13,476	7,53	0,05774
	18,722	8,87	0,20817
	24,721	9,83	0,15275
	30,457	10,77	0,20817
	37,286	13,17	0,20817
6,00%	7,801	0,07	0,05774
	13,958	1,53	0,20817
	19,344	3,07	0,15275
	25,176	5,37	0,11547
	31,541	6,17	0,05774
	38,342	7,93	0,49329

Tabela 3 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo BSA + PEG 2000 + água deionizada em pH = 6,0 a 298,15K.

w_{PEG}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	Σ
0,50%	7,530	2,30	0,00000
	13,612	3,83	0,15275
	19,261	5,30	0,17321
	23,779	6,87	0,05774
	32,637	9,83	0,15275
	37,613	11,73	0,11547
1,00%	7,905	1,07	0,11547
	13,882	2,07	0,15275
	19,396	3,97	0,75056
	25,713	5,57	0,15275
	31,373	7,50	0,17321
	38,324	9,93	0,11547
2,00%	8,039	1,33	0,05774
	14,229	2,37	0,15275
	19,822	3,73	0,15275
	25,871	4,80	0,10000
	32,002	6,63	0,11547
	39,134	7,87	0,11547
4,00%	7,222	2,83	0,11547
	13,046	4,80	0,15275
	17,838	6,73	0,05774
	23,408	10,63	0,05774
	29,032	13,87	0,05774
	35,238	17,10	0,10000
6,00%	7,409	1,07	0,05774
	13,244	1,87	0,05774
	18,150	3,23	0,05774
	23,357	4,63	0,05774
	29,634	5,50	0,00000
	36,258	7,20	0,10000

Tabela 4 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo BSA + Na₂SO₄ + água deionizada em pH = 5,0 a 298,15K.

w _{sal}	C _p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
0,00%	6,983	2,77	0,05774
	12,485	3,77	0,25166
	16,877	4,67	0,15275
	23,914	6,03	0,05774
	29,480	7,13	0,15275
	35,633	9,17	0,15275
1,00%	7,152	3,03	0,05774
	11,557	4,43	0,25166
	15,782	5,17	0,15275
	23,513	6,57	0,05774
	28,946	7,53	0,25166
	34,764	9,73	0,05774
5,00%	7,467	3,77	0,15275
	11,674	5,07	0,11547
	17,679	5,87	0,05774
	24,093	7,30	0,30000
	29,332	8,47	0,45092
	35,558	11,23	0,25166
10,00%	7,100	1,40	0,10000
	12,099	2,87	0,05774
	18,159	3,53	0,45092
	23,715	4,27	0,25166
	29,419	6,57	0,25166
	35,508	8,33	0,15275
15,00%	7,779	1,20	0,20000
	12,102	2,07	0,05774
	18,359	2,63	0,05774
	24,027	3,57	0,20817
	29,534	4,13	0,15275
	35,512	7,23	0,25166

Tabela 5 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 6,0 a 298,15K.

w_{sal}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
0,90%	16,464	1,77	0,05774
	32,968	3,40	0,10000
	49,618	5,30	0,00000
	65,992	7,40	0,00000
	82,508	9,60	0,00000
	98,841	12,30	0,10000
	115,42	14,97	0,05774
	131,48	17,47	0,15275
	148,05	20,23	0,55076
5,00%	16,804	2,10	0,10000
	33,047	3,87	0,05774
	49,475	5,77	0,05774
	66,062	8,07	0,11547
	82,451	10,50	0,00000
	98,694	12,47	0,05774
	114,56	15,27	0,05774
	131,68	18,70	0,00000
10,00%	16,499	1,50	0,00000
	32,979	3,20	0,00000
	49,456	5,07	0,05774
	65,829	6,73	0,05774
	82,319	8,93	0,15275
	102,50	11,40	0,10000

Tabela 6 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 7,0 a 298,15K .

w_{sal}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
0,90%	9,6761	1,20	0,10000
	17,579	1,63	0,11547
	33,505	2,90	0,00000
	55,111	5,07	0,05774
	65,906	6,23	0,11547
	82,398	7,63	0,11547
	99,569	9,37	0,05774
	115,32	11,17	0,05774
	131,85	12,90	0,00000
	148,86	14,90	0,10000
	165,09	16,67	0,05774
2,00%	16,467	1,47	0,11547
	32,025	3,07	0,05774
	49,571	4,73	0,05774
	65,982	6,37	0,05774
	82,519	8,13	0,05774
	98,929	10,17	0,96299
	115,47	12,00	0,10000
	131,65	14,73	0,15275
	148,15	17,80	0,10000
	155,26	18,93	0,05774
3,00%	16,474	1,53	0,05774
	32,865	2,90	0,17321
	49,385	4,13	0,11547
	66,048	6,80	0,20000
	78,634	8,37	0,15275
	99,214	10,63	0,05774
	115,06	12,90	0,10000
	132,08	15,63	0,15275
	145,62	18,07	0,11547
5,00%	16,464	1,57	0,28868
	32,854	3,00	0,00000
	49,751	4,77	0,05774
	65,993	6,60	0,00000
	82,491	8,50	0,00000
	99,180	10,57	0,05774

	115,40	12,93	0,11547
	129,00	14,90	0,00000
10,00%	33,026	2,83	0,05774
	49,520	4,30	0,00000
	66,189	5,80	0,00000
	82,357	7,50	0,00000
	98,628	9,33	0,20817
15,00%	16,596	1,73	0,11547
	33,309	2,73	0,11547
	49,653	3,77	0,15275
	66,017	5,33	0,05774

Tabela 7 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo IgG humana + cloreto de sódio + água deionizada em pH = 8,0 a 298,15K.

w_{sal}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
0,90%	16,622	1,67	0,05774
	32,970	3,37	0,05774
	49,591	5,00	0,00000
	65,905	7,00	0,00000
	82,541	9,03	0,05774
	98,789	11,27	0,05774
	115,46	13,57	0,15275
	131,93	16,17	0,28868
	148,54	18,80	0,10000
5,00%	16,511	2,03	0,11547
	33,049	4,06	0,05774
	49,521	5,73	0,05774
	66,005	7,57	0,11547
	82,190	9,90	0,17321
	102,26	12,77	0,11547
	115,37	14,27	0,05774
	131,66	17,17	0,11547
10,00%	16,432	1,83	0,05774
	32,977	2,73	0,05774
	49,414	4,10	0,10000
	65,960	5,57	0,05774
	82,483	7,47	0,05774
	102,51	9,77	0,11547

Tabela 8 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo ovalbumina + PEG + água deionizada em pH = 4,6 a 298,15K.

w_{PEG}	$C_p \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	$\Pi \text{ (mmHg)}$	σ
PEG 400			
1,00%	7,872	1,77	0,05774
	13,468	2,93	0,15275
	18,488	4,37	0,05774
	24,630	5,40	0,10000
	30,700	7,70	0,10000
	37,048	10,80	0,20000
2,00%	7,100	1,17	0,05774
	12,912	2,73	0,25166
	17,841	3,83	0,15275
	23,611	5,57	0,25166
	29,913	7,87	0,05774
	35,755	12,37	0,35119
PEG 600			
1,00%	7,634	1,57	0,15275
	12,260	2,67	0,15275
	18,565	3,93	0,25166
	24,782	5,00	0,20000
	30,657	7,27	0,20817
	34,813	10,33	0,05774
2,00%	7,097	1,13	0,15275
	11,904	2,27	0,25166
	17,986	3,53	0,25166
	23,727	4,93	0,05774
	29,962	7,27	0,25166
	35,023	11,10	0,17321
PEG 1000			
1,00%	7,404	1,47	0,15275
	13,107	2,03	0,15275
	18,380	2,83	0,11547
	24,375	3,83	0,15275
	30,128	5,47	0,15275
	36,320	7,87	0,15275
2,00%	7,381	1,27	0,15275
	13,409	2,13	0,15275

	18,448	2,87	0,15275
	24,265	3,73	0,05774
	29,905	4,83	0,15275
	36,153	5,97	0,15275
	PEG 2000		
1,00%	7,267	3,47	0,05774
	12,184	6,27	0,25166
	18,085	9,17	0,15275
	24,285	12,9	0,25166
	29,737	15,5	0,45092
	34,396	19,2	0,15275
2,00%	7,381	3,17	0,15275
	13,409	4,83	0,15275
	18,448	9,47	0,05774
	24,265	13,93	0,05774
	29,905	18,47	0,25166
	33,290	23,53	0,25166

Tabela 9 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo ovalbumina + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + água deionizada em pH = 4,6 a 298,15K.

w_{sal}	$C_p (\text{g.L}^{-1})$	$\Pi (\text{mmHg})$	σ
0,00%	7,231	1,57	0,25166
	12,781	3,83	0,15275
	17,443	5,63	0,05774
	23,407	7,03	0,15275
	29,686	9,70	0,20000
	35,128	12,57	0,15275
1,00%	7,299	1,97	0,15275
	11,847	3,13	0,15275
	17,803	5,43	0,05774
	23,782	7,87	0,15275
	29,619	10,33	0,35119
	35,138	13,50	0,30000
5,00%	7,331	3,37	0,05774
	11,710	5,77	0,25166
	16,739	7,10	0,00000
	21,850	10,63	0,35119
	28,815	13,07	0,11547
	34,663	17,17	0,30551

Tabela 10 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo Beta-lactoglobulina + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + água deionizada em pH = 5,3 a 298,15K.

w_{sal}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
0,00%	6,303	2,83	0,05774
	11,269	6,30	0,00000
	16,891	10,93	0,05774
	22,568	15,67	0,11547
	27,820	18,90	0,05774
	33,676	22,63	0,15275
1,00%	6,894	4,87	0,05774
	11,784	8,60	0,10000
	16,521	9,47	0,05774
	22,471	10,90	0,10000
	27,724	14,83	0,05774
	33,814	21,03	0,15275
5,00%	6,727	6,80	0,00000
	11,021	10,67	0,05774
	16,521	13,83	0,15275
	21,704	15,77	0,11547
	28,040	16,63	0,05774
	33,699	23,60	0,10000

Tabela 11 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo Beta-lactoglobulina + PEG + água deionizada em pH = 5,3 a 298,15K.

w_{PEG}	$C_p (\text{g.L}^{-1})$	$\Pi (\text{mmHg})$	σ
PEG 600			
1,00%	6,923	4,87	0,05774
	11,420	9,80	0,10000
	17,211	13,27	0,05774
	22,404	17,67	0,11547
	28,384	19,87	0,15275
	33,865	25,13	0,05774
2,00%	6,599	5,27	0,11547
	11,546	10,60	0,20000
	17,162	14,80	0,10000
	22,801	19,00	0,00000
	28,460	23,67	0,11547
	33,755	29,77	0,15275
PEG 2000			
1,00%	6,921	9,03	0,05774
	11,316	12,10	0,05774
	17,361	20,57	0,11547
	22,605	26,90	0,10000
	28,606	32,17	0,15275
	33,861	41,33	0,05774
2,00%	6,966	11,53	0,05774
	11,692	14,60	0,00000
	17,091	24,23	0,15275
	22,716	28,30	0,11547
	28,422	33,77	0,05774
	34,031	42,07	0,11547

Tabela 12 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + água deionizada em diferentes valores de pH a 298,15K.

w_{sal}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
pH 10,5			
0,00%	6,751	2,47	0,05774
	11,512	5,00	0,05774
	17,075	6,53	0,11547
	20,941	7,00	0,10000
	26,222	8,30	0,00000
	34,204	10,13	0,15275
1,00%	7,041	2,73	0,05774
	11,993	3,67	0,11547
	18,017	5,20	0,10000
	24,110	7,33	0,05774
	29,340	9,73	0,05774
	35,075	11,13	0,15275
5,00%	7,031	3,30	0,10000
	11,862	5,07	0,05774
	17,891	7,00	0,00000
	23,876	9,90	0,20000
	29,683	12,57	0,05774
	35,125	14,93	0,11547
pH 11,0			
0,00%	7,164	2,17	0,15275
	12,341	4,67	0,11547
	17,630	6,67	0,20817
	23,389	8,53	0,05774
	27,035	10,07	0,20817
	35,134	14,47	0,11547
1,00%	7,430	2,80	0,10000
	12,171	4,80	0,10000
	18,288	6,43	0,28868
	22,080	7,83	0,05774
	29,972	9,20	0,00000
	35,494	10,87	0,20817

5,00%	7,140	2,87	0,11547
	12,134	5,33	0,11547
	18,107	7,50	0,10000
	23,417	9,20	0,20000
	29,761	12,87	0,15275
	35,389	15,93	0,05774
	pH 11,5		
0,00%	7,359	1,83	0,05774
	11,267	3,83	0,11547
	16,702	5,67	0,11547
	23,016	7,83	0,15275
	28,540	9,63	0,05774
	34,097	12,27	0,05774
1,00%	7,259	2,83	0,15275
	11,787	4,50	0,10000
	17,898	6,00	0,00000
	22,513	8,20	0,10000
	29,530	10,33	0,05774
	35,538	12,83	0,15275
5,00%	7,174	2,03	0,05774
	11,982	3,23	0,15275
	18,012	4,70	0,10000
	22,548	6,17	0,20817
	29,371	7,20	0,00000
	35,392	8,10	0,17321

Tabela 13 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em pH 10,5 a 298,15K.

w_{PEG}	$C_p \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	$\Pi \text{ (mmHg)}$	σ
PEG 400			
1,00%	6,850	2,37	0,05774
	10,851	5,40	0,17321
	16,094	8,47	0,11547
	23,659	13,90	0,10000
	27,497	18,17	0,11547
	35,167	24,53	0,20817
2,00%	7,036	2,80	0,10000
	12,529	5,77	0,05774
	17,901	9,43	0,11547
	24,035	13,03	0,05774
	29,845	17,00	0,00000
	35,306	19,20	0,17321
PEG 1500			
1,00%	7,307	2,20	0,00000
	11,170	4,57	0,05774
	17,392	7,80	0,20000
	22,817	9,47	0,15275
	28,185	11,60	0,10000
	33,910	13,70	0,05774
2,00%	7,126	2,03	0,05774
	11,741	4,90	0,10000
	17,530	7,00	0,10000
	23,757	8,97	0,05774
	27,323	11,10	0,20000
	35,176	12,97	0,17321

Tabela 14 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em pH 11,0 a 298,15K.

w_{PEG}	$C_p \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	$\Pi \text{ (mmHg)}$	σ
PEG 400			
1,00%	6,853	2,33	0,11547
	11,642	5,73	0,05774
	17,962	7,60	0,20000
	23,210	9,30	0,00000
	27,844	13,40	0,10000
	34,548	21,50	0,15275
2,00%	6,370	2,90	0,17321
	11,342	5,90	0,10000
	16,661	8,33	0,11547
	21,331	9,90	0,00000
	28,928	14,07	0,05774
	33,520	22,93	0,25166
PEG 1500			
1,00%	7,182	2,20	0,10000
	12,440	4,93	0,05774
	17,581	7,30	0,00000
	22,948	9,83	0,11547
	28,953	13,20	0,05774
	34,361	19,77	0,11547
2,00%	6,797	1,43	0,11547
	10,940	2,30	0,00000
	17,868	3,17	0,11547
	21,877	4,00	0,05774
	27,616	5,70	0,20000
	34,646	11,27	0,05774

Tabela 15 – Dados obtidos de pressão osmótica para o sistema contendo lisozima + PEG + água deionizada em pH 11,5 a 298,15K.

w_{PEG}	C_p (g.L ⁻¹)	Π (mmHg)	σ
PEG 400			
1,00%	7,088	1,50	0,05774
	11,676	3,63	0,05774
	16,932	5,00	0,10000
	22,864	6,13	0,05774
	28,359	7,90	0,10000
	34,111	11,37	0,11547
2,00%	6,957	2,20	0,10000
	11,401	4,33	0,05774
	17,217	7,43	0,05774
	23,071	10,27	0,11547
	28,451	12,13	0,05774
	34,350	14,80	0,20000
PEG 1500			
1,00%	6,776	2,77	0,00000
	11,285	4,23	0,05774
	16,970	7,60	0,11547
	22,511	8,83	0,05774
	28,068	11,67	0,15275
	33,817	15,93	0,11547
2,00%	7,009	2,53	0,05774
	11,189	3,87	0,00000
	16,911	6,73	0,05774
	22,692	8,07	0,11547
	28,556	10,90	0,10000
	34,264	14,33	0,17321

APÊNDICE B - Espectros de fluorescência e dicroísmo circular obtidos

Figura 1. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo BSA em soluções tamponadas a 20mM acetato a 298,15K. Linha tracejada – pH = 4,0; linha contínua - pH =5,0; linha pontilhada - pH = 6,0

Figura 2. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 3. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 4. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha tracejada – Na_2SO_4 10%.

Figura 5. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 6. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 7. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.

Figura 8. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 9. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja – PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 10. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.

Figura 11. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo IgG humana em soluções tamponadas a 50mM fosfato a 298,15K. Linha contínua - pH =6,0; linha tracejada - pH=7,0; linha pontilhada - pH = 8,0

Figura 12. Espectro de fluorescência para o sistema contendo IgG humana em soluções de NaCl 50mM. Linha preta – buffer pH = 6,0; linha vermelha contínua – NaCl 50 mM –; linha vermelha tracejada – NaCl a 10% a 298,15K.

Figura 13. Espectro de fluorescência para o sistema contendo IgG humana em soluções de NaCl 50mM. Linha preta – buffer pH = 7,0; linha vermelha contínua – NaCl 50 mM –; linha vermelha tracejada – NaCl a 10% a 298,15K.

Figura 14. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo ovalbumina em soluções tamponadas a 20mM acetato a 298,15K. Linha tracejada – pH = 4,0; linha contínua - pH =5,0; linha pontilhada - pH = 6,0

Figura 15. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 16. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 17. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.

Figura 18. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 19. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 20. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha cinza contínua - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua - Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua - Na_2SO_4 10%.

Figura 21. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 22. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 23. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha cinza contínua – (NH₄)₂SO₄ 50mM; linha cinza tracejada – (NH₄)₂SO₄ 10%; linha vermelha contínua – Na₂SO₄ 20mM; linha vermelha contínua – Na₂SO₄ 10%.

Figura 24. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções tamponadas a 20mM acetato a 298,15K. Linha tracejada – pH = 4,0; linha contínua - pH =5,0; linha pontilhada - pH = 6,0

Figura 25. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 26. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 27. Espectro de fluorescência em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.

Figura 28. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 29. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 30. Espectro de fluorescência em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha cinza contínua - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua - Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua - Na_2SO_4 10%.

Figura 31. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 32. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 33. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo β -lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.

Figura 34. Espectro de fluorescência pra diferentes valores de pH para o sistema contendo lisozima em soluções tamponadas a 20mM fosfato a 298,15K. Linha tracejada – pH = 6,0; linha contínua - pH = 7,0; linha pontilhada - pH = 8,0.

Figura 35. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 36. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 37. Espectro de fluorescência em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha a contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.

Figura 38. Espectro de fluorescência em pH 7,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 7,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 39. Espectro de fluorescência em pH 7,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 7,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 40. Espectro de fluorescência em pH 7,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 7,0; linha cinza contínua - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua - Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua - Na_2SO_4 10%.

Figura 41. Espectro de fluorescência em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 42. Espectro de fluorescência em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 10% em massa. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha laranja - PEG 1000; linha azul - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 43. Espectro de fluorescência em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha cinza contínua – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM; linha cinza tracejada – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10%; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 20mM; linha vermelha contínua – Na_2SO_4 10%.

Figura 44. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja- PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 45. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 46. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.

Figura 47. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 48. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 49. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza– sulfato de amônio 50mM.

Figura 50. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 51. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 52. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo BSA em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza– sulfato de amônio 50mM.

Figura 53. Espectro de dicroísmo circular a 298,15K para o sistema contendo IgG humana em soluções de NaCl 50mM. Linha preta - pH = 6,0; linha vermelha - pH = 7,0; linha azul - pH = 8,0; linhas contínuas - solução tamponada; linha tracejadas - solução salina.

Figura 54. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 55. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 56. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza– sulfato de amônio 50mM.

Figura 57. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 58. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 59. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.

Figura 60. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 61. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 62. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo ovalbumina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza– sulfato de amônio 50mM.

Figura 63. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 64. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 65. Espectro de dicroísmo circular em pH 4,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 4,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.

Figura 66. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 67. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 68. Espectro de dicroísmo circular em pH 5,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 5,0; linha vermelha - sulfato de sódio 50mM; linha cinza - sulfato de amônio 50mM.

Figura 69. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 70. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 71. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo β -Lactoglobulina em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza– sulfato de amônio 50mM.

Figura 72. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 73. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 74. Espectro de dicroísmo circular em pH 6,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 6,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.

Figura 75. Espectro de dicroísmo circular em pH 7,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 7,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 76. Espectro de dicroísmo circular em pH 7,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 7,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 77. Espectro de dicroísmo circular em pH 7,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 7,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza – sulfato de amônio 50mM.

Figura 78. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 0,5% em massa. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 79. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções de PEG de diferentes tamanhos a 5,0% em massa. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha amarela - PEG 400; linha verde - PEG 600; linha azul - PEG 1000; linha laranja - PEG 1450 e linha rosa - PEG 2000.

Figura 80. Espectro de dicroísmo circular em pH 8,0 a 298,15K para o sistema contendo lisozima em soluções salinas. Linha preta - buffer pH = 8,0; linha vermelha – sulfato de sódio 50mM; linha cinza– sulfato de amônio 50mM.

APÊNDICE C - Dados da literatura de determinação do segundo coeficiente osmótico virial

Tabela 1– Dados da literatura de determinação do segundo coeficiente osmótico virial de soluções proteicas.

Autores	Técnica utilizada	Proteína	Co-solvente
Demoruelle <i>et al.</i> (2002)	Espalhamento de luz e solubilidade do sistema	Albumina sérica equina e ovalbumina	(NH ₄) ₂ SO ₄
Rosenbaum e Zukoski (1996)	Solubilidade do sistema	Lisozima	Ausente
Mehta <i>et al.</i> (2012)	Solubilidade do sistema	Ovalbumina, lisozima e α-amilase	NaCl
Liu <i>et al.</i> (2005)	Espalhamento de luz	Lisozima	GdnHCl
Aymard <i>et al.</i> (1996)	Espalhamento de luz	β-lactoglobulina	CH ₃ COONH ₄
Hamsa Priya <i>et al.</i> (2001)	Espalhamento de luz	Lisozima	PEG 1000 e NaCl
Deszczunski <i>et al.</i> (2006)	Equilíbrio de sedimentação	Albumina sérica equina e lisozima	(NH ₄) ₂ SO ₄
Winzor <i>et al.</i> (2007)	Equilíbrio de sedimentação	Ovalbumina	NaCl e C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Belke e Ristau (1999)	Equilíbrio de sedimentação	Lisozima e ovalbumina	NaCl
Martin e Lenhoff (2011)	Cromatografia de auto-interação	Catalase	(NH ₄) ₂ SO ₄
Le Brun <i>et al.</i> (2010)	Cromatografia de auto-interação e espalhamento de luz	Imunoglobulina G humana	NaCl

Autores	Técnica utilizada	Proteína	Co-solvente
Rescic <i>et al.</i> (2001)	Osmometria de membrana	Albumina sérica humana	K ₂ HPO ₄ e KH ₂ PO ₄
Zalar <i>et al.</i> (2006)	Osmometria de membrana e espalhamento de luz	Albumina sérica humana	NaCl, K ₂ HPO ₄ e KH ₂ PO ₄
Schaink e Smit (2000)	Osmometria de membrana	β-lactoglobulina	NaCl
Moon <i>et al.</i> (2000a)	Osmometria de membrana	Lisozima	(NH ₄) ₂ SO ₄
Moon <i>et al.</i> (2000b)	Osmometria de membrana	Albumina sérica humana e lisozima	(NH ₄) ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ e (NH ₄) ₃ PO ₄
Wu e Prausnitz (1999)	Osmometria de membrana	Albumina sérica humana	NaCl
Lu <i>et al.</i> (2009)	Osmometria de membrana	Albumina sérica humana	(NH ₄) ₂ SO ₄