



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

MÁRCIA NASSOMA CAMUNDA JUSTINO

**DENSIDADES DE GLUTAMATO DE SÓDIO E DE LISOZIMA DA CLARA DO
OVO DA GALINHA EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE FOSFATO DE SÓDIO**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química na especialidade de Biosistemas, orientada pelo Professor Doutor Abel Gomes Martins Ferreira, apresentada para Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Maio de 2023

MÁRCIA NASSOMA CAMUNDA JUSTINO

**MASSA VOLÚMICAS DE GLUTAMATO DE SÓDIO E DE LISOZIMA
DA CLARA DO OVO DA GALINHA EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE
FOSFATO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química na especialidade de Biosistemas, orientada pelo Professor Doutor Abel Gomes Martins Ferreira, Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Coimbra, maio, 2023

PALAVRAS CHAVES

Massa volúmica, Temperatura, Lisozima da clara do ovo da galinha, Glutamato de sódio, Volume molar aparente, Fosfato de sódio, Desnaturação.

ABSTRACT

The density of aqueous solutions of salts as a function of temperature is a property whose study can provide answers and contribute to the understanding of physical and chemical phenomena that occur in these solutions, determine thermodynamic properties, of which the apparent molar volume, and essential for applications in engineering and biomedicine.

The main objective of the present work was to determine the densities of aqueous solutions of sodium glutamate (MSG) and lysozyme chicken egg white (LCEW) in buffer (aqueous solutions of 10 mM sodium phosphate) at pH equal to 7.2 and temperature interval from 298.15 K to 353.15 K, applying the vibrating tube densitometry technique (Anton Paar DMA 512P). Furthermore, the thermodynamic properties derived from the density were determined, namely, the apparent molar volumes (V_ϕ) of the referred solutions.

Eight (8) tests were performed for the aqueous solutions of MSG with the following molalities: 0.2546, 0.5219, 1.1006, 1.7477 and 2.4761 mol.kg⁻¹. The density values fitted a polynomial equation for all the tests, the relative deviations between the values calculated by the polynomial equation and the experimental ones are in the region defined by the value of AARD = 0.15%. Comparing the density values of this work and the measurements by Suzuki et al. for the temperature of 298.15 K, it is concluded that an excellent result was obtained, with the minimum and maximum deviations being -0.06% (-0.6722 kg.m⁻³) and 0.32% (3.7077 kg.m⁻³) in the molality range of 0.54 mol.kg⁻¹ < m < 3.84 mol.kg⁻¹. The values of V_ϕ for MSG in the buffer solution were determined, allowing to verify that below 303.15 K it increases with m , and above 303.15 K it decreases considerably, since the values of apparent molar volume at infinite dilution (V_ϕ^0) of MSG were determined to clarify the existing solute-solvent ionic interactions.

The aqueous solutions of LCEW used for testing were comprised of the following modalities: 1.587×10⁻⁴, 3.260×10⁻⁴ e 5.876 ×10⁻⁴ mol.kg⁻¹. For all the tests, a good agreement was obtained between the density values and the relative deviations, mostly within the region defined by the AARD value = 0.05%, corresponding to variations of approximately 1 kg.m⁻³ to 2 kg.m⁻³ in the temperature range from 298.15 K to 313.15 K. The V_ϕ for the LCEW in the buffer were determined, allowing the plotting of sigmoidal curves as a function of temperature, whose derivatives (dV_ϕ/dT) allow the observation of the denaturation temperature of lysozyme in the buffer phosphate sodium.

RESUMO

A massa volúmica de soluções aquosas de sais em função da temperatura é uma propriedade cujo estudo pode dar resposta e contribuir para a compreensão dos fenómenos físicos e químicos que ocorrem nestas soluções, determinar propriedades termodinâmicas, das quais o volume molar aparente, e essencial para aplicações nas áreas de engenharia e biomedicina.

O presente trabalho teve como principal objetivo determinar as massas volúmicas de soluções aquosas do glutamato de sódio (GMS) e da lisozima da clara do ovo da galinha (LCOG) no tampão (soluções aquosas de 10 mM de fosfato de sódio) a pH igual a 7.2 e domínios de temperatura de 298.15 K a 353.15 K, através da técnica de densitometria de tubo vibrante (Anton Paar DMA 512P). Igualmente determinou-se as propriedades termodinâmicas derivadas da massa volúmica, nomeadamente, os volumes molares aparentes (V_ϕ) das referidas soluções.

Foram realizados 8 (oito) ensaios para as soluções aquosas de GMS com as seguintes molalidades: 0.2546, 0.5219, 1.1006, 1.7477 e 2.4761 mol.kg⁻¹. Os valores de massa volumica ajustaram-se a uma equação polinomial para todos os ensaios, os desvios relativos entre os valores calculados pela equação polinomial e os experimentais situam-se na região definida pelo valor de $AARD = 0.15\%$. Fazendo uma comparação dos valores de massa volúmica deste trabalho e as medidas por Suzuki et al. para a temperatura de 298.15 K, obteve-se um resultado excelente, sendo que os desvios mínimo e máximo são de -0.06% (-0.6722 kg.m⁻³) e 0.32% (3.7077 kg.m⁻³) no intervalo de molalidade, $0.54 \text{ mol.kg}^{-1} < m < 3.84 \text{ mol.kg}^{-1}$. Os valores de V_ϕ para o GMS no tampão foram determinados permitindo verificar que abaixo de 303.15 K aumenta com a m e a superiores de 303.15 K diminui acentuadamente, já os valores de volume molar aparente a diluição infinita (V_ϕ^0) do GMS foram determinados para esclarecer as interações iónicas existentes entre soluto-solvente.

As soluções aquosas de LCOG utilizadas para ensaio estavam compreendidas com as seguintes modalidades 1.587×10^{-4} , 3.260×10^{-4} e 5.876×10^{-4} mol.kg⁻¹. Para todos os ensaios obteve-se uma boa concordância dos valores de massa volúmica com os desvios relativos maioritariamente dentro da região definida pelo valor de $AARD = 0.05\%$, correspondente a variações de aproximadamente 1 kg.m⁻³ a 2 kg.m⁻³ no intervalo de temperaturas de 298.15 K à 313.15 K. Os V_ϕ para a LCOG no tampão foram determinados permitindo traçar curvas sigmoidais em função da temperatura, cujas derivadas (dV_ϕ/dT) permitem observar a temperatura de desnaturação da lisozima em tampão de fosfato de sódio.

Índice

<u>PALAVRAS CHAVES</u>	III
<u>ABSTRACT</u>	IV
<u>RESUMO</u>	V
<u>ABREVIATURAS</u>	XI
<u>SIMBOLOGIA</u>	XII
<u>AGRADECIMENTOS</u>	XIII
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
1.1. ÂMBITO E MOTIVAÇÃO	1
1.2. OBJECTIVOS	2
1.2.1 OBJECTIVOS GERAIS	2
1.2.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	2
1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	2
<u>2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA</u>	4
2.1. PROTEÍNAS	4
2.2. LISOZIMA	9
2.3. GLUTAMATO DE SÓDIO	11
2.4. PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS	15
<u>3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL</u>	18
3.1. EQUIPAMENTO	18
3.2. REAGENTES	19
3.3. MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA LISOZIMA	21
<u>4. RESSULTADOS E DISCUSSÃO</u>	23
4.1. CALIBRAÇÃO DA SONDA DE PLATINA (Pt)	23
4.2. CALIBRAÇÃO DO DENSÍMETRO	25
4.3. INCERTEZA NA MASSA VOLÚMICA	33
4.4. MASSA VOLÚMICA DO GLICEROL (SUBSTÂNCIA TESTE)	35
4.5. MASSA VOLÚMICA DAS SOLUÇÕES DO GMS	39

4.6. VOLUME MOLAR APARENTE DAS SOLUÇÕES DO GMS	47
4.7. MASSA VOLÚMICA DAS SOLUÇÕES DA LCOG	54
4.8. VOLUME MOLAR APARENTE DAS SOLUÇÕES DA LCOG.....	59
<u>5. CONCLUSÕES.....</u>	<u>68</u>
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</u>	<u>71</u>
<u>7. ANEXOS.....</u>	<u>79</u>
ANEXO A: LISOZIMA DA CLARA DO OVO DA GALINHA.....	79
ANEXO B: DADOS EXPERIMENTAIS PARA A CALIBRAÇÃO DA SONDA	80
ANEXO C: DADOS EXPERIMENTAIS PARA O VÁCUO	81
ANEXO D: DADOS EXPERIMENTAIS PARA O GLICEROL.....	82
ANEXO E: DADOS PARA O GLICEROL DE DIFERENTES AUTORES.....	84
ANEXO F: DADOS EXPERIMENTAIS PARA AS SOLUÇÕES DE TAMPÃO	85
ANEXO G: DADOS EXPERIMENTAIS PARA AS SOLUÇÕES DE GMS.....	87
ANEXO H: DADOS EXPERIMENTAIS PARA AS SOLUÇÕES DE LCOG	102

Índice de Figuras

Figura 1: Aminoácido genérico com as unidades fundamentais constituintes. Adaptado de (David L. Nelson and Michael M. Cox, 2017).....	4
Figura 2: Aminoácidos e sua classificação quanto à polaridade e carga. Hidrofóbicos (círculos laranjas), hidrofílicos (círculos verdes), ácidos (círculos vermelhos) e básicos (círculos azuis). Adaptado de (David L. Nelson and Michael M. Cox, 2017)	5
Figura 3: Esquema da formação da ligação peptídica ('Peptide bond', 2022).....	6
Figura 4: Níveis de organização das proteínas (David L. Nelson and Michael M. Cox, 2017).....	7
Figura 5: Ilustração das interações entre grupos na proteína (a) e em meio aquoso (b).	8
Figura 6: Sequência de aminoácidos da lisozima, com indicação das quatro pontes dissulfeto existentes na estrutura da enzima (Canfield and Liu, 1965).	10
Figura 7: Estrutura da lisozima do ovo da galinha (LCOG), (« Protein Data Bank in Europe (PDB) < EMBL-EBI PDR entry 8H3W» 2023).....	10
Figura 8: Produção do ácido glutâmico por fermentação <i>C. glutamicum</i> a partir da sacarose. Adaptado de (Alharbi et al., 2020), (Kashiwagi et al., 1995).....	12
Figura 9: Estruturas do AGL (A) e GMS (B).	12
Figura 10: Glutamato de sódio monoidrato (GMS) é comercializado na forma cristais brancos com 12% de cátions de sódio (Na^+), 78% de ânions de glutamato ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4$) e 10% de água (H_2O).	13
Figura 11: Equilíbrios de protonação do ácido glutâmico. As constantes de protonação para os diferentes equilíbrios são K_1 , K_2 e K_3 , e k_a , k_a' , k_b , k_b' e k_c são microconstantes que pertencem ao grupo α -amino e os dois grupos carboxilato (Moldovan et al., 2021).	14
Figura 12: Esquema dos equipamentos utilizados na medida de massa volúmica, E1: seringa de vidro, E2: unidade DMA 60, E3: unidade DMA 512P, E4: banho termostático, E6: azoto para limpeza da linha, (V1 - V4): válvulas, I1: Pt100 e I2: medidor de vácuo.	18
Figura 13: Transmitância (T) razão entre a intensidade da radiação transmitida pela amostra (I) e a intensidade da radiação incidente na amostra (I_0). A absorvância (A) logaritmo de base dez vezes o inverso da transmitância.	21
Figura 14: Temperatura (T) em função da resistência (R) do termómetro de platina para a curva de calibração.....	23
Figura 15: Desvios absolutos entre valores calculados da temperatura (T_{cal}) e experimentais (T). As linhas a tracejado de cor vermelha representam o valor de AAD.	25
Figura 16: Período de oscilação em vácuo (τ) experimentais e calculados (τ_{cal}) pela equação [12]. ...	29
Figura 17: Desvios absolutos entre o período de oscilação em vácuo experimental (τ) e calculados (τ_{cal}) pela equação [12] em função da temperatura. As linhas a tracejado de cor vermelha representam o valor de AAD.....	29
Figura 18: Parâmetro de calibração B em função da temperatura (T).	31
Figura 19: Desvios absolutos, entre os valores de B e os calculados B_{cal} , em função da temperatura (T). As linhas a tracejado de cor vermelha representam o valor de AAD.....	32
Figura 20: Desvios absolutos entre as massas volúmicas (ρ_{cal}) calculada pela equação [11] e os valores da literatura (Kell 1975), (Tanaka et al. 2001) e («NIST» 2023) (ρ) em função da temperatura (T) para a água.....	33
Figura 21: Comparação da massa volúmica do glicerol (ρ) dos valores obtidos neste trabalho com os da literatura em função da temperatura (T).....	37
Figura 22: Desvios relativos entre a massa volúmica (ρ) calculada pela equação [19] e calculados pela literatura (ρ_{cal}) do glicerol em função da temperatura (T).	38
Figura 23: Massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de tampão de fosfato e da água HPLC em função da temperatura (T).	41

Figura 24: Representação 3D da massa volúmica das soluções de GMS em tampão (10 mM em fosfato de sódio com pH = 7) em função da temperatura (T) e da molalidade (m) de GMS.....	43
Figura 25: Massa volúmica das soluções aquosas de GMS (ρ) em tampão de fosfato para as variações de molalidade (m) em função da temperatura (T).	44
Figura 26: Desvios relativos percentuais da massa volúmica entre os valores experimentais (ρ) e calculada pela equação [23] (ρ_{calc}) das soluções de MSG em função da temperatura (T) para as variações de molalidade (m).....	45
Figura 27: Comparação dos valores de massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de GMS em tampão de fosfato, em função da molalidade (m) a 298.15 K deste trabalho com as medidas por Suzuki et al a mesma temperatura.....	46
Figura 28: Representação 3D do volume molar aparente (V_{ϕ}) do GMS na solução tampão de fosfato em função da temperatura (T) e da molalidade (m).....	49
Figura 29: Volume molar aparente (V_{ϕ}) do GMS na solução tampão de fosfato de sódio (com pH= 7) em função da molalidade (m) à temperatura de 298.15 K comparados com os determinados por (Suzuki et al., 2001) para as soluções de sal.....	50
Figura 30: Volume molar aparente (V_{ϕ}) do GMS na solução tampão de fosfato em função da molalidade (m).	51
Figura 31: Volume molar aparente a diluição infinita ($V_{\phi 0}$) das soluções de GMS em função da temperatura (T).....	52
Figura 32: Espécie aniônica do ácido glutâmico prevalecente nas condições das soluções de GMS. Adaptado de (Moldovan et al., 2021).	53
Figura 33: Massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de LCOG em tampão de fosfato em função da temperatura (T).....	57
Figura 34: Desvios relativos percentuais da massa volúmica entre valores experimental (ρ) e os calculados (ρ_{calc}) com a equação [23] para as soluções aquosas de LCOG em função da temperatura (T). As linhas a cinzento correspondem a AARD% (Ver Tabela 16).....	58
Figura 35: Representação 3D da massa volúmica das soluções de LCOG em tampão de fosfato de sódio em função da temperatura (T) e da molalidade (m) das soluções.	59
Figura 36: Volumes parciais específicos V_{ϕ} da LCOG em soluções aquosas em função da temperatura (T) selecionados da literatura.	60
Figura 37: Volumes molares aparentes (V_{ϕ}) da LCOG na solução tampão de fosfato sódio (com pH = 7.2) em função da temperatura (T). Representam-se também valores selecionados da literatura, para comparação.....	61
Figura 38: Derivada (dV_{ϕ}/dT) em função da temperatura para as concentrações de lisozima estudadas.	65
Figura 39: Raio hidrodinâmico em função da temperatura para a água bulk e água da camada de hidratação da lisozima (Mallamace et al., 2015).	66
Figura 40: Resumo dos fenómenos ligados à desnaturação da lisozima que ocorrem de acordo com o andamento da curva (V_{ϕ} vs T) para $m = 3.260 \times 10^{-4} \text{ mol.kg}^{-1}$	67

Índice de Tabelas

Tabela 1: Revisão da literatura acerca dos estudos volumétricos com LCOG em soluções de sais.....	17
Tabela 2: Massa molar, pureza, fornecedores e CAS dos reagentes	20
Tabela 3: Resultados do ajustamento de mínimos quadráticos da equação [3].....	24
Tabela 4: Períodos de oscilação (τ), temperatura (T) e a massa volúmica (ρ) para o fluido de referência água.....	27
Tabela 5: Coeficiente do ajustamento por mínimos quadráticos da equação [12].	28
Tabela 6: Valores de B em função da temperatura T.....	30
Tabela 7: Coeficientes b_i da equação [13] e indicadores estatísticos.....	32
Tabela 8: Massa volúmica (ρ) do glicerol em função da temperatura (T).	36
Tabela 9: Coeficientes (d_i) da equação [21] e indicadores estatísticos.	37
Tabela 10: Massa volúmica (ρ) da solução tampão de fosfato de sódio e do GSM em solução tampão em função da temperatura (T) e da molalidade (m).	40
Tabela 11: Coeficientes da equação [23] e parâmetros estatísticos relativos do ajustamento aos valores da massa volúmica da Tabela 13.	42
Tabela 12: Volumes molares aparentes do GMS na solução tampão de fosfato determinados pela equação [25].	47
Tabela 13: Coeficientes da equação [26] e parâmetros estatísticos do ajustamento.	48
Tabela 14: Variação do pH das soluções de GMS com a concentração do sal (em molaridade).....	53
Tabela 15: Massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de lisozima em solução tampão em função da temperatura (T) e da molalidade (m).	55
Tabela 16: Coeficientes da equação [23] e parâmetros estatísticos relativos do ajustamento aos valores da massa volúmica da Tabela 18.	56
Tabela 17: Coeficientes da equação [30] e parâmetros estatísticos relativos do ajustamento aos valores do volume molar aparente das soluções aquosas de LCOG nas soluções de fosfato de sódio.....	64

ABREVIATURAS

<i>AGL</i>	<i>Ácido glutâmico</i>
<i>AAD</i>	<i>Desvio médio absoluto</i>
<i>AARD</i>	<i>Desvio relativo médio percentual</i>
<i>CAS</i>	<i>Número de Registro</i>
<i>EFSA</i>	<i>Associação Europeia de Segurança Alimentar</i>
<i>FDA</i>	<i>Administração de Alimentos e Medicamentos</i>
<i>FAO</i>	<i>Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura</i>
<i>GMS</i>	<i>Glutamato de sódio</i>
<i>JECFA</i>	<i>Especialistas em Alimentos e Aditivos</i>
<i>LCOG</i>	<i>Lisozima da clara do ovo da galinha</i>
<i>OMS</i>	<i>Organização Mundial da Saúde</i>

SIMBOLOGIA

r^2	<i>Coeficiente de correlação</i>
σ	<i>Desvio padrão</i>
ρ	<i>Massa volúmica</i>
u	<i>Incerteza</i>
UV	<i>Luz ultravioleta</i>
M	<i>Molalidade</i>
τ	<i>Período de vibração</i>
$\% m/m$	<i>Percentagem em massa</i>
R	<i>Resistência</i>
T	<i>Temperatura</i>
V_ϕ	<i>Volume molar aparente</i>
V_ϕ^0	<i>Volume molar a diluição infinita</i>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, força e cuidado que tem me concedido todos os dias.

Expresso a minha gratidão ao Professor Abel Gomes Martins Ferreira, PhD, pela sua orientação durante as fases de planeamento e execução deste trabalho. Agradeço à Investigadora Zaida Almeida pelo suporte dado na preparação das amostras experimentais deste trabalho.

A minha eterna gratidão a instituição INAGBE pelo financiamento a bolsa de estudo que tornou o meu sonho uma realidade, tornar-me Engenheira Química.

Um enorme agradecimento aos meus pais Daniel Justino e Maria Justino, aos meus irmãos Aldina, Sofia, Esmeralda, Jandira, Arnaldo, Zola, Wilson, Veidy e Aldo pelo apoio incondicional na minha decisão de imigrar e durante o tempo de formação em Coimbra.

Um agradecimento especial a minha grande amiga Isabel Aníbal pelo suporte destes anos no departamento de engenharia química, pela companhia ao vivermos juntas e a todos bons e maus momentos inesquecíveis que enfrentamos durante essa trajetória.

Por último, mas não menos importante expresso a minha gratidão ao meu amado amigo Fernando, as minhas amigas de Coimbra para vida, Filomena, Eunice, Evandra, Elcana, Carla, Laudima e Luzia pela oportunidade de os conhecer e vibrarmos na mesma frequência da vida. Aos professores do departamento de engenharia química e todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente nestes anos de formação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ÂMBITO E MOTIVAÇÃO

Os densímetros de tubo vibrante são aparelhos de elevada sofisticação técnica, atualmente considerados como padrão na medida de massa volúmica de líquidos puros e de misturas de líquidos e soluções de sais. As medidas de massa volúmica de sais em soluções aquosas em função da temperatura efetuados com estes aparelhos permitem obter informações relevantes para a compreensão das interações das espécies iónicas entre si e destas com a água.

O glutamato de sódio (GMS) é um aditivo alimentar que tem levantado muitas discussões sobre a sua utilização no que se refere ao seu impacto na saúde humana que se manifesta ao nível de doenças neurodegenerativas, que por sua vez estão relacionadas com agregação das proteínas (Ahanger, Bashir, et al. 2021). Sendo o GMS referenciado como um causador de agregação de proteínas é importante estudar as condições de temperatura e concentração em que este fenómeno pode ocorrer. Os estudos de massa volúmica são ainda muito raros na literatura e podem contribuir para o esclarecimento dos fenómenos físicos que controlam problemas como desnaturação e agregação das proteínas.

A lisozima da clara do ovo da galinha (LCOG) é uma proteína barata e que por isso tem sido bastante utilizada em estudos de simulação da estabilidade e agregação de proteínas. Deste modo faz todo o sentido utilizar a LCOG e o GMS para obter dados volumétricos com densitometria de tubo vibrante que possam contribuir para explicar a problemática da estabilidade das proteínas bem como da sua possível agregação. Há ainda a acrescentar que existe uma carência de valores de massa volúmica em função da temperatura para as soluções de GMS, existindo um único estudo à 298 K (25°C) (Suzuki et al. 2001). Por outro lado, a presença de sais como o GMS deverá influenciar a desnaturação ou agregação da LCOG. Após uma pesquisa bibliográfica cuidada não foi encontrado nenhum estudo sobre a influência de soluções de GMS na estabilidade e agregação da LCOG.

1.2. OBJECTIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

A avaliação das interações iônicas soluto-solvente do GMS em solução tampão (soluções aquosas de fosfato de sódio com pH = 7.2). Estes estudos, inexistentes na literatura serão muito importantes para entender a utilização deste sal na avaliação da desnaturação de proteínas e possível agregação destas. Estabelecer as regiões de temperatura onde ocorrem os fenómenos de desnaturação da lisozima em solução tampão soluções aquosas de fosfato de sódio com pH = 7.2). Guarda-se para estudos futuros, avaliar o efeito do GMS na estabilidade conformacional da LCOG com o aumento da temperatura.

1.2.2. Objetivos específicos

Estudar as massa volúmicas de soluções aquosas de GMS e de LCOG no tampão (soluções aquosas de fosfato de sódio com pH = 7.2) em função da temperatura para domínios de 298.15 a 353.15 K. Determinar a propriedade termodinâmica derivada da massa volúmica como o volume molar aparente (V_{ϕ}): do GMS nas soluções aquosas de fosfato de sódio no sentido de avaliar as interações iônicas soluto-solvente; da LCOG nas soluções aquosas de fosfato de sódio para esclarecer as interações que estão na base dos fenómenos de desnaturação da proteína.

1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O documento apresentado está estruturado em 5 capítulos resumidos a seguir. No presente capítulo 1 é feita uma breve introdução ao assunto em estudo, que inclui âmbito/motivação e os objetivos do trabalho. No capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a estrutura das proteínas com foco especial na lisozima e do glutamato de sódio. Apresentam-se alguns dados já estudados relevantes salientando a propriedade termodinâmica em estudo. No capítulo 3 é feita a apresentação dos materiais e o método de medida da massa volúmica com o densímetro de tubo vibrante. No capítulo 4 apresentam-se os resultados. Em primeiro lugar reporta-se a calibração do densímetro, incluindo o cálculo da incerteza das medidas da massa volúmica e o teste realizado com glicerol, selecionado como substância para esse objetivo. Incluem-se neste capítulo as medidas da massa volúmica das soluções aquosas de GMS e das soluções de LCOG bem como o cálculo do volume molar aparente destas espécies. Finalmente o capítulo 5 é dedicado às principais conclusões deste

estudo referindo-se a importância do trabalho e algumas sugestões que podem ser importantes para futuros trabalhos de investigação neste âmbito.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. PROTEÍNAS

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nos sistemas vivos, com funções cruciais em quase todos os processos biológicos. De um ponto de vista químico as proteínas são do tipo polimérico, ou seja, longas cadeias moleculares resultantes da união repetida de várias moléculas menores, os aminoácidos. Um aminoácido é uma molécula que contém simultaneamente os grupos funcionais amina (NH_2) e ácido carboxílico (COOH). Cada aminoácido possui uma base comum e um grupo lateral, ou resíduo (R), sendo este último o responsável pelas propriedades químicas de cada aminoácido, Figura 1.(David L. Nelson e Michael M. Cox 2017).

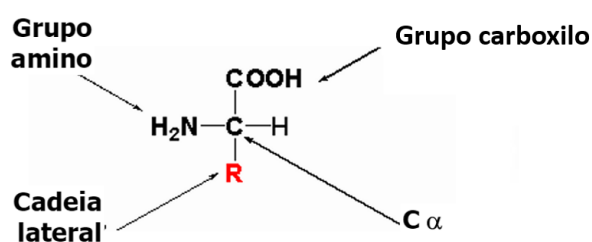


Figura 1: Aminoácido genérico com as unidades fundamentais constituintes. Adaptado de (David L. Nelson and Michael M. Cox, 2017)

Na natureza existem 20 aminoácidos diferentes cada um dos quais com propriedades físico-químicas específicas. Os aminoácidos podem ser agrupados quanto a sua polaridade e carga como podemos observar na Figura 2.

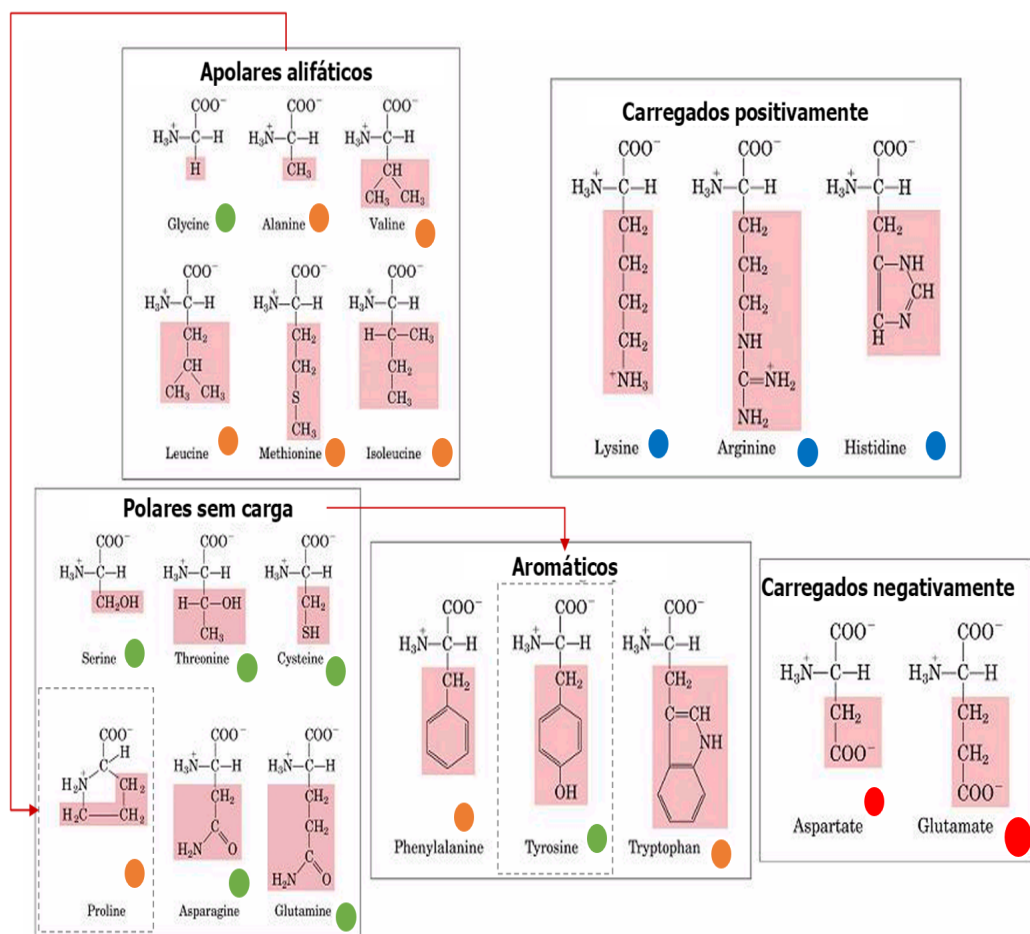


Figura 2: Aminoácidos e sua classificação quanto à polaridade e carga. Hidrofóbicos (círculos laranjas), hidrofílicos (círculos verdes), ácidos (círculos vermelhos) e básicos (círculos azuis). Adaptado de (David L. Nelson and Michael M. Cox, 2017)

A união de dois aminoácidos faz-se através de uma ligação química chamada ligação peptídica, Figura 3. A cadeia polipeptídica resulta da união de vários aminoácidos e por este motivo as proteínas são também muitas vezes designadas por moléculas polipeptídicas (com mais de setenta aminoácidos). A sequência da cadeia polipeptídica é a chave para a estrutura de milhares de proteínas, variando em tamanho, desde pequenos peptídeos a longos polímeros (David L. Nelson e Michael M. Cox 2017).

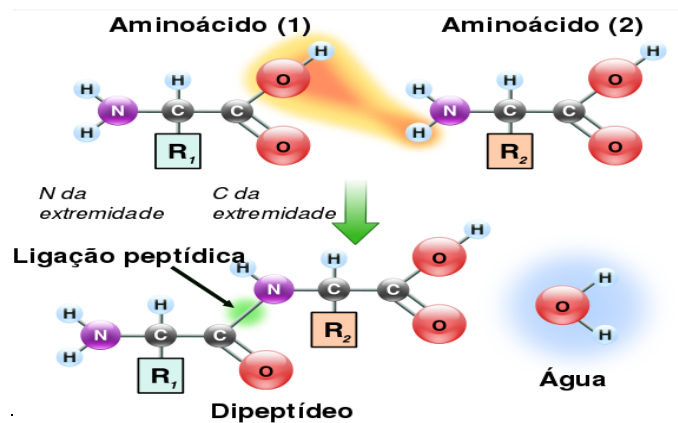


Figura 3: Esquema da formação da ligação peptídica ('Peptide bond', 2022)

As proteínas exibem uma hierarquia de níveis de organização estrutural apresentadas na Figura 4 (David L. Nelson e Michael M. Cox 2017). Como primeiro nível na organização estrutural surge a estrutura primária, a qual constitui a sequência específica de aminoácidos na cadeia peptídica sem haver preocupações com a orientação espacial da macromolécula. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. A função de uma proteína depende de sua estrutura primária e qualquer mudança desta sequência gera uma proteína diferente que pode até perder a sua função biológica. A estrutura primária de uma proteína é destruída por hidrólise química ou enzimática das ligações peptídicas, com liberação de peptídeos menores e aminoácidos livres. A estrutura secundária refere-se a arranjos particularmente estáveis dos resíduos de aminoácidos dando origem a padrões estruturais em forma de hélice ou folhas. A estrutura secundária é mantida essencialmente segundo ligações por pontes de hidrogénio e é determinada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína. Esta estrutura ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos, dos grupos carboxilo e amina dos aminoácidos. Já a estrutura terciária envolve peptídeos individuais dobrados e nesta estrutura os aminoácidos que estão distantes na sequência polipeptídica e que residem em diferentes tipos de estruturas secundárias podem interagir dentro da estrutura da proteína quando é completamente dobrada. Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas, ou subunidades, que podem ser idênticas ou diferentes. O arranjo dessas subunidades proteicas em complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária.

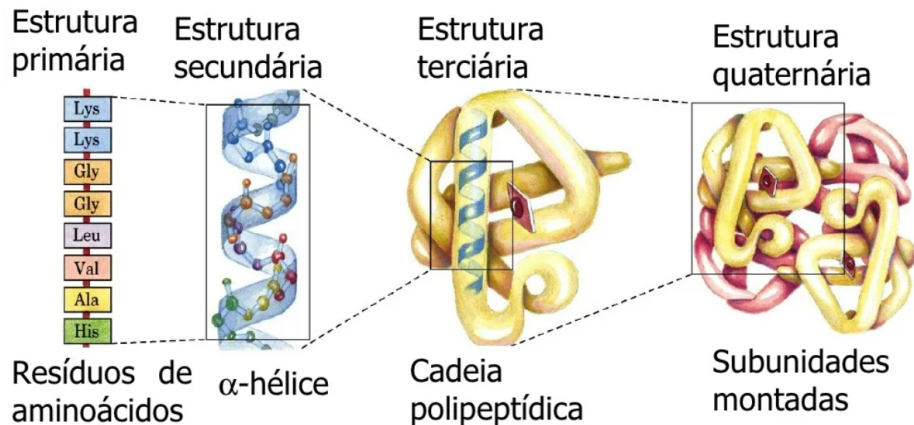


Figura 4: Níveis de organização das proteínas (David L. Nelson and Michael M. Cox, 2017).

As proteínas necessitam de adquirir uma estrutura definida da qual depende a sua função biológica, estrutura essa que está inscrita na sua sequência de aminoácidos. Ao longo dos anos, vários cientistas tentaram responder a três questões cruciais relacionadas com o chamado “problema do enrolamento proteico”:

1. decifrar o código físico onde a sequência de aminoácidos determina a estrutura nativa da proteína;
2. identificar os mecanismos que permitem que as proteínas se dobrem rapidamente;
3. definir como é que a estrutura das proteínas pode ser prevista a partir da sua sequência de aminoácidos.

Além da aquisição da estrutura nativa (dobrada), as vias de “enrolamento” também têm um papel vital em evitar um desdobraimento incorreto e consequentemente impedir a agregação de proteínas. Além disso, a estabilidade das proteínas no desempenho das suas funções biológicas é fundamental e pode ser entendida como a capacidade da proteína preservar a sua função em determinadas condições, ao longo do tempo, resultando num balanço de forças que determinam se esta se encontra numa conformação nativa ou num estado desnaturado/desdobrado. A identificação dos fatores que regulam a estabilidade das proteínas tem sido um puzzle não resolvido de longa data, cuja solução tem importantes aplicações nas áreas biotecnológicas e médicas. Muitas abordagens assumem que a estabilização da estrutura nativa é a etapa chave para suprimir a agregação de proteínas.

A agregação de proteínas é um mecanismo patológico que conduz a doenças degenerativas também conhecidas como amiloidoses: amiloidose da lisozima, doenças de Alzheimer e de Parkinson. Este grupo de doenças está associado ao desdobraimento incorreto e à agregação de proteínas que se podem depositar na forma de material insolúvel causando danos celulares e morte. Até à data, já foram descritas cerca de 50 amiloidoses, associadas a

cerca de 30 proteínas. E nenhuma das amiloidoses atualmente conhecidas possui terapia eficaz.

Uma das estratégias usadas para estabilizar proteínas nativas é modular o seu ambiente. As proteínas são altamente sensíveis a mudanças na sua vizinhança induzidas por temperatura, pH e concentração de sal. A sensibilidade depende muito da composição da cadeia polipeptídica. Quando expostas a estes fatores, as proteínas sofrem mudanças graduais na estrutura, ou seja, desdobram e/ou formam agregados de proteínas ao longo do tempo. Além disso, a baixa estabilidade de proteínas e enzimas pode resultar em perda de função e atividade, limitando significativamente seu uso em processos biológicos, como biofármacos e outros.

No interior e no exterior da proteína são possíveis vários tipos de interações moleculares. Na Figura 5(a) indicam-se os principais tipos de interações entre grupos e partes específicas da proteína. Por outro lado, as cadeias laterais de aminoácidos polares tendem agrupar-se na parte externa da proteína, potenciando assim a sua interação com a água. As cadeias laterais de aminoácidos apolares têm tendência para se concentrar no interior para formar um centro hidrofóbico empacotado de átomos que se escondem da água, Figura 5(b).

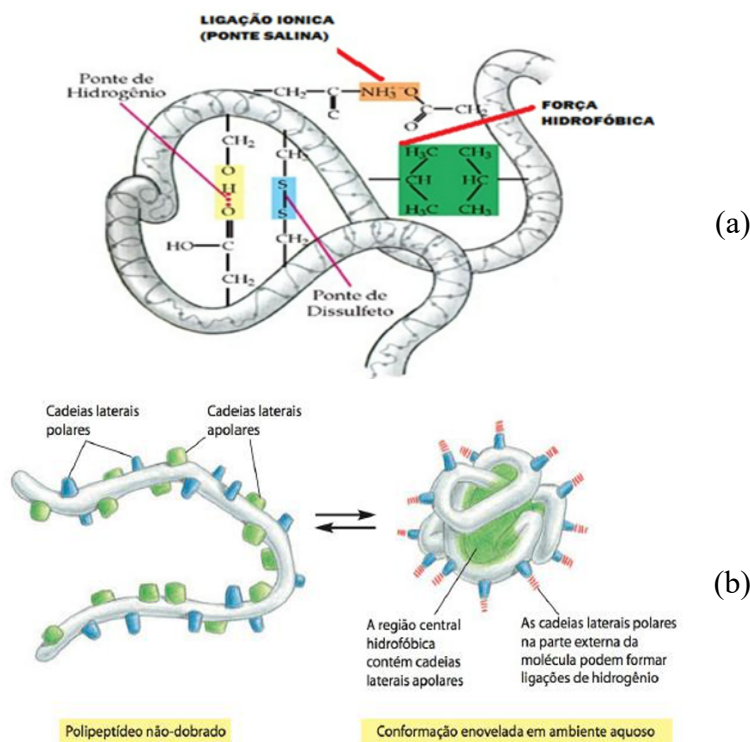


Figura 5: Ilustração das interações entre grupos na proteína (a) e em meio aquoso (b).

O agregado de uma proteína é a proteína no estado inativo com pelo menos duas vezes o tamanho da proteína nativa (100 a 1000 nm). Este estado exibe menos atividade reduzida ou nenhuma atividade biológica (Dobson 2003), (Chiti e Dobson 2006). O dobramento incorreto e a agregação de proteínas são atualmente as principais fontes de apreensão na biologia e na medicina devido à sua associação com várias doenças neurodegenerativas humanas debilitantes incluindo Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington. O pH, a temperatura, a concentração de proteína, aditivos e viscosidade são alguns fatores que podem influenciar a agregação de proteínas (Kan e Chen 2021).

2.2. LISOZIMA

A lisozima é uma enzima antimicrobiana produzida por animais e faz parte do sistema imunológico inato, isto por se encontrar na saliva, lágrimas, muco e leite produzidos por seres humanos, podendo ainda se encontrar em grandes quantidades na clara de ovo da galinha (Callewaert e Michiels 2010), (Seuss-baum 2007).

A lisozima é uma proteína pequena de cadeia única contendo 129 aminoácidos. Dobra-se numa estrutura compacta com uma espécie de fenda no sítio ativo (que se pode ligar a certos carboidratos), as interações no interior e no exterior dessa proteína são as mesmas descritas na Figura 6. Existem quatro pontes dissulfeto (entre Cys 6 e Cys 127, entre Cys 30 e Cys 115, entre Cys 64 e Cys 80 e entre Cys 76 e Cys 94) mostradas na Figura 6, que reticulam o polipeptídeo, estabilizando a conformação nativa (dobrada/enrolada). A cor amarela corresponde aos aminoácidos das hélices alfas (α) e a verde às folhas beta (β). A lisozima incorpora unidades de ácido glutâmico (AGL) que é também a unidade estrutural do GMS. No Anexo A, pode-se observar os aminoácidos que constituem a lisozima da clara do ovo da galinha.

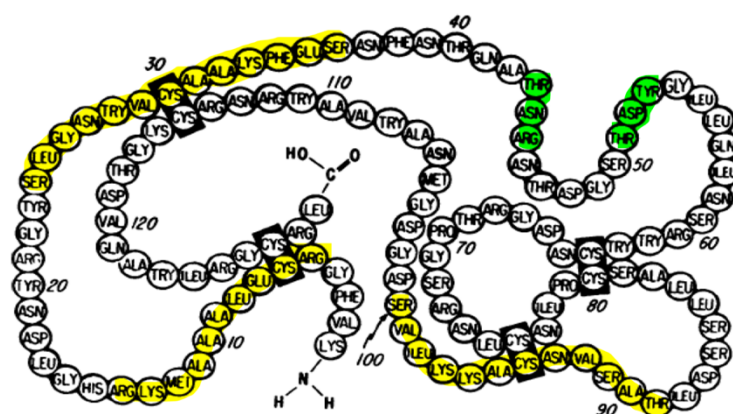


Figura 6: Sequência de aminoácidos da lisozima, com indicação das quatro pontes dissulfeto existentes na estrutura da enzima (Canfield and Liu, 1965).

A lisozima apresenta um caráter essencialmente hidrofílico com algumas regiões hidrofóbicas situadas no seu interior. Tendo em conta que a lisozima está presente entre outros lados, na clara de ovo está essencialmente constituída de água, compreende-se que a lisozima tenha um comportamento hidrofílico. A Figura 7 ilustra a estrutura da LCOG, a estrutura secundária compreende essencialmente três hélices α e duas cadeias β . Ilustra-se também a distribuição de resíduos na superfície da proteína (« Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI PDR entry 8H3W » 2023).

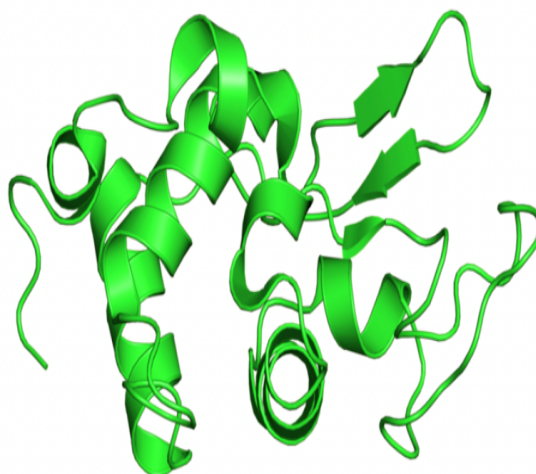


Figura 7: Estrutura da lisozima do ovo da galinha (LCOG), (« Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI PDR entry 8H3W » 2023).

2.3. GLUTAMATO DE SÓDIO

O glutamato de sódio (GMS) é também conhecido como sal de sódio do ácido glutâmico (AGL), um aminoácido não essencial (ou seja, pode ser sintetizado pelo corpo humano e, portanto, não é essencial para a dieta humana) é abundante na natureza encontrado naturalmente em alguns alimentos nos quais se inclui as carnes, algas marinhas, anchovas, moluscos, tomates, queijos, legumes, mariscos e cogumelos. O GMS é um dos aditivos alimentares mais utilizados sendo geralmente reconhecido como seguro de acordo com o Comité Conjunto FAO e OMS, JECFA, FDA e EFSA. O GMS e o AGL conferem aos alimentos um sabor salgado conhecido como sabor umami, expressão em japonês que significa como “saboroso” (Yadav 2010).

Existem muitas indicações na literatura que sugerem que o uso excessivo de GMS nos alimentos está relacionado com doenças como fibromialgia hiper-agregação de plaquetas em ratos, efeito cardiovasculares, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade de desreguladores endócrinos, hiperglicemia com consequentemente diabetes mellitus, e excesso de peso (Ahanger, Bashir, et al. 2021), (Moldovan et al. 2021), (Gottardo et al. 2022).

Inúmeros relatórios recentes onde destacam que o GMS tomado por via oral é um promotor de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, doença amiotrófica esclerose lateral e esclerose múltipla (Ahanger, Bashir, et al. 2021). Geralmente, é um fato bem conhecido que as doenças neurológicas estão relacionadas com o fenómeno de agregação e desnaturação de proteínas. Este fenómeno pode ser definido como o evento pelo qual as proteínas são incapazes de se dobrar devido a proteínas mal dobradas ou enroladas, que por sua vez polimerizam em agregados, amalgamando-se desta forma intra e extracelular formando uma estrutura anormal e desencadeando uma larga variedade de doenças neurológicas (Chiti e Dobson 2006), (Conway 2020). Apesar de existirem alguns relatórios sobre a associação do GMS com vários distúrbios neurológicos, ainda não há provas concretas disponíveis sobre o papel do GMS na agregação de proteínas. Assim, há a necessidade de investigação desta problemática.

O AGL foi sintetizado pela primeira vez em 1908 pelo bioquímico japonês Kikunae Ikeda a partir de uma alga utilizada na alimentação e é atualmente o aminoácido mais produzido no mundo. Existem quatro formas principais de obtenção deste aminoácido para uso comercial (Ding et al. 2022):

- a. Extração de fontes naturais por hidrólise com ácido clorídrico
- b. Síntese química a partir da acrilonitrila

- c. Fermentação bacteriana;
- d. Catálise enzimática.

O uso da fermentação para obtenção do AGL teve início na década de 50 quando foi observada a produção de pequenas quantidades de aminoácidos por *Escherichia coli* (*E. coli*). Todavia, descobriu-se que outra bactéria, a *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) podia levar à produção de grandes quantidades de acordo com a reação (Alharbi et al. 2020), (Kashiwagi et al. 1995) observada na Figura 8.

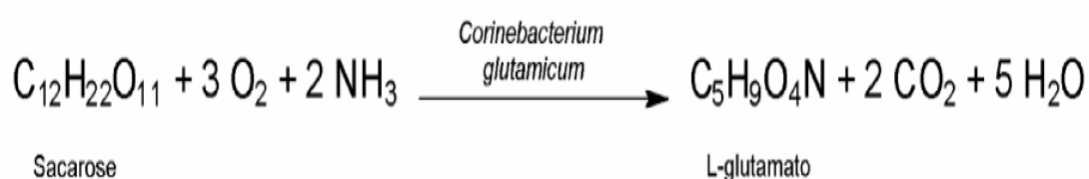


Figura 8: Produção do ácido glutâmico por fermentação *C. glutamicum* a partir da sacarose. Adaptado de (Alharbi et al., 2020), (Kashiwagi et al., 1995).

As estruturas do aminoácido AGL e do sal GMS estão representadas na Figura 9.

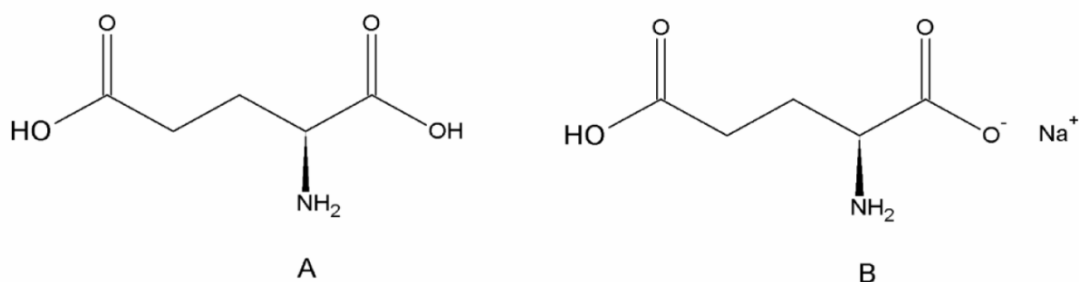


Figura 9: Estruturas do AGL (A) e GMS (B).

O GMS cuja estrutura se indica na Figura 10 é encontrado principalmente na forma de cristais brancos e inodoros. O GMS é composto por 12% de cátions de sódio (Na^+), 78% de aniões de glutamato ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4$) e 10% de água. São conhecidos dois hidratos para o sistema binário glutamato de sódio + água, o monohidrato (GMS) (Sano et al. 1989) e o pentahidrato ($\text{GMS}5\text{H}_2\text{O}$) (Kashiwagi et al. 1995). Este último hidrato é estável na região 264.5 K a 272.2 K enquanto o primeiro existe às temperaturas elevadas.

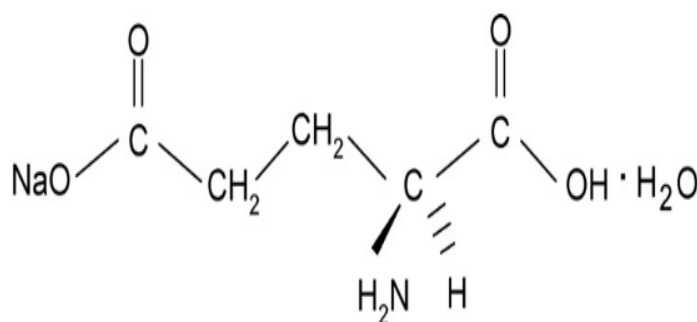


Figura 10: Glutamato de sódio monohidrato (GMS) é comercializado na forma cristais brancos com 12% de cátions de sódio (Na^+), 78% de ânions de glutamato ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4$) e 10% de água (H_2O).

O sal GMS em soluções aquosas dissocia-se em glutamato e íão de sódio. O sólido contém cátion Na^+ e anião glutamato na forma zwitteriônica. O termo zwitterion aplica-se a uma molécula que consiste num número isolado e igual de grupos funcionais carregados positivamente e negativamente donde resulta uma carga global nula. Os aminoácidos são bons exemplos de moléculas que podem existir como zwitteriões com grupos funcionais amina e carboxilo. A estrutura de um aminoácido é tal que permite que ele se comporte como um ácido e uma base a um determinado valor de pH e quase todos os aminoácidos existem como zwitteriões a um determinado valor de pH, que é diferente para cada aminoácido. O pH específico ao qual um determinado aminoácido existe em solução como um zwitterião é conhecido como ponto isoelétrico. Quando o ácido glutâmico é dissolvido em água, o grupo amina ($-\text{NH}_2$) pode aceitar um próton (H^+), e/ou os grupos carboxilo podem perder prótons conforme a acidez do meio como se indica na Figura 12 (Kashiwagi et al. 1995), (Moldovan et al. 2021).

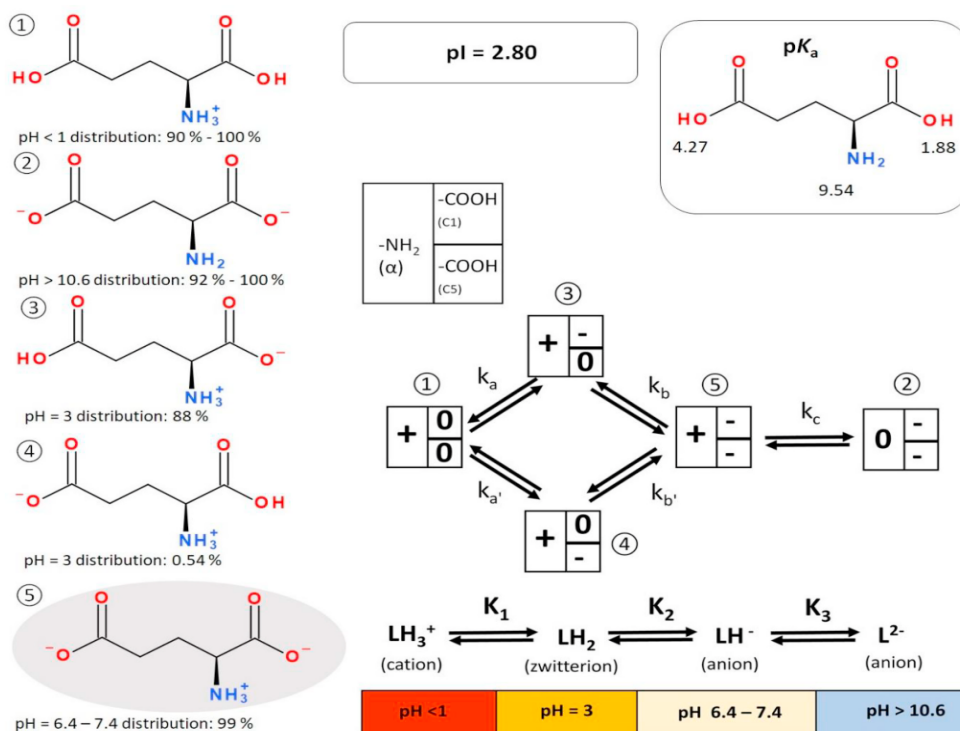


Figura 11: Equilíbrios de protonação do ácido glutâmico. As constantes de protonação para os diferentes equilíbrios são K_1 , K_2 e K_3 , e k_a , $k_{a'}$, k_b , $k_{b'}$ e k_c são microconstantes que pertencem ao grupo α -amino e os dois grupos carboxilato (Moldovan et al., 2021).

Da Figura 11 percebe-se que em meios suficientemente ácidos $\text{pH} < 1$, o grupo amino ganha um próton e as moléculas ficam catiónicas $\text{HOOC-CH}(\text{NH}_3^+)-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$. (Neuberger 1936). Quando o pH está em valores entre 2.5 e 4.1, o ácido carboxílico vizinho da amina perde o próton e o AGL fica neutro na forma zwitterionica $^- \text{OOC-CH}(\text{NH}_3^+)-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$. Esta é a forma geralmente associada à sua forma sólida (Rodante, Marrosu, e Fantauzzi 1989). As duas formas referidas anteriormente existem em iguais concentrações a $\text{pH} = 2.1$. Para valores de pH maiores, o outro grupo carboxílico perde o próton e o ácido existirá como anião glutamato $^- \text{OOC-CH}(\text{NH}_3^+)-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}^-$, a que corresponde uma carga negativa em termos globais. Esta mudança de protonação ocorre a $\text{pH} = 4.27$ (Rodante, Marrosu, e Fantauzzi 1989). A região de pH deste estudo para o GMS corresponde aproximadamente 7.2 e conseqüentemente a espécie predominante será o anião $^- \text{OOC-CH}(\text{NH}_3^+)-(\text{CH}_2)_2-\text{COO}^-$.

2.4. PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS

Os estudos sobre as propriedades termodinâmicas em geral e volumétricas em particular incidindo sobre soluções aquosas de GMS são muito escassos. Uma revisão cuidada da literatura indica apenas um único estudo disponível (Suzuki et al. 2001). Estes autores estudaram a solubilidade em água na faixa de pressões desde 0.10 a 300 MPa e a 298.15 K. Dos resultados obtidos concluíram que a solubilidade determinada em condições de saturação a 298.15 K, aumenta com o aumento da pressão. Para o sal de glutamato não hidratado à pressão atmosférica e 298.15 K em condições de saturação, a molalidade é de $m = 3.683 \pm 0.001 \text{ mol.kg}^{-1}$ (Suzuki et al. 2001). Estes autores determinaram também a massa volúmica e volumes molares aparentes das soluções de glutamato para concentrações entre 0.54 molal e 3.84 molal e entalpias de solução. Após uma pesquisa bibliográfica não foi encontrado nenhum estudo sobre a influência de soluções de GMS na desnaturação e agregação da LCOG.

Existem, todavia, vários estudos onde se determinaram propriedades volumétricas da lisozima em soluções aquosas de sais e líquidos orgânicos. Foram apresentadas medições de massa volúmica da lisozima em soluções aquosas com cálculo dos volumes parciais molares da proteína a 293.15 K, 298.15 K e 303.15 K (Millero, Ward, e Chetirkin 1976). Outros estudos foram dirigidos para lisozima em soluções aquosas de sais. As propriedades volumétricas de lisozima em soluções aquosas de cloreto de sódio foram estudadas a pH 4.2 e 8.8 a 298.15 K, bem como a influência do sulfato de lítio, cloreto de magnésio e sulfato de amónio a pH 4.2 e 298.15 K (Zielenkiewicz 2001), (Zielenkiewicz e Zielenkiewicz 2005), (Zielenkiewicz e Zielenkiewicz 2007).

O volume parcial molar da lisozima também foi determinado a 303.15 K em soluções aquosas de brometo de tetraetilamónio (Banerjee e Kishore 2006), (Chalikian et al. 1996) onde realizaram estudos de volumes parciais molares de 15 proteínas globulares nas quais se incluía a lisozima, em solução aquosa a temperaturas que variam de 291,15 a 328,15 K. Destes estudos resultaram informações importantes sobre o estado de hidratação das proteínas. Mais recentemente (Krakowiak, Krajewska, e Wawer 2019) realizaram estudos térmicos de desnaturação de LCOG em água e soluções aquosas de N-butilureia. Foi medida a massa volúmica no intervalo de temperaturas desde 298,15 a 353,15 K à pressão atmosférica e utilizando concentrações da proteína de 2 a 20 mg por ml de solução. Este estudo mostrou que o efeito de desnaturação pode ser estudado com rigor a partir de dados volumétricos e que

além disso, ao contrário do que se pensava, as medições de massa volúmica sugerem que a proteína desnaturada não precisa necessariamente de estar num estado totalmente estendido.

Na Tabela 1 faz-se um resumo dos estudos volumétricos encontrados na literatura incidindo sobre a LCOG em soluções aquosas quer de sais ou de líquidos orgânicos considerados relevantes neste tipo de estudos.

Tabela 1: Revisão da literatura acerca dos estudos volumétricos com LCOG em soluções de sais.

Autores	Ano	Resumo
(Krakowiak, Krajewska, e Wawer 2019)	2019	Estudos térmicos de desnaturação de LCOG em água e solução aquosa de N-butilureia (BU). As medidas densimétricas de alta precisão foram usadas para caracterizar e analisar as mudanças do volume específico com variações de temperatura variando de 298.15 a 353.15K à pressão atmosférica. A concentração da proteína cobriu a faixa de 2 a 20 mg por 1 ml da solução. Na região de desnaturação, as mudanças estruturais da proteína são acompanhadas pelo maior aumento dos valores de temperatura. As medições mostram que esse efeito pode ser monitorado a partir de dados volumétricos.
(Jirasek et al. 2018)	2018	O volume molar de LCOG e albumina de soro bovino (BSA) em soluções aquosas a diferentes valores de pH e em soluções aquosas contendo cloreto de sódio, cloreto de amônio, sulfato de sódio ou sulfato de amônio a diferentes concentrações, pH de 7.0, a 298,15 K e 1 bar. Verificou-se que a influência do valor de pH e dos sais no volume molar das proteínas é pequena.
(Siddique et al. 2014)	2014	Resultados das medições de massa volúmica e velocidade ultra-sônica de glucose + lisozima + água, maltose + lisozima + água, e ureia + lisozima + água. A compressibilidade adiabática foi calculada para estes sistemas com ajuda de valores de massa volúmica e velocidade ultra-sônica as temperaturas de 293.15, 303.15, 313.15, e 323.15 K para várias concentrações de glucose, maltose, e ureia. A interação entre açúcares e moléculas de água cria um ambiente polar que ajuda a aumentar as interações hidrofóbicas nas proteínas, estabilizando assim a proteínas, enquanto que a ureia cria um efeito oposto na estabilização da proteína devido ao seu papel de quebrar a estrutura da água.
(Ferreira Machado et al. 2007)	2007	Influência de diferentes valores de pH (3.0, 4.6, 6.0, 8.0 e 9.0) e concentrações de sal (0.05, 0.1, 0.2, 0.35 e 0.5 mol/l) para os sais (NaCl, Na ₂ SO ₄ e (NH ₄) ₂ SO ₄) na solubilidade e massa volúmica da LCOG, à temperatura de 25 °C. Os resultados mostraram que a solubilidade da LCOG foi influenciada pelo pH, bem como pela concentração e tipo de sal presente no meio. A solubilidade da proteína aumentou com o aumento do pH, com solubilidade mais elevada a pH de 9.0 e solubilidade mais baixa a pH de 4.6. Este comportamento foi verificado para todos os sais analisados. A massa volúmica aumentou com o aumento da concentração de sal.
(Kamiyama, Matsusita, e Kimura 2003)	2003	Massa volúmica e espectros de fluorescência de misturas ternárias de água + dimetil sulfóxido + lisozima e volumes específicos parciais de lisozima foram determinados a temperatura de 298. 15 K. As misturas binárias de água + sulfóxido de dimetilo tem um volume mínimo de excesso quando a fração molar (x) de sulfóxido de dimetilo está na gama de 0.25 a 0.42, e a lisozima desdobra-se e agrega-se dentro desta gama. Isto indica forte interação entre água e dimetilsulfóxido pode influenciar a conformação da lisozima, interferindo nas interações água-lisozima. Na gama $x > 0.8$, a lisozima estava num estado desnaturado, tendo um volume específico parcial de 0.706 cm ³ g ⁻¹ menor do que o do estado nativo, 0.712 cm ³ g ⁻¹ , provavelmente porque o desdobramento levou a uma diminuição do volume da cavidade da lisozima no solvente.

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPAMENTO

As massas volúmicas foram medidas num densímetro de tubo vibrante comercial Anton Paar DMA 512P na faixa de temperatura de 298 K a 353 K à pressão atmosférica. A instrumentação e equipamentos utilizados neste trabalho estão representados na Figura 12.

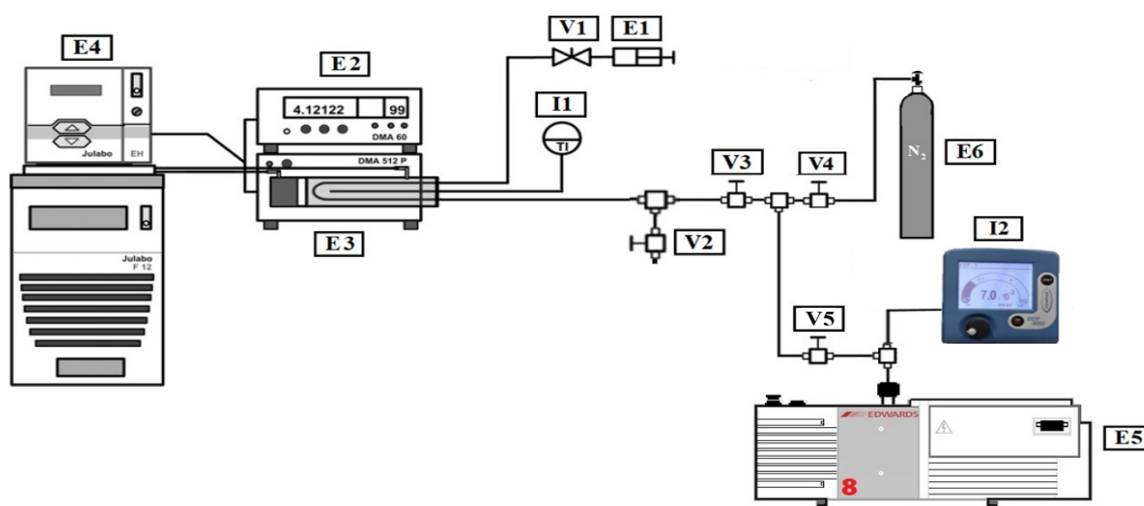


Figura 12: Esquema dos equipamentos utilizados na medida de massa volúmica, **E1:** seringa de vidro, **E2:** unidade DMA 60, **E3:** unidade DMA 512P, **E4:** banho termostático, **E6:** azoto para limpeza da linha, (**V1 - V4**): válvulas, **I1:** Pt100 e **I2:** medidor de vácuo.

Na Figura 12, os equipamentos principais são identificados pela letra E, os indicadores por um I e as válvulas por V. A seção de medida da massa volúmica é delimitada pelas válvulas V1 e V2, e é composta por tubos de aço inoxidável 1/8". A amostra entra no densímetro através de V1, utilizou-se uma seringa de plástico de 5 mL (E1). O densímetro de tubo vibrante é composto pelas unidades DMA 60 (E2) e DMA 512P (E3). Os períodos de vibração foram visualizados no display da unidade DMA 60 (E2). Utilizou-se um banho termostático circulante Julabo F12-ED (E4) com mistura água-etilenoglicol capaz de regular a temperatura do fluido em célula do densímetro com flutuações inferiores a 0.03 K.

A temperatura da amostra dentro do oscilador de tubo em U foi medida por uma sonda Pt100 (I1) com incerteza na temperatura de 0.01 K. A sonda é acoplada a um multímetro digital e é inserida num slot da célula de medição de alta pressão (DMA 512P). A sonda de resistência Pt100 foi previamente calibrada com um termómetro Isotech TTI-10 certificado

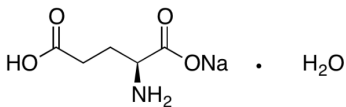
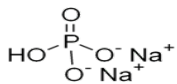
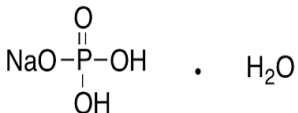
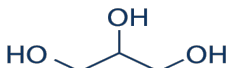
pela ITS90 com uma incerteza da ordem de 0.001 K. Para tal as sondas de resistência Pt100 e do termómetro padrão foram inseridas no banho termostático Julabo F12-ED.

O multímetro utilizado foi um Instek, Dual Display, modelo GDM-8245 e ISO-9001 certificado com incerteza de resistência $u(\Omega) = \pm 0.01 \Omega$ para a faixa de calibração até 500 Ω . Tomando em consideração as incertezas na temperatura de todos os dispositivos usados na calibração da sonda Pt100, (as incertezas nas constantes de calibração, as relativas à resistência do multímetro, à sonda Pt100 e as do termómetro de referência) a incerteza de temperatura estimada da curva de calibração utilizando a lei de propagação de erros foi calculada como 0.13 K. Para cada temperatura registou-se o período até não existir diferenças de 10 unidades (correspondente aproximadamente 0.01 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$).

3.2. REAGENTES

Na Tabela 2 estão apresentados os detalhes relativos aos reagentes, incluindo purezas, números de registo (CAS) e fornecedores. Foi preparada uma solução tampão com 10 mM, para tal foi utilizada água (HPLC) e fosfato de sódio (monobásico e dibásico) em $\text{pH} = 7.2$. As soluções GMS + tampão e LCOG + tampão foram preparadas por massa usando uma balança Mettler AT 200 com incerteza de 10^{-4} g. A incerteza na molalidade foi estimada como sendo inferior a 10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Tabela 2: Massa molar, pureza, fornecedores e CAS dos reagentes

Composto químico	Estrutura molecular	Massa molar	Pureza em % mássica	Fornecedor	CAS
Glutamato de sódio (GMS)		187.13 (g.mol ⁻¹)	> 99	Acros	6106-04-3
Fosfato de sódio (dibásico)		141.96 (g.mol ⁻¹)	> 99	Sigma	7732-79-4
Fosfato de sódio (monobásico e monohidratado)		137.99 (g.mol ⁻¹)	> 99	Sigma	7558-79-4
Glicerol		92.09 (g.mol ⁻¹)	0.995	Fisher	56-81-5
Lisozima clara do ovo da galinha	_____	14.3 (kDa)	> 99	Sigma	10049-21-5
Água (HPLC)	_____	18.015 (g.mol ⁻¹)	> 99.99	Scharlau	1250-88-3

3.3. MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA LISOZIMA

O cálculo de concentrações é feito geralmente pelo método da espectroscopia de absorção. A espectroscopia de absorção é uma técnica que se baseia na diminuição da intensidade de um feixe de luz, quando este atravessa uma amostra. No espectrofotômetro em vez da intensidade da luz absorvida o que se registra é o logaritmo da razão entre a intensidade da luz incidente e a intensidade da luz transmitida, ou seja, a absorvância ('Absorbancia',2019), (Lima 2013), Figura 13. A absorvância da lisozima foi medida num espectrofotômetro Spectronic Unicam UV530 UV/Vis com comprimentos de onda entre os 200 a 350 nm utilizando cuvettes de quartzo.

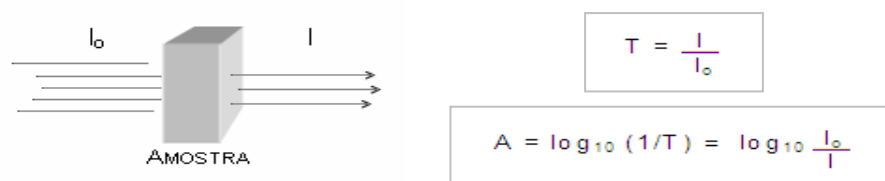


Figura 13: Transmitância (T) razão entre a intensidade da radiação transmitida pela amostra (I) e a intensidade da radiação incidente na amostra (I_0). A absorvância (A) logaritmo de base dez vezes o inverso da transmitância.

Segundo a lei de Beer-Lambert (Lima 2013) a absorvância de uma amostra (A) está diretamente relacionada com a concentração (C), com o coeficiente de extinção molar (ϵ) constante para uma dada substância dissolvida num dado solvente e medido para um dado comprimento de onda e a radiação que atravessa a amostra (l), expresso na equação [1].

$$A = \epsilon l C \quad [1]$$

Os aminoácidos que contêm cadeias laterais aromáticas (tirosina, triptofano e fenilalanina) exibem absorção de luz ultravioleta (UV). Conseqüentemente, as proteínas absorvem luz UV proporcionalmente à concentração total de aminoácidos aromáticos. Apenas os aminoácidos tirosina, triptofano e numa menor extensão da cistina (dois aminoácidos de cisteína ligados por uma ponte dissulfeto (S-S), como se verifica na lisozima) contribuem significativamente para a absorção a 280 nm da proteína. O coeficiente de extinção molar de uma proteína a 280 nm está relacionado com a sua composição em tirosinas, triptofanos e cistinas, correspondendo à soma dos coeficientes de extinção molar a 280 nm destes três aminoácidos multiplicados pelo número desses resíduos existente na proteína, como descrito pela equação [2] (Pace et al. 1995).

$$\varepsilon_{280nm} = (125 \times n^{\circ} \text{ cisteína}) + (1490 \times n^{\circ} \text{ tirosinas}) + (5500 \times n^{\circ} \text{ triptofanos})$$

[2]

O coeficiente de extinção molar da lisozima a 280 nm (ε_{280nm}) encontrado foi de 37970 M⁻¹ cm⁻¹. Sabendo o coeficiente de extinção molar da lisozima, a concentração da lisozima em solução pode ser calculada com a equação [1] medindo a absorvância de cada amostra a 280 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CALIBRAÇÃO DA SONDA DE PLATINA (Pt)

Como se referiu anteriormente a temperatura das amostras dentro do oscilador de tubo em U do densímetro é medida por uma sonda Pt 100 (I1) com incerteza de temperatura ± 0.01 K. A sonda está acoplada a um multímetro digital e é inserida no slot da célula de medição (DMA 512P). Esta configuração de multímetro digital com sonda de resistência Pt100 foi previamente calibrada com um termómetro Isotech TTI-10 certificado pela ITS90. Fazendo variar a temperatura do banho termostático Julabo F12-ED segundo intervalos de 5 °C, registavam-se as temperaturas do termómetro certificado e a sonda de resistência Pt100 correspondente a multímetro Instek, Dual Display.

Os valores de resistência (R) lido no multímetro e as temperaturas (T) registadas no termómetro padrão são apresentadas no Anexo B. Na Figura 14 apresenta-se o andamento de R em função de T para a curva de calibração. Pode observar-se que a dependência de R face a T é essencialmente linear do tipo da equação [3].

$$T/^{\circ}\text{C} = T_0 + T_1 * R/\Omega \quad [3]$$

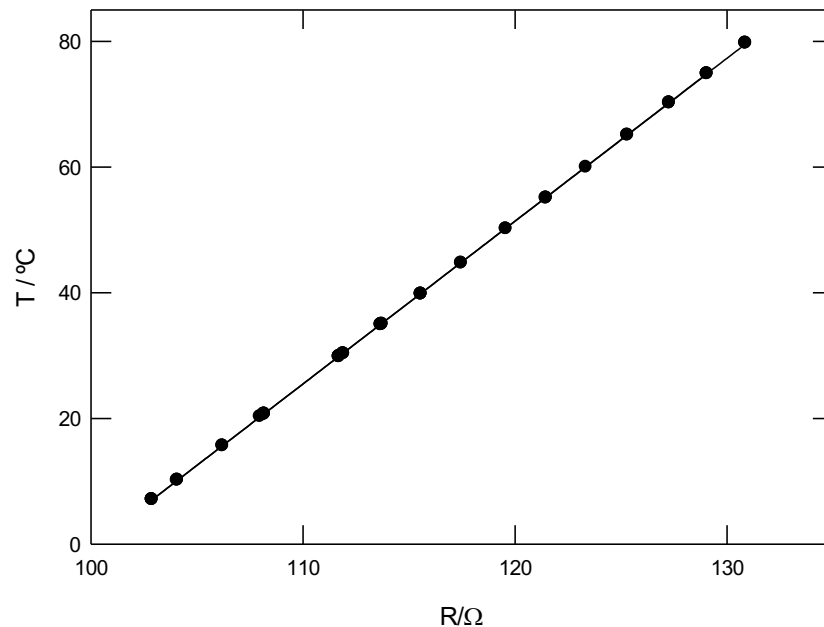


Figura 14: Temperatura (T) em função da resistência (R) do termómetro de platina para a curva de calibração.

Na Tabela 3 apresentam-se com detalhe os resultados do ajustamento de mínimos quadráticos pelo método de Lavenberg Marquardt (Protić e Stanković 2021). Verifica-se que o desvio relativo médio percentual (AARD) e desvio médio absoluto (AAD) são de valor baixo, indicativo de uma reta de calibração capaz de calcular a temperatura com desvios da ordem de 0.06 °C.

Tabela 3: Resultados do ajustamento de mínimos quadráticos da equação [3].

Parâmetro	Valor	Incerteza
T ₀ (K)	-259.1706	0.1279
T ₁ (K. Ω ⁻¹)	2.5878	0.0011
r ²	1.0000	----
σ (°C)	0.0610	----
AARD %	0.2500	----
AAD (°C)	0.0600	----

$$\text{AARD\%} = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{\rho_i^{\text{cal}} - \rho_i^{\text{exp}}}{\rho_i^{\text{exp}}} \right| \quad \text{AAD(}^{\circ}\text{C)} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |T_i^{\text{cal}} - T_i^{\text{exp}}|$$

Na Figura 15 apresentam-se os desvios absolutos (T_{cal} - T), onde T_{cal} são os valores calculados com a equação [3] e T são os valores experimentais (Tabela 3). Tendo em consideração a fórmula de propagação dos erros a incerteza na determinação da temperatura, u(T), será:

$$u(T)^2 = u_{\text{eq}}^2 + u_{\text{ter}}^2 + u_{\text{cel}}^2 + u_{\text{osc}}^2 \quad [4]$$

onde u_{eq}² é a incerteza associada com a utilização da equação de calibração (equação [3]), u_{ter}² = 0.001 °C é a incerteza que está associada ao termómetro padrão Isotech TTI-10 certificado pela ITS90, u_{cel}² = 0.01 °C² a incerteza associada à sonda de platina utilizada e u_{osc}² = 0.03 °C² a incerteza estimada para oscilações na temperatura na célula do densímetro. Tem-se que: u_{eq}² = (dT/dR)²u(R)² com u(R) = 0.01Ω, resulta u_{eq}² = 6.70×10⁻⁴ °C². Substituindo todos os valores necessários na equação [4] obtém-se u(T) = 0.04 °C. Observando a Figura 15 pode-se reparar que muitos desvios absolutos da temperatura estão próximos da incerteza prevista pela equação [4].

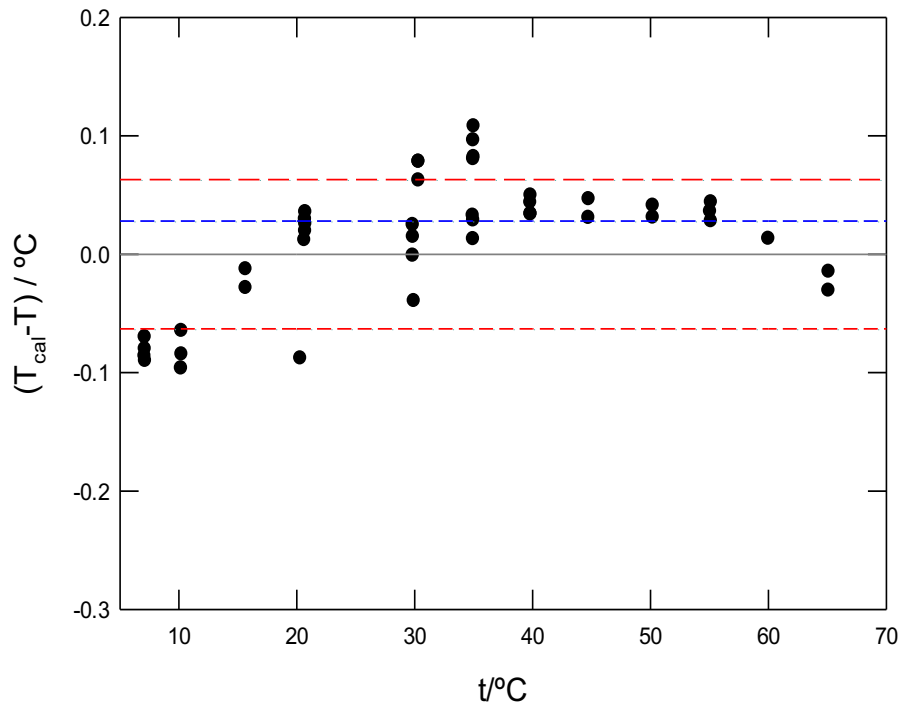


Figura 15: Desvios absolutos entre valores calculados da temperatura (T_{cal}) e experimentais (T). As linhas a tracejado de cor vermelha representam o valor de AAD.

4.2. CALIBRAÇÃO DO DENSÍMETRO

Na medição da massa volumica utilizou-se um densímetro de tubo vibrante. A parte principal deste aparelho é um tubo oco em forma de U que possui a capacidade de oscilar quando excitado eletricamente. Uma certa massa de amostra é colocada neste tubo e o que se mede é o período de frequência de ressonância para essa massa, o período τ é medido com grande precisão e relaciona-se com a massa volumica ρ através da equação [5] (Safarov et al. 2009).

$$\rho(T, \tau) = A(T) \cdot \tau^2(T) - B(T) \quad [5]$$

onde $\rho(T, \tau)$ é a massa volúmica à temperatura T , τ é o período de vibração, A e B são constantes de calibração. Estas constantes são determinadas por ajustamento a valores experimentais da massa volúmica de fluidos calibrantes.

A calibração de densímetros de tubos vibrantes normalmente requer a medição dos períodos de vibração de pelo menos dois fluidos de referência com valores de massa volúmica de baixa incerteza em amplas faixas de temperatura e pressão (Safarov et al. 2009).

Existem na literatura diferentes métodos para a calibração de densímetros de tubos vibrantes (Ihmels e Gmehling 2001), (May et al. 2014). O método (Lagourette et al. 1992) é mais utilizado e foi empregue neste trabalho. A água (w) é o fluido de referência mais utilizado, devido à existência de dados de massa volúmica de alta precisão que estão prontamente disponíveis («NIST» 2023). Como segunda referência considera-se o vácuo (v), para o qual a massa volúmica é considerada como zero. As equações [6] e [7] representam o cálculo das massas volúmicas respetivamente da água (w) e do vácuo (v).

$$\rho_w(T) = A(T) \cdot \tau_w^2(T) - B(T) \quad [6]$$

$$\rho_v(T) = A(T) \cdot \tau_v^2(T) - B(T) \approx 0 \quad [7]$$

Portanto da equação [7] mostra-se que:

$$A(T) = \frac{B(T)}{\tau_v^2(T)} \quad [8]$$

e substituindo a equação [8] em [6] vem:

$$\rho_w(T) = B(T) \left(\frac{\tau_w^2}{\tau_v^2} - 1 \right) \quad [9]$$

A massa volúmica da água pode ser retirada com grande precisão do («NIST» 2023) para os valores de temperatura para os quais os períodos τ_w , foram determinados. Desta forma, por ajustamento aos valores da massa volúmica da água, conhecendo os períodos de oscilação na água e no vácuo a cada temperatura obtêm-se os coeficientes B em função da temperatura. Resolvendo a equação [9] em ordem a B(T) obtém-se a equação [10].

$$B(T) = \frac{\rho_w}{\left(\frac{\tau_w^2}{\tau_v^2} - 1 \right)} \quad [10]$$

Uma vez conhecida a função B(T), a massa volúmica $\rho(T)$, de uma amostra desconhecida pode ser calculada pela equação [11].

$$\rho(T) = B(T) \left(\frac{\tau^2}{\tau_v^2} - 1 \right) \quad [11]$$

onde τ se refere ao período de oscilação do líquido da amostra a uma dada temperatura. Tal como se referiu antes para o cálculo B(T) de acordo com a equação [10] devem ser conhecidos os trios de valores (τ_v , τ_w , ρ_w) a cada temperatura. A Tabela 4 apresenta os valores de períodos de oscilação τ que foram medidos no densímetro de tubo vibrante em função da

temperatura T para o fluido de referência água. Os valores de massa volúmica ρ para cada temperatura foram retirados do («NIST» 2023).

Tabela 4: Períodos de oscilação (τ), temperatura (T) e a massa volúmica (ρ) para o fluido de referência água.

T/K	$\tau/\mu\text{s}$	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$	T/K	$\tau/\mu\text{s}$	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$	T/K	$\tau/\mu\text{s}$	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$
298.33	4.085783	997.00	313.54	4.093334	992.07	338.41	4.104908	980.41
298.38	4.085795	996.99	313.54	4.093337	992.07	338.41	4.104909	980.41
298.43	4.085813	996.97	319.03	4.095934	989.84	343.31	4.107139	977.67
298.41	4.085820	996.98	319.00	4.095940	989.85	343.33	4.107143	977.66
298.41	4.085826	996.98	319.00	4.095943	989.85	343.33	4.107146	977.66
303.48	4.087939	995.55	323.46	4.098017	987.89	348.46	4.109437	974.65
303.46	4.087929	995.56	323.46	4.098027	987.89	348.46	4.109448	974.65
303.43	4.087924	995.56	323.49	4.098031	987.88	348.46	4.109451	974.65
303.43	4.087919	995.56	323.49	4.098032	987.88	348.46	4.109452	974.65
308.82	4.090330	993.80	328.44	4.100333	985.55	353.05	4.111502	971.85
308.82	4.090342	993.80	328.41	4.100333	985.57	353.02	4.111505	971.87
308.80	4.090344	993.81	333.49	4.102634	983.02	353.26	4.111594	971.72
308.77	4.090341	993.82	333.46	4.102646	983.03	353.26	4.111597	971.72
313.54	4.093315	992.07	333.46	4.102649	983.03			
313.54	4.093326	992.07	338.41	4.104902	980.41			

^a $u(\tau) = 1.5 \times 10^{-5} \mu\text{s}$.

Os valores do período de oscilação (τ) que foram medidos experimentalmente em função da temperatura (T) para o fluido de referência vácuo a pressões da ordem de 5 Pa estão apresentados no Anexo C.

Com os valores da massa volúmica e dos períodos de oscilação da água e do vácuo na equação [10] determinou-se a cada temperatura, o valor do parâmetro B, por isso os períodos na água e no vácuo foram ajustados por polinómios na temperatura aos valores experimentais. Isto por dois motivos, em primeiro lugar os períodos em vácuo e para a água foram determinados a diferentes temperatura e pressão, em segundo lugar procurou-se um tratamento uniforme para os dois casos sendo mais apropriado dispor de funções para representar os períodos de oscilação. Considerou-se a equação [12] do tipo polinomial.

$$\tau_{v/w} = \sum_{i=0} c_{i,v/w} T^i \quad [12]$$

onde $c_{i,v}$ e $c_{i,w}$ são os coeficientes do ajustamento por mínimos quadráticos para o vácuo e a água, respetivamente.

Na Tabela 5 indicam-se os coeficientes $c_{i,v}$ e $c_{i,w}$ bem como os indicadores estatísticos dos ajustamentos.

Tabela 5: Coeficiente do ajustamento por mínimos quadráticos da equação [12].

Parâmetros	Valores
Vácuo (τ_v)	
$c_{0,v}$ (μs)	3.7469
$c_{1,v}$ ($\mu s.K^{-1}$)	3.7097×10^{-4}
$c_{2,v}$ ($\mu s.K^{-2}$)	2.3682×10^{-7}
r^2	1
σ (μs)	1.2686×10^{-5}
AARD (%)	2.2479×10^{-4}
AAD (μs)	8.8000×10^{-6}
Água (τ_w)	
$c_{0,w}$ (μs)	4.3574
$c_{1,w}$ ($\mu s.K^{-1}$)	-3.5508×10^{-3}
$c_{2,w}$ ($\mu s.K^{-2}$)	1.3017×10^{-5}
$c_{2,w}$ ($\mu s.K^{-2}$)	-1.3972×10^{-8}
r^2	0.9995
σ (μs)	0.0002
AARD%	3.6314×10^{-3}
AAD (μs)	1.4900×10^{-4}
$AARD\% = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left \frac{\tau_i^{cal} - \tau_i^{exp}}{\tau_i^{exp}} \right \quad AAD(\mu s) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \tau_i^{cal} - \tau_i^{exp} $	

Na Figura 16 são representados os valores experimentais (τ) registados para o período em vácuo e os calculados pela equação [12] (τ_{cal}). Observa-se boa concordância entre valores experimentais e calculados com a equação [12]. Na Figura 17 se representam os desvios absolutos entre os valores experimentais do período de oscilação do vácuo e calculados pela equação [12] em função da temperatura. Pode-se observar que a maioria dos valores das diferenças ($\tau_{cal} - \tau$) estão dentro dos limites de $AAD = 8.8 \times 10^{-6} \mu s$ referido na Tabela 7. Este valor é próximo ao valor da incerteza padrão $u(\tau) = 1.5 \times 10^{-5} \mu s$ indicado na Tabela 4.

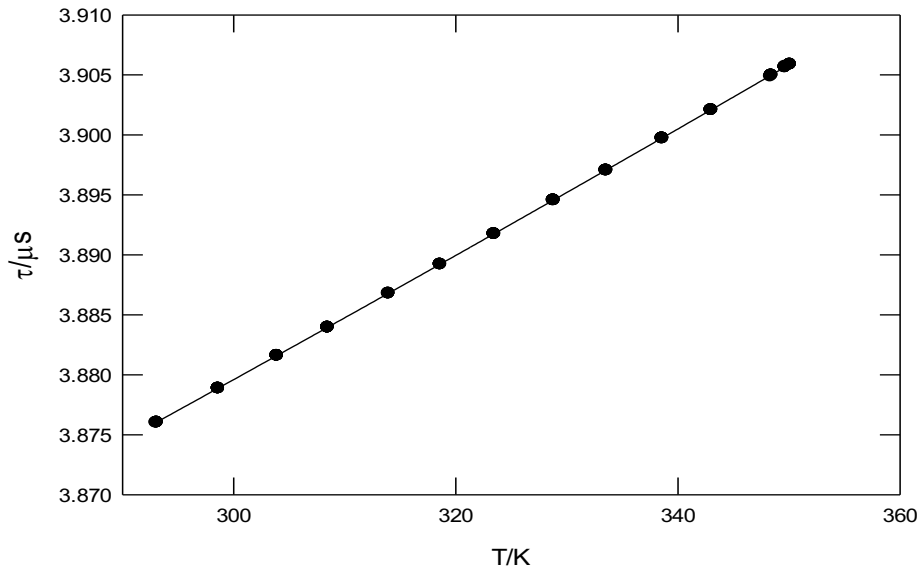


Figura 16: Período de oscilação em vácuo (τ) experimentais e calculados (τ_{cal}) pela equação [12].

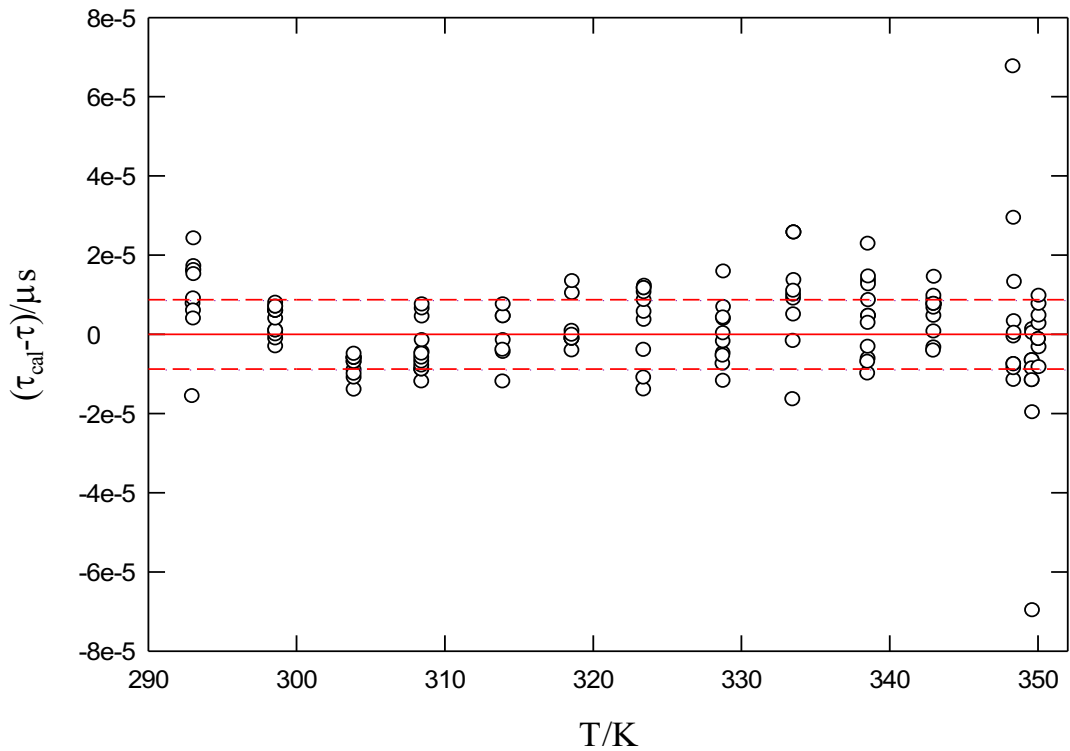


Figura 17: Desvios absolutos entre o período de oscilação em vácuo experimental (τ) e calculados (τ_{cal}) pela equação [12] em função da temperatura. As linhas a tracejado de cor vermelha representam o valor de AAD.

Os valores da função B(T) foram calculados pela equação [10] usando os dados indicados na Tabela 4 e 5, indicam-se na Tabela 6 e representam-se na Figura 18.

Tabela 6: Valores de B em função da temperatura T.

T (K)	B (kg.m ⁻³)	T (K)	B (kg.m ⁻³)
298.33	9103.73	323.49	9084.07
298.38	9103.76	323.49	9084.07
298.43	9103.71	328.44	9078.61
298.41	9103.73	328.41	9078.71
298.41	9103.73	333.49	9073.89
303.48	9102.84	333.46	9073.88
303.46	9102.87	333.46	9073.88
303.43	9102.81	338.41	9070.58
303.43	9102.81	338.41	9070.58
308.82	9099.52	338.41	9070.58
308.82	9099.52	343.31	9069.01
308.80	9099.54	343.33	9069.05
308.77	9099.57	343.33	9069.05
313.54	9095.23	348.46	9069.88
313.54	9095.23	348.46	9069.88
313.54	9095.23	348.46	9069.88
313.54	9095.23	348.46	9069.88
319.03	9089.20	353.05	9073.28
319.00	9089.22	353.02	9073.29
319.00	9089.22	353.26	9073.50
323.46	9084.09	353.26	9073.50
323.46	9084.09		

Da Figura 18 verifica-se que B é uma função decrescente em T com acentuado decréscimo na região de temperatura intermédia.

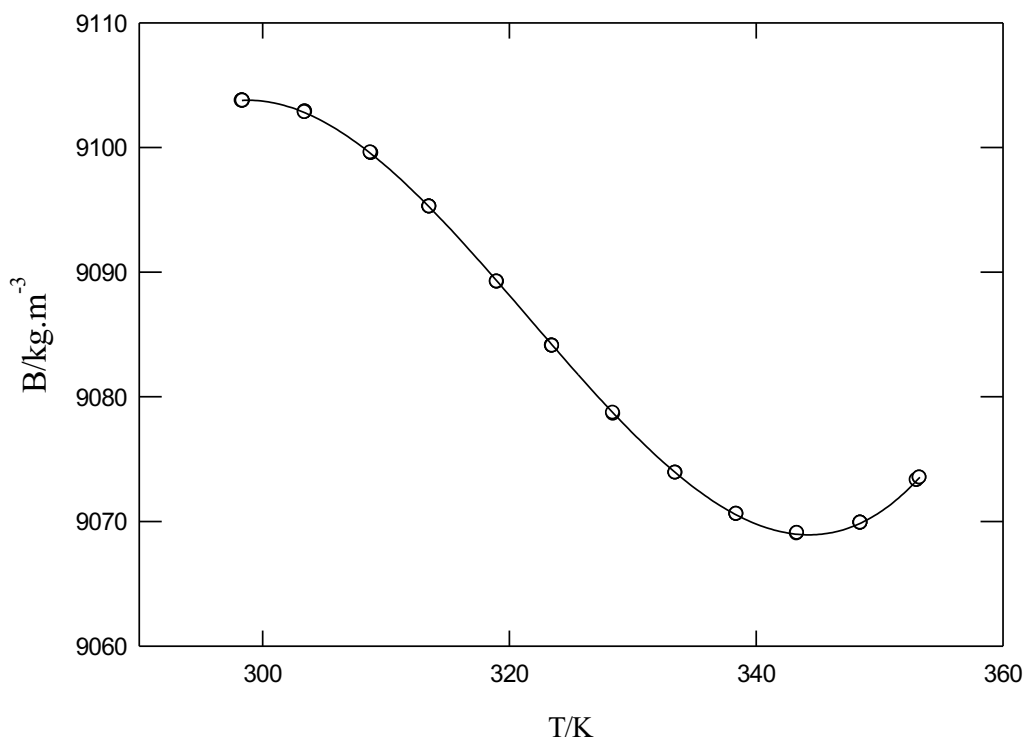


Figura 18: Parâmetro de calibração B em função da temperatura (T).

Para efeitos de cálculo da massa volúmica (ρ) de diferentes amostras a partir da curva de calibração dada pela equação [11], foi conveniente ajustar uma função polinomial na temperatura a B (T). Considerou-se para o efeito a equação [13].

$$B(T) = \sum_{i=0} b_i T^i \quad [13]$$

Na Tabela 7 apresentam-se os coeficientes b_i da equação [13], bem como os respetivos indicadores estatísticos. Da Tabela 7 pode concluir-se que a equação [13] representa de forma excelente o parâmetro B da curva de calibração com AARD = 5.5×10^{-4} (%) e AAD = 0.051 (kg.m⁻³).

Tabela 7: Coeficientes b_i da equação [13] e indicadores estatísticos.

Parâmetros	Valores
b_0 (kg.m ⁻³)	-15224.8
b_1 (kg.m ⁻³ .K ⁻¹)	229.119
b_2 (kg.m ⁻³ .K ⁻²)	-0.7161
b_3 (kg.m ⁻³ .K ⁻³)	7.4236×10 ⁻⁴
r^2	1.0000
σ (kg.m ⁻³)	0.05 kg.m ⁻³
AARD%	5.5 ×10 ⁻⁴
AAD/(kg.m ⁻³)	0.051

$$^a \text{AARD\%} = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{B_i^{\text{cal}} - B_i^{\text{exp}}}{B_i^{\text{exp}}} \right| \quad ^b \text{AAD}(\text{kg. m}^{-3}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |B_i^{\text{cal}} - B_i^{\text{exp}}|$$

Na Figura 19 representam-se os desvios absolutos, entre os valores de B registados na Tabela 6 e os calculados pela equação [13] B_{cal} com coeficientes b_i da Tabela 7. Os desvios absolutos de B estão compreendidos na faixa definida por $\text{AAD} = 0.051 \text{ kg.m}^{-3}$ como podemos observar na Figura 19 a zona com os limites a vermelho e são geralmente inferiores a 0.1 kg. m^{-3} de uma forma geral.

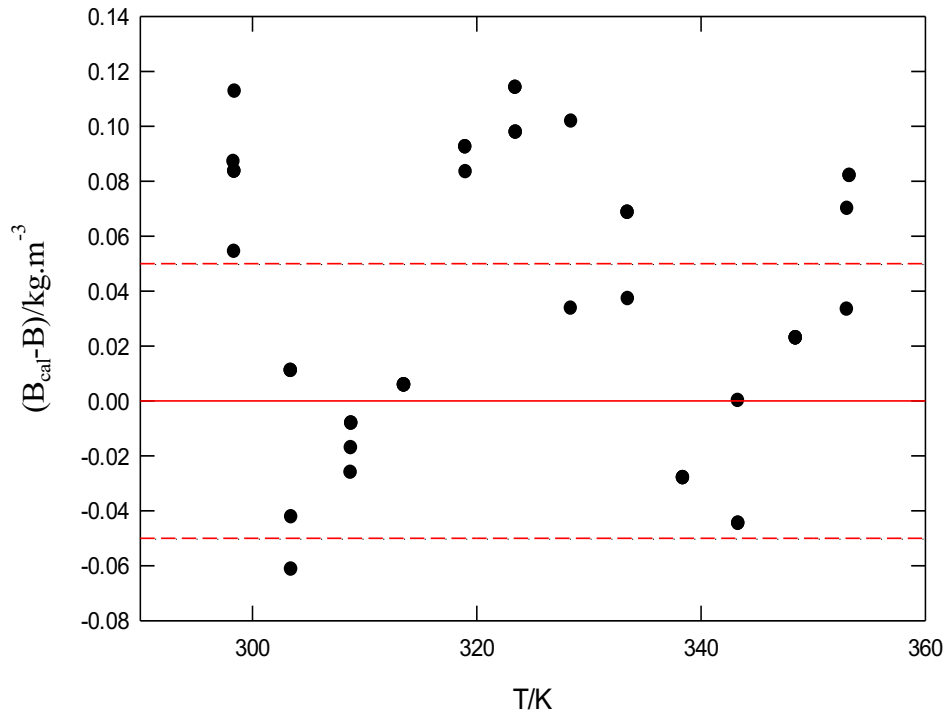


Figura 19: Desvios absolutos, entre os valores de B e os calculados B_{cal} , em função da temperatura (T). As linhas a tracejado de cor vermelha representam o valor de AAD.

Na Figura 20 apresentam-se os desvios absolutos para a massa volúmica da água calculada (ρ_{cal}) pela equação [11] e os valores de massa volúmica (ρ) da literatura (Kell 1975), (Tanaka et al. 2001) e («NIST» 2023). Pode observar-se que os desvios absolutos da massa volúmica caem na região $0.01 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ no intervalo $298 \text{ K} < T < 353 \text{ K}$.

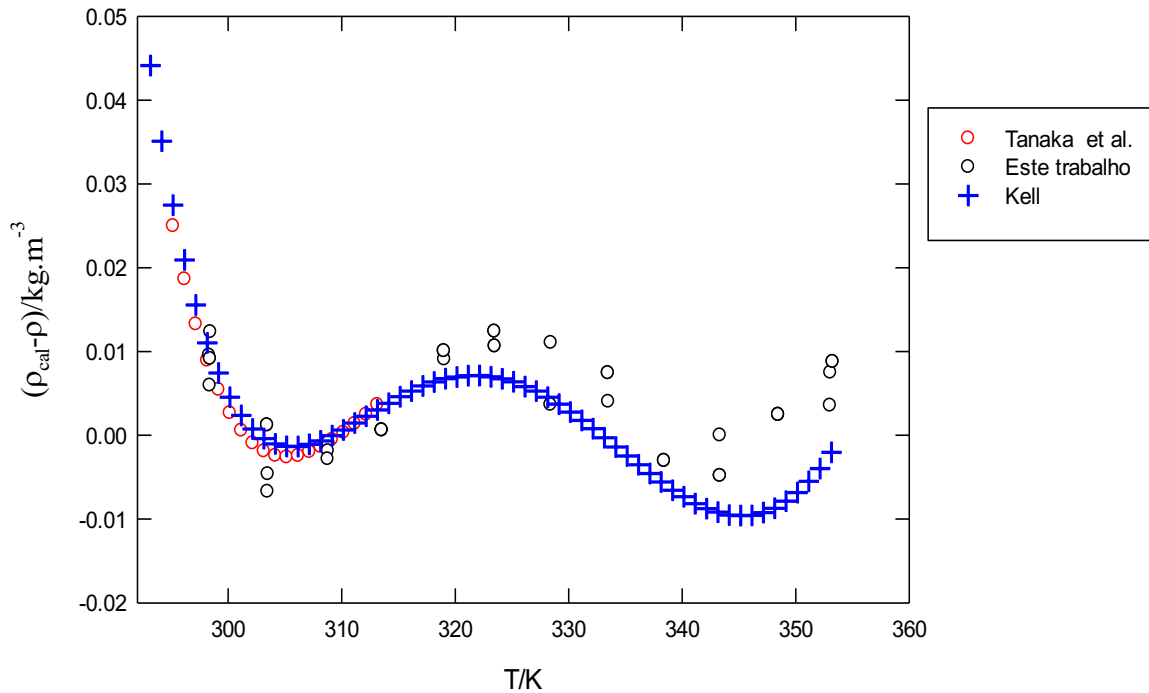


Figura 20: Desvios absolutos entre as massas volúmicas (ρ_{cal}) calculada pela equação [11] e os valores da literatura (Kell 1975), (Tanaka et al. 2001) e («NIST» 2023) (ρ) em função da temperatura (T) para a água.

Resumindo a determinação da massa volúmica ρ , de uma amostra líquida à pressão atmosférica, para a qual se mede o período τ , a uma dada temperatura T é calculada pela equação [11] em que os valores de B e τ_v são determinados a partir das equações [12] e [13], com os coeficientes retirados das Tabelas 5 e 7, respetivamente.

4.3. INCERTEZA NA MASSA VOLÚMICA

A incerteza na massa volúmica medida foi avaliada conforme descrito em («BIPM» 2023). A incerteza combinada é dada pela soma de várias parcelas através da equação [14].

$$u^2(\rho) = u_{\text{sistema}}^2 + u_{\text{calib}}^2 + u_{\text{refer}}^2 + u_{\text{impur}}^2 \quad [14]$$

onde u_{sistema}^2 , corresponde às incertezas devido a oscilações de temperatura dentro do densímetro, u_{calib}^2 corresponde às incertezas decorrentes do processo de calibração e relacionadas com a equação [11] usada na calibração, u_{refer}^2 é o termo de incerteza relacionado com a massa volúmica do líquido de calibração (água) e u_{imp}^2 é a incerteza para a impureza do calibrante (a água).

A contribuição u_{sistema}^2 é dada por:

$$u_{\text{sistema}}^2 = \left(\frac{\partial \rho}{\partial T}\right)^2 u^2(T) = (\alpha_p \times \rho)^2 u^2(T) \quad [15]$$

onde α_p é a expansividade térmica da água.

Como mencionado anteriormente, a incerteza da expressão $u(T) = 0.13$ K. A expansividade térmica α_p da água no intervalo de temperatura deste trabalho foi calculada a partir dos dados da massa volúmica utilizados na calibração do sistema, obtidos do («NIST» 2023). Da equação [15] resulta o valor médio $u_{\text{sistema}}^2 = 0.04 \text{ kg}^2 \cdot \text{m}^{-6}$ na região de temperatura $298 \text{ K} < T < 353 \text{ K}$ para água. Para o ar será aproximadamente nula dado que neste caso $\rho = 0 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

O termo de incerteza de calibração u_{calib}^2 foi calculado considerando a lei de propagação dos erros aplicada a equação [11].

Assim, a contribuição u_{calib}^2 , é:

$$u_{\text{calib}}^2 = \left[\left(\frac{\partial \rho}{\partial B}\right)^2 u^2(B) + \left(\frac{\partial \rho}{\partial \tau}\right)^2 u^2(\tau) + \left(\frac{\partial \rho}{\partial \tau_v}\right)^2 u^2(\tau_v)^2 \right] + \left(\frac{\partial \rho}{\partial T}\right)^2 u^2(T) \quad [16]$$

onde

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial B}\right)_{\tau, \tau_v} = \left(\frac{\tau^2}{\tau_v^2} - 1\right) \quad [17]$$

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial \tau}\right)_{B, \tau_v} = \frac{2B\tau}{\tau_v^2} \quad [18]$$

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial \tau_v}\right)_{B, \tau} = -\frac{2B\tau^2}{\tau_v^3} \quad [19]$$

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial T}\right) = \left(\frac{\partial \rho}{\partial B}\right)_{\tau, \tau_v} \left(\frac{\partial B}{\partial T}\right) + \left(\frac{\partial \rho}{\partial \tau}\right)_{B, \tau_v} \left(\frac{\partial \tau}{\partial T}\right) + \left(\frac{\partial \rho}{\partial \tau_v}\right)_{B, \tau} \left(\frac{\partial \tau_v}{\partial T}\right) \quad [20]$$

Os três primeiros termos da equação [16] entre parêntesis retos, referem-se à influência da incerteza inerente à utilização das equações [12] e [13] na equação [11]. Por isso nestes termos foram utilizados como incertezas padrões estimadas: $u(T) = 0.13 \text{ K}$, $u(B) = 0.05 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (Tabela 7), $\sigma(\tau) = 2 \times 10^{-4} \text{ }\mu\text{s}$ (Tabela 5) e $\sigma(\tau_v) = 1.3 \times 10^{-5} \text{ }\mu\text{s}$ (Tabela 5). O último termo na equação [16] refere-se à influência da incerteza da temperatura no cálculo da massa volúmica pela equação [11]. Inserindo todos os termos anteriores na equação [16], obtém-se o valor $u_{calib}^2 = (0.97)^2 \text{ kg}^2\cdot\text{m}^{-6}$, com variações muito pequenas (da ordem de $2 \times 10^{-3} \text{ kg}^2\cdot\text{m}^{-6}$) em cada ponto (T, τ), no intervalo de temperatura $298\text{K} < T < 353 \text{ K}$ para água. Convém aqui referir que a maior contribuição para u_{calib}^2 é a do termo $(\partial\rho/\partial\tau)^2 u^2(\tau)$ da equação [16], esta é da ordem de u_{calib}^2 .

Na realidade espera-se que a contribuição u_{calib}^2 seja menor que o valor encontrado, dado que a incerteza $\sigma(\tau) = 2 \times 10^{-4} \text{ }\mu\text{s}$ deve ser exagerada comparando com o valor $\sigma(\tau_v) = 1.3 \times 10^{-5} \text{ }\mu\text{s}$. Como referiu-se no caso da água, o banco de dados («NIST» 2023) foi usado para os dados de massa volúmica necessários para a calibração. Os dados do («NIST» 2023) são baseados na formulação IAPWS-95 (Wagner e Pruß 2002) cuja incerteza de massa volúmica é de 0.0001% à pressão atmosférica e temperaturas até 423K («NIST» 2023) (correspondente a desvios na massa volúmica de $0.001 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$). Consequentemente, u_{refer}^2 é da ordem de $1.0 \times 10^{-6} \text{ kg}^2\cdot\text{m}^{-6}$.

O efeito das impurezas na água para a incerteza na massa volúmica foi considerado como segue. Para a água, a pureza indicada apresentada na Tabela 4 inclui concentrações muito baixas de sais, permitindo concluir uma incerteza insignificante devido a impurezas e desta forma $u_{impur}^2 = 0$. Finalmente, considerando todas as incertezas, a incerteza combinada máxima estimada da equação [14] é $u(\rho) = 0.98 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

4.4. MASSA VOLÚMICA DO GLICEROL (SUBSTÂNCIA TESTE)

O glicerol é uma substância muito importante utilizado nas mais diversas áreas e a sua massa volúmica tem sido medida inúmeras vezes à pressão atmosférica. (Prieto et al. 2016), (Egas et al. 2021). Pode ser obtido com elevado grau de pureza até 99.9 % (m/m) e deste modo dado o seu baixo custo, pode ser utilizado como calibrante de massa volúmica (já o é para índice de refração). Por isso decidiu-se medir a massa volúmica do glicerol num extenso

intervalo de temperatura e como teste da curva de calibração da massa volúmica (equação [11]).

Na Tabela 8 apresentam-se os valores experimentais da massa volúmica para o glicerol, obtidos da curva de calibração a partir de dados (τ , R) (registados no Anexo D).

Tabela 8: Massa volúmica (ρ) do glicerol em função da temperatura (T).

T/K	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$	T/K	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$	T/K	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$	T/K	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$	T/K	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$	T/K	$\rho/\text{kg.m}^{-3}$
298.22	1259.10	308.69	1252.60	323.77	1241.20	333.75	1233.70	338.77	1230.10	347.92	1224.20
298.20	1259.30	308.69	1252.50	323.75	1241.30	333.75	1233.70	338.77	1230.10	347.92	1224.20
298.22	1259.20	308.69	1252.50	323.75	1241.30	333.75	1233.70	343.80	1226.70	353.00	1221.50
298.20	1259.30	313.56	1249.10	323.75	1241.30	333.75	1233.70	343.80	1226.70	353.00	1221.50
298.22	1259.30	313.56	1249.00	323.75	1241.30	333.72	1233.70	343.80	1226.70	353.02	1221.40
298.22	1259.30	313.54	1249.10	323.75	1241.30	333.72	1233.70	343.80	1226.70	353.02	1221.40
298.22	1259.30	313.54	1249.10	323.75	1241.20	333.72	1233.70	343.80	1226.70	353.02	1221.40
298.22	1259.30	313.54	1249.10	323.75	1241.20	333.72	1233.70	343.80	1226.70	353.00	1221.40
303.12	1256.40	313.54	1249.10	323.75	1241.20	333.75	1233.70	343.80	1226.70	353.00	1221.40
303.12	1256.30	313.54	1249.10	323.72	1241.30	333.72	1233.70	343.80	1226.70	353.00	1221.40
303.12	1256.30	318.51	1245.30	328.62	1237.50	338.77	1230.00	343.80	1226.70	353.00	1221.40
303.12	1256.30	318.51	1245.30	328.62	1237.50	338.77	1230.10	343.80	1226.70	353.00	1221.40
303.10	1256.40	318.51	1245.30	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.92	1224.10	353.00	1221.40
303.10	1256.40	318.51	1245.30	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.92	1224.20	353.02	1221.40
303.10	1256.40	318.51	1245.30	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.95	1224.10	353.02	1221.40
308.69	1252.60	318.51	1245.30	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.95	1224.10	353.02	1221.40
308.69	1252.60	318.51	1245.30	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.92	1224.20	353.02	1221.40
308.67	1252.70	318.51	1245.30	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.92	1224.20		
308.67	1252.60	318.49	1245.30	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.92	1224.20		
308.67	1252.60	318.49	1245.30	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.92	1224.20		
308.67	1252.60	323.77	1241.20	328.59	1237.50	338.77	1230.10	347.92	1224.20		

$$u(T) = 0.13 \text{ K}; u(\rho) = 0.97 \text{ kg.m}^{-3}$$

Para descrever os valores da massa volúmica do glicerol ajustou-se a função polinomial, equação [21], cujos coeficientes d_i e indicadores estatísticos são dados na Tabela 9.

$$\rho/\text{kg.m}^{-3} = \sum_{j=0}^2 d_j T^j \quad [21]$$

Verificando os valores do desvio padrão, de AARD e AAD da Tabela 9 pode concluir-se que a equação [21] traduz de forma excelente os resultados experimentais da massa volúmica do glicerol, os valores do desvio padrão e de AAD são inferiores à incerteza experimental.

Tabela 9: Coeficientes (di) da equação [21] e indicadores estatísticos.

Parâmetros	Valores
d_0 (kg.m ⁻³)	1571.8448
d_1 (kg.m ⁻³ . K ⁻¹)	-1.3260
d_2 (kg.m ⁻³ . K ⁻²)	9.4003×10^{-4}
r^2	0.9988
σ (kg.m ⁻³)	0.4
AARD%	0.03
AAD (kg.m ⁻³)	0.4

$$\text{AARD\%} = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{B_i^{\text{cal}} - B_i^{\text{exp}}}{B_i^{\text{exp}}} \right| \quad \text{AAD(kg. m}^{-3}\text{)} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |B_i^{\text{cal}} - B_i^{\text{exp}}|$$

Na Figura 21 apresentam-se os valores de massa volúmica do glicerol traduzidos pela equação [21] (Eq. 19), os valores experimentais (Este trabalho) e valores seleccionados de alguns autores (apresentados no Anexo E).

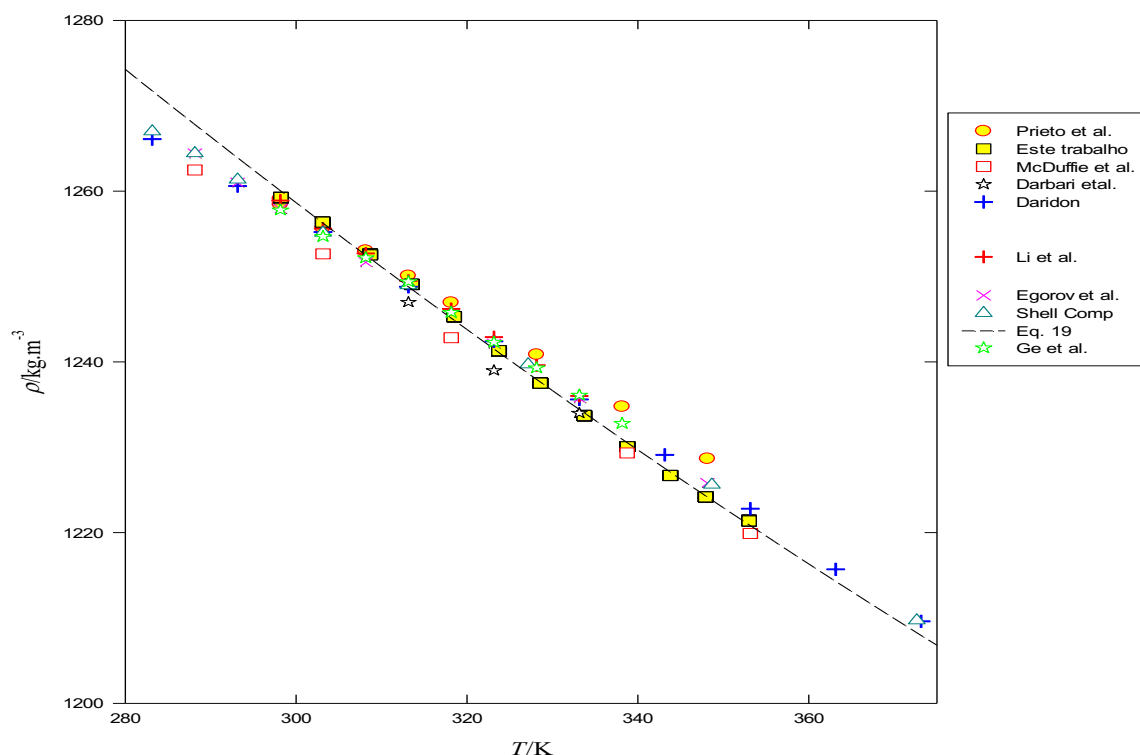


Figura 21: Comparação da massa volúmica do glicerol (ρ) dos valores obtidos neste trabalho com os da literatura em função da temperatura (T).

A Figura 22 representam-se os desvios relativos entre massa volúmica (ρ) calculada pela equação [21] e a calculada pelo conjunto de autores seleccionados (ρ_{cal}). Da observação da Figura 22 pode concluir-se que existe um conjunto de autores (Khelladi et al. 2009), (Li, Su, e Wang 2007), (Egorov, Makarov, e Kolker 2013), (Koohyar et al. 2011), (Ge, Ma, e Chu 2010), (Kijevčanin et al. 2013) para os quais os desvios relativos entre os valores deste estudo e desses autores são essencialmente positivos de cerca 0.1% para o intervalo de temperatura entre 298 K a 308 K passando depois a negativos da ordem de - 0.1 % até 353.15 K. Estes desvios representam desvios absolutos até cerca de 1.2 kg.m⁻³.

Os valores de (McDuffie et al. 1969) apresenta desvios positivos decrescentes com a temperatura enquanto os de (Palani, Srinivasan, e Lakshmi 2011) de (Adamenko et al. 2006), (Prieto et al. 2016) exibem desvios negativos maiores que 0.2 % (maiores que 2.5 kg.m⁻³) para temperaturas superiores a 320 K. Mesmo assim estes desvios não são exagerados, podendo afirmar-se que o valor da massa volúmica deste estudo concorda muito bem com a maioria dos valores da literatura em geral com desvios máximos de 1.5 kg.m⁻³.

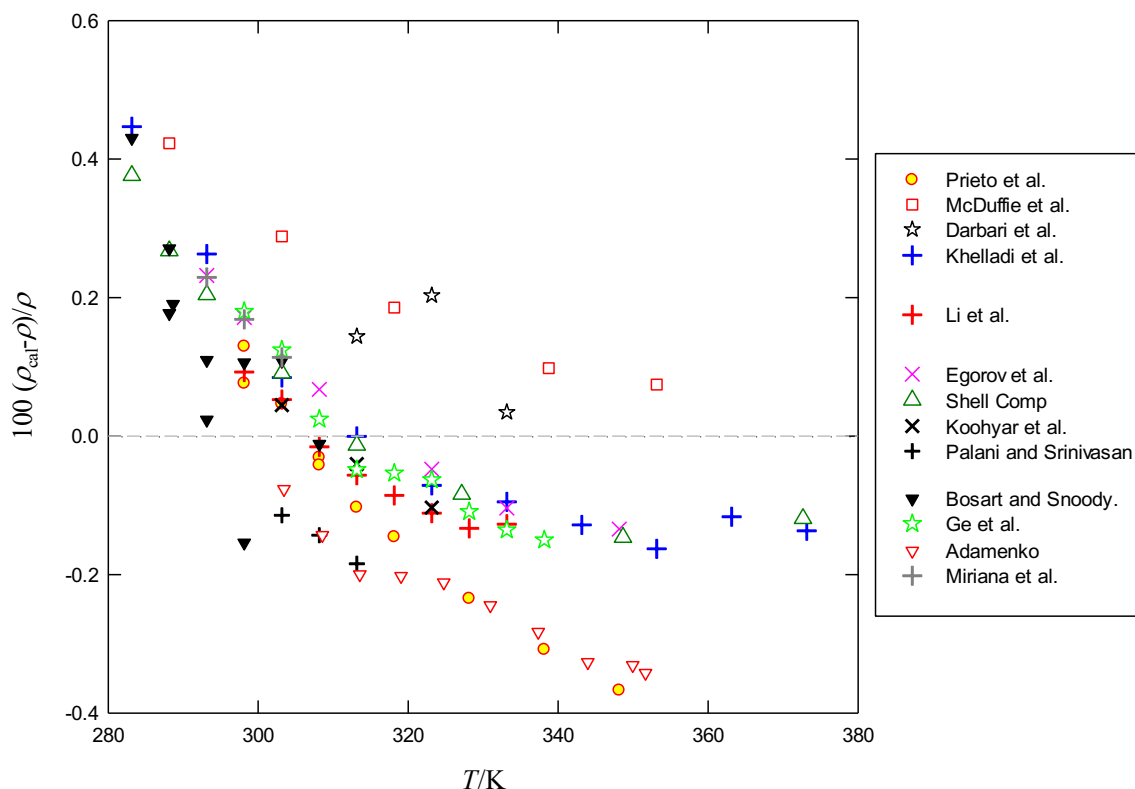


Figura 22: Desvios relativos entre a massa volúmica (ρ) calculada pela equação [19] e calculados pela literatura (ρ_{cal}) do glicerol em função da temperatura (T).

4.5. MASSA VOLÚMICA DAS SOLUÇÕES DO GMS

Após a calibração e teste do densímetro de tubo vibrante, procedeu-se ao registo dos períodos de vibração (τ) da solução tampão (no Anexo F) e das soluções aquosas de GMS no tampão (10 mM de fosfato de sódio com pH = 7) em função da resistência (R) com molalidades de 0.2546 (duas réplicas A1 e A2), 0.5219 (duas réplicas A1 e A2), 1.1006 (duas réplicas A1 e A2), 1,7477 e 2.4761 mol.kg⁻¹ (no Anexo G).

A massa volúmica das soluções aquosas de GMS dissolvido no tampão (10 mM de fosfato de sódio com pH = 7) com molalidade acima referidas foram determinadas pela equação [11]. Em cada sistema (GMS + tampão) foram feitas determinações da massa volúmica entre as temperaturas de 298.15 K a 353.15 K. A cada temperatura foram efetuadas várias réplicas de massa volúmica registando-se aquelas que correspondiam a variações do período de vibração de cerca de 10 μ s (correspondendo a aproximadamente ± 0.05 kg.m⁻³).

Na Tabela 10 apresentam-se os resultados da massa volúmica (ρ) em função da temperatura (T) à pressão atmosférica para todos estes sistemas. Apenas apresentam-se os resultados da massa volúmica média e do respetivo desvio padrão para a temperatura média do conjunto das temperaturas de cada determinação. Cabe aqui recordar que a informação para massa volúmica do glutamato existente na literatura ainda é muito escassa, existindo apenas resultados à temperatura de 298.15 K (Suzuki et al. 2001).

Tabela 10: Massa volúmica (ρ) da solução tampão de fosfato de sódio e do GSM em solução tampão em função da temperatura (T) e da molalidade (m).

m (mol.kg ⁻¹)	T (K)	ρ (Kg.m ⁻³)	σ_ρ (Kg.m ⁻³)	m (mol.kg ⁻¹)	T (K)	ρ (Kg.m ⁻³)	σ_ρ (Kg.m ⁻³)
0 (10mM fosfato)	298.04	1002.36	0.03	1.1006/A1	298.34	1082.74	0.05
	308.24	999.33	0.01		303.43	1079.83	0.03
	313.28	997.31	0.01		308.92	1076.47	0.04
	318.25	994.97	0.10		313.30	1073.68	0.00
	323.29	992.37	0.05		318.54	1069.96	0.03
	328.22	989.72	0.02		323.60	1065.90	0.02
	331.09	988.07	0.04		328.73	1061.91	0.03
	333.20	986.96	0.04		333.64	1057.87	0.04
	338.19	984.13	0.05		343.59	1049.22	0.04
	348.01	978.90	0.05		353.05	1039.68	0.05
0.2546/A1	353.11	976.51	0.01	1.1006/A2	298.35	1082.04	0.49
	347.92	979.26	0.10		303.35	1079.59	0.02
	346.01	980.29	0.03		308.29	1077.59	0.05
	313.28	998.04	0.02		313.26	1074.75	0.03
	293.80	1019.00	0.09		318.18	1071.99	0.03
	303.87	1013.27	0.14		323.15	1068.93	0.03
	313.91	1005.89	0.08		328.09	1065.56	0.09
	318.46	1001.48	0.04		333.03	1061.68	0.03
	323.53	996.57	0.07		337.95	1058.48	0.01
	333.09	986.31	0.12		342.86	1055.70	0.01
0.2546/A2	298.22	1012.57	0.05	1.7477	298.25	1126.65	0.05
	303.42	1010.43	0.01		303.82	1123.10	0.01
	308.77	1007.20	0.09		308.90	1120.22	0.03
	313.55	1003.97	0.03		313.57	1117.20	0.02
	318.70	1000.36	0.03		318.93	1113.54	0.03
	323.75	996.45	0.00		323.55	1110.32	0.02
	333.46	988.66	0.02		333.25	1103.00	0.02
	338.57	984.35	0.03		343.23	1095.15	0.03
	343.10	980.54	0.04		353.15	1086.22	0.01
	348.02	975.82	0.09		303.61	1164.29	0.04
0.5219/A1	353.13	970.79	0.10	2.4761	313.55	1157.93	0.07
	298.64	1037.39	0.02		323.47	1150.71	0.03
	303.25	1035.12	0.02		333.37	1143.41	0.02
	308.51	1032.27	0.02		343.20	1136.29	0.02
	313.59	1029.12	0.01		353.02	1129.04	0.07
	318.85	1025.60	0.02				
	323.77	1022.19	0.01				
	333.66	1014.60	0.03				
	343.32	1006.38	0.02				
	353.34	996.27	0.07				
0.5219/A2	298.34	1044.93	0.07				
	303.34	1041.69	0.36				
	308.32	1037.80	0.19				
	313.26	1034.16	0.18				
	318.22	1029.77	0.18				
	323.15	1025.33	0.08				
	328.09	1021.13	0.15				
	333.03	1016.92	0.06				
	337.96	1012.61	0.04				
	342.86	1006.73	0.15				
347.78	1001.01	0.50					
352.67	995.70	0.44					

$$\langle \rho \rangle = \sum_i \frac{\rho_i}{N}, \quad \sigma_\rho = \sqrt{\sum_i \frac{(\rho_i - \langle \rho \rangle)^2}{N - 1}}$$

O registo dos períodos de vibração (τ) no tampão (10 mM de fosfato de sódio com pH = 7.2) em função da resistência (R) encontram-se representados no Anexo F. Com estes valores experimentais de período obteve-se os valores de massa volúmica do tampão e foram ajustados a uma equação polinomial, a equação [22].

$$\rho(\text{kg.m}^{-3}) = -2191.88 + 29.6898T(K) - 0.0906496T^2(K) + 9.05675 \times 10^{-5}T^3(K) \quad [22]$$

a que corresponde $r^2 = 0.9998$ e desvio padrão $\sigma = 0.1 \text{ kg.m}^{-3}$.

A massa volúmica do tampão registada na Tabela 10 compara-se na Figura 23 com a massa volúmica da água com HPLC cujos valores do («NIST» 2023) foram tomados como referência na calibração do densímetro.

Da Figura 23 observa-se que a massa volúmica da água com HPLC é inferior à da solução tampão na região de temperatura considerada. Os valores diferem entre 4 kg.m^{-3} para as temperaturas intermédias 328 K a 348 K. Conclui-se que a adição de fosfato de sódio modifica ligeiramente a massa volúmica da água (cerca de 0.5 %).

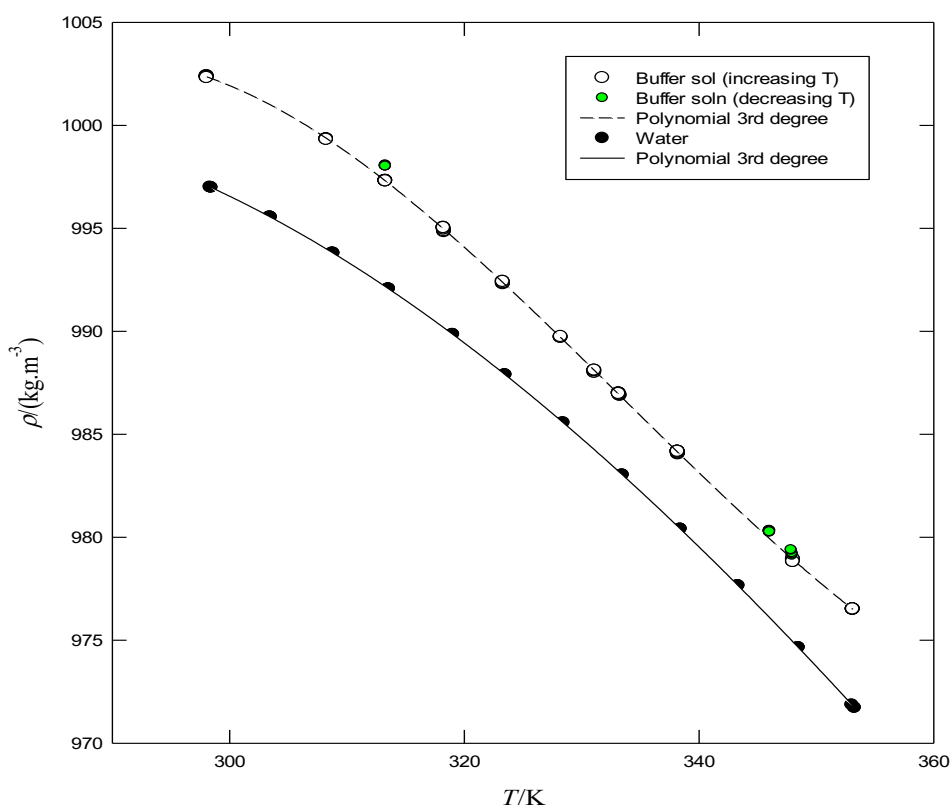


Figura 23: Massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de tampão de fosfato e da água HPLC em função da temperatura (T).

Ajustou-se uma equação polinomial aos valores da massa volúmica do GMS apresentados na Tabela 10 em função da molalidade das soluções (m) e a temperatura (T) como variáveis independentes, expressa pela equação [23].

$$\rho(m, T) = \sum_{i=0} \sum_{j=0} \rho_{i,j} m^j T^i \quad [23]$$

Os coeficientes ρ_{ij} da equação [23] foram determinados pelo método de Levenberg-Marquardt (Protić e Stanković 2021) com um grau de confiança de 95% e são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Coeficientes da equação [23] e parâmetros estatísticos relativos do ajustamento aos valores da massa volúmica da Tabela 13.

ρ_{ij}	Valor	r^2	σ_ρ (kg.m ⁻³)	AARD %	AAD (kg.m ⁻³)
$\rho_{0,0}$	772.5840	0.9980	2.2	0.15	1.6
$\rho_{0,1}$	109.5090				
$\rho_{0,2}$	-9.7254				
$\rho_{1,0}$	2.0633				
$\rho_{1,1}$	-0.1522				
$\rho_{2,0}$	-0.004.4427				
$\rho_{2,1}$	0.0003.3143				

$${}^a AARD\% = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{\rho_i^{cal} - \rho_i^{exp}}{\rho_i^{exp}} \right| \quad {}^b AAD(kg.m^{-3}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\rho_i^{cal} - \rho_i^{exp}|$$

Na Figura 24 faz-se a representação 3D da massa volúmica (ρ) do GMS em função de molalidade (m) e da temperatura (T). Os círculos a cheio representam os valores experimentais e a malha corresponde à superfície gerada pela equação [23].

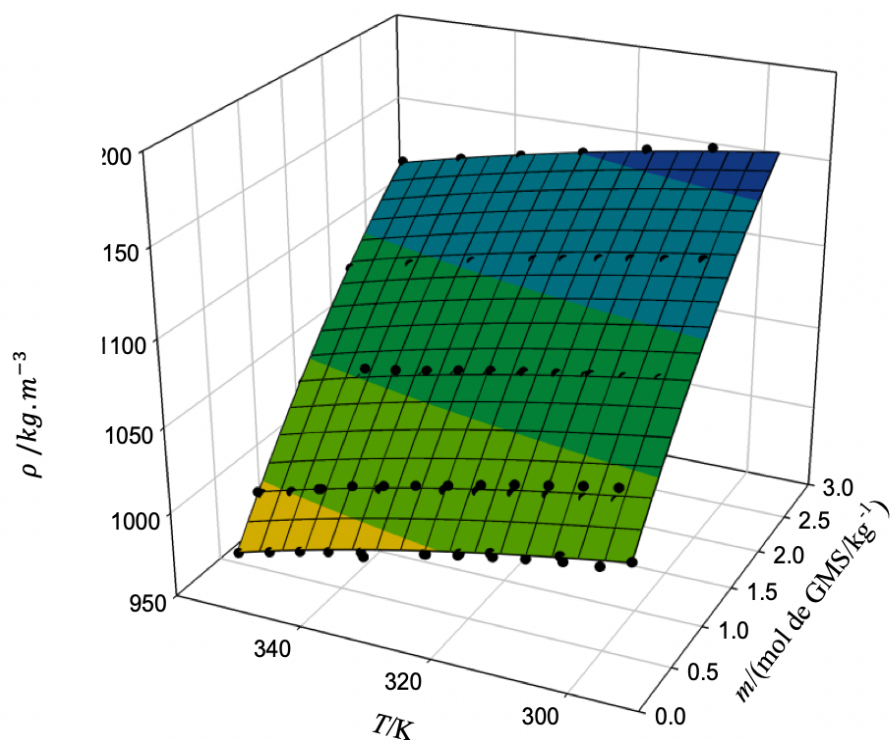


Figura 24: Representação 3D da massa volúmica das soluções de GMS em tampão (10 mM em fosfato de sódio com $\text{pH} = 7$) em função da temperatura (T) e da molalidade (m) de GMS.

Os valores experimentais da massa volúmica apresentados na Tabela 10 representam-se na Figura 25 onde também se comparam com os valores calculados resultantes da equação [23]. As linhas referem-se aos valores calculados com a equação [23].

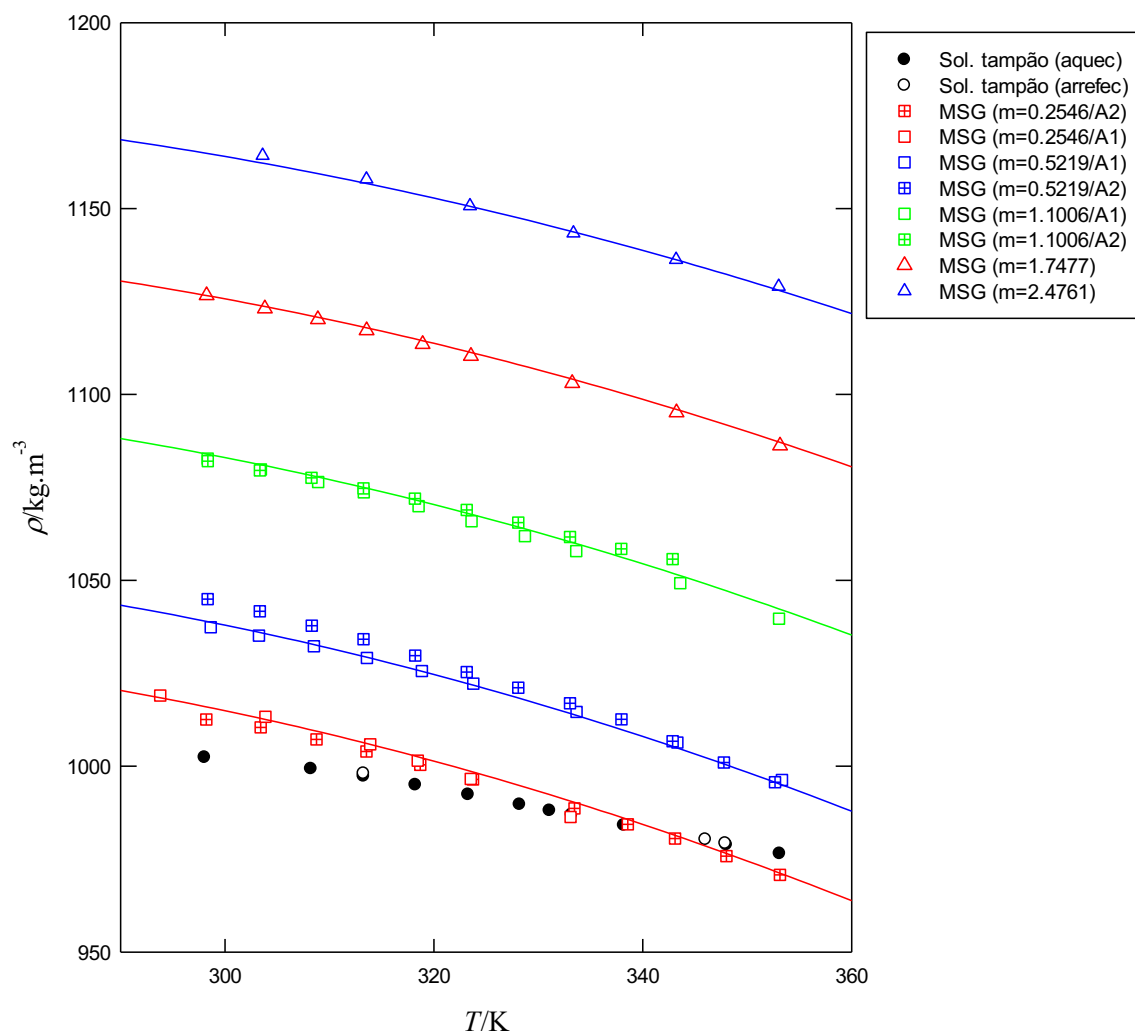


Figura 25: Massa volúmica das soluções aquosas de GMS (ρ) em tampão de fosfato para as variações de molalidade (m) em função da temperatura (T).

Da observação das Figuras 24 e 25 verifica-se que a massa volúmica é uma função suavemente quadrática na temperatura e na molalidade do sal. Ambas Figuras reforçam o bom ajustamento da equação [23] aos valores experimentais da massa volúmica das soluções de GMS.

Para uma comparação mais rigorosa entre os valores experimentais (ρ) e calculados pela equação [23] (ρ_{calc}) apresentam-se na Figura 26, os desvios relativos (%) em função da temperatura (T) para as molalidades (m) de sal que foram testadas. Pode concluir-se que os desvios relativos se situam na região definida pelo valor de $AARD = 0.15\%$ para a maioria dos ensaios. Alguns desvios claramente fora desta tendência são observados para as segundas replicas com $m = 0.2546$ e $m = 0.5219 \text{ mol.kg}^{-1}$ na região de temperatura $T < 343 \text{ K}$.

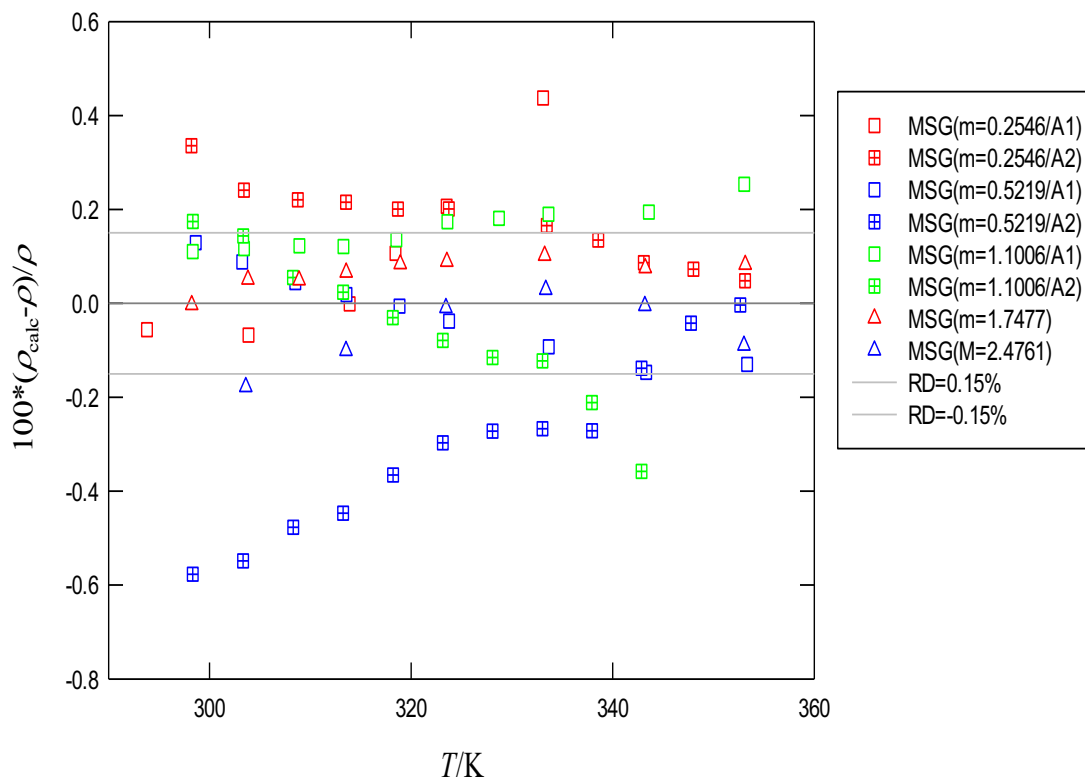


Figura 26: Desvios relativos percentuais da massa volúmica entre os valores experimentais (ρ) e calculada pela equação [23] (ρ_{calc}) das soluções de MSG em função da temperatura (T) para as variações de molalidade (m).

Suzuki et al. mediu a massa volúmica de GMS em soluções aquosas a 298.15 K à pressão atmosférica com um picnómetro tipo Ostwald (50 cm³). Saliente-se que este é o único conjunto de resultados encontrado para a massa volúmica do GMS em soluções aquosas. Para a comparação dos valores da massa volúmica deste trabalho com os de Suzuki et al. a 298.15 K, procedeu-se ao ajustamento dos valores dessa propriedade referido na Tabela 10, a polinómios de terceiro grau na temperatura. Com esses polinómios calcularam-se os valores da massa volúmica a 298.15 K em função da molalidade (m). Estes valores foram depois ajustados a uma equação quadrática em (m), obtendo-se equação [24].

$$\rho(\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}) = 992.224 + 91.0387m - 8.15562m^2 \quad [24]$$

a que corresponde $r^2 = 0.994$ e $\sigma = 1.5 \text{ kg/m}^3$.

Na Figura 27 comparam-se os valores da massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de GMS em tampão em função da molalidade (m) a 298.15 K deste trabalho com os que foram medidos por (Suzuki et al. 2001) à mesma temperatura, para soluções aquosas de GMS.

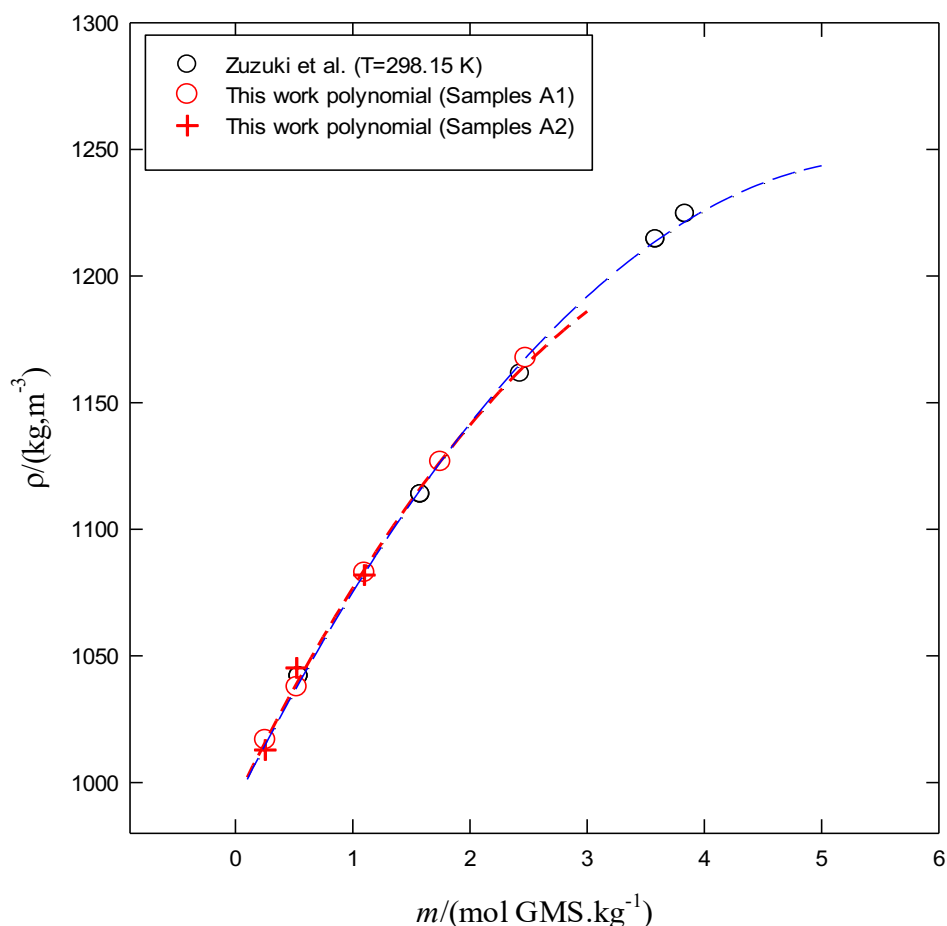


Figura 27: Comparação dos valores de massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de GMS em tampão de fosfato, em função da molalidade (m) a 298.15 K deste trabalho com as medidas por Suzuki et al a mesma temperatura.

Como se pode verificar a concordância das massa volúmicas deste trabalho e as medidas por (Suzuki et al. 2001) é excelente. Os desvios mínimo e máximo são -0.06% (-0.6722 kg/m³) e 0.32% (3.7077 kg/m³) no intervalo de molalidade $0.54 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1} < m < 3.84 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

4.6. VOLUME MOLAR APARENTE DAS SOLUÇÕES DO GMS

Os volumes molares do GMS nas soluções de tampão foram calculados pela equação [25] (Singh 2007).

$$V_{\varphi} = \frac{M}{\rho} + \frac{1000}{m} \left(\frac{\rho_0 - \rho}{\rho_0 \rho} \right) \quad [25]$$

onde m é a molalidade da solução (mol. g^{-1}), ρ e ρ_0 são as massas volúmicas da solução de GMS e do tampão respetivamente (g.cm^{-3}) registados a uma dada temperatura e M designa a massa molar do soluto glutamato de sódio ($M = 169.11 \text{ g.mol}^{-1}$).

Para cálculo dos valores da massa volúmica (ρ) das soluções de GMS utilizou-se a equação [23] dada a boa representação dos valores experimentais conseguida por esta equação enquanto para ρ_0 se calculam com a equação [22]. Na Tabela 12 mostram-se os valores do volume molar aparente do GMS nas soluções tampão de fosfato para as gamas de molalidade e temperatura experimentais.

Tabela 12: Volumes molares aparentes do GMS na solução tampão de fosfato determinados pela equação [25].

m (mol.kg^{-1})	T (K)	V_{φ} ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$)	m (mol.kg^{-1})	T (K)	V_{φ} ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$)	M (mol.kg^{-1})	T (K)	V_{φ} ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$)
0.5219	298.15	83.3	0.5219	323.15	102.1	0.5219	353.15	133.6
1.7477	298.15	87.1	1.1006	323.15	95.1	1.1006	353.15	106.2
2.4761	298.15	87.8	1.7477	323.15	90.9	1.7477	353.15	96.3
1.1006	298.15	89.6	2.4761	323.15	90.9	2.4761	353.15	94.0
0.5219	303.15	87.8	0.5219	333.15	109.6			
1.7477	303.15	88.1	1.1006	333.15	97.7			
2.4761	303.15	88.5	1.7477	333.15	92.3			
0.5219	313.15	95.4	2.4761	333.15	91.8			
1.1006	313.15	92.7	0.5219	343.15	119.5			
1.1006	313.15	91.5	1.1006	343.15	101.3			
1.7477	313.15	89.7	1.7477	343.15	93.9			
2.4761	313.15	89.8	2.4761	343.15	92.8			

Ajustou-se uma equação polinomial da forma descrita na equação [26] aos valores do volume molar aparente do GMS.

$$V_{\varphi}(m, T) = \sum_{i=0}^2 \sum_{j=0}^2 v_{i,j} m^j T^i \quad [26]$$

Os coeficientes v_{ij} da equação [26] foram determinados pelo método de Levenberg-Marquardt (Protić e Stanković 2021) com um grau de confiança de 95% e são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Coeficientes da equação [26] e parâmetros estatísticos do ajustamento.

v_{ij}	Valor	r^2	σ (cm ³ .g ⁻¹)	AARD (%)	AAD (kg.m ⁻³)
$v_{0,0}$	710.8680	0.9848	1.3	0.9	0.8
$v_{0,1}$	-501.4030				
$v_{0,2}$	90.5735				
$v_{1,0}$	-5.1346				
$v_{1,1}$	4.3018				
$v_{1,2}$	-0.8537				
$v_{2,0}$	0.0101				
$v_{2,1}$	-8.6946×10^{-3}				
$v_{2,2}$	1.8183×10^{-3}				

$$AARD\% = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{v_{\varphi}^{cal} - v_{\varphi}^{exp}}{v_{\varphi}^{exp}} \right| \quad AAD(kg.m^{-3}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |v_{\varphi}^{cal} - v_{\varphi}^{exp}|$$

A representação tridimensional dos valores do volume molar aparente (V_{φ}) em função de m e T é apresentada na Figura 28 onde os círculos a cheio representam os valores experimentais da Tabela 12 e a malha corresponde à superfície gerada pela equação [26]. Os indicadores estatísticos da Tabela 13 em particular os valores de AARD% e AAD e a malha 3D gerada na Figura 28 permitem concluir que a equação [26] consegue uma representação razoável do comportamento (m, T, V_{φ}) para as soluções de GMS.

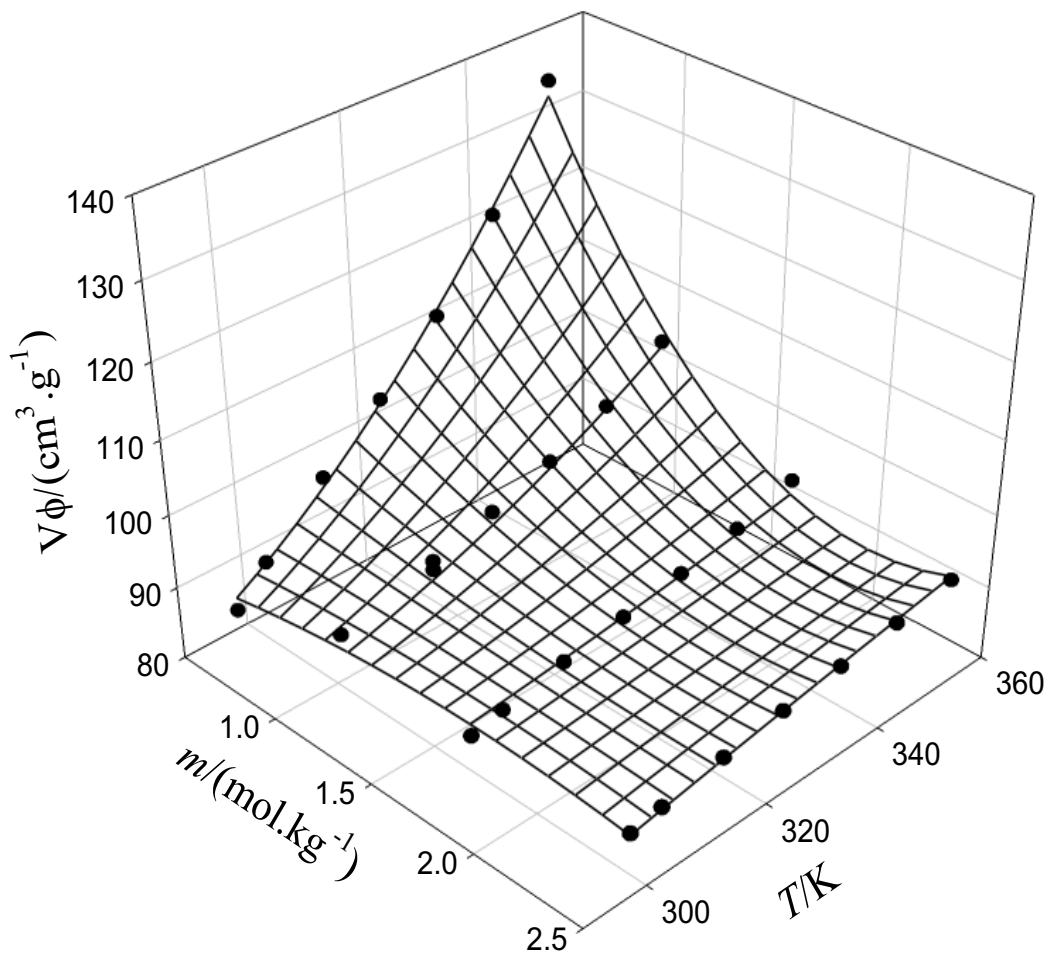


Figura 28: Representação 3D do volume molar aparente (V_ϕ) do GMS na solução tampão de fosfato em função da temperatura (T) e da molalidade (m).

Os valores registados na Tabela 12 foram comparados à temperatura de 298.15 K com os referidos por (Suzuki et al. 2001) na Figura 29. Pode verificar-se que os valores deste estudo estão em boa concordância com os de (Suzuki et al. 2001) que foram determinados para soluções aquosas. Apenas para os valores de $m = 1.1006 \text{ mol.kg}^{-1}$ não se verifica tão bem a concordância.

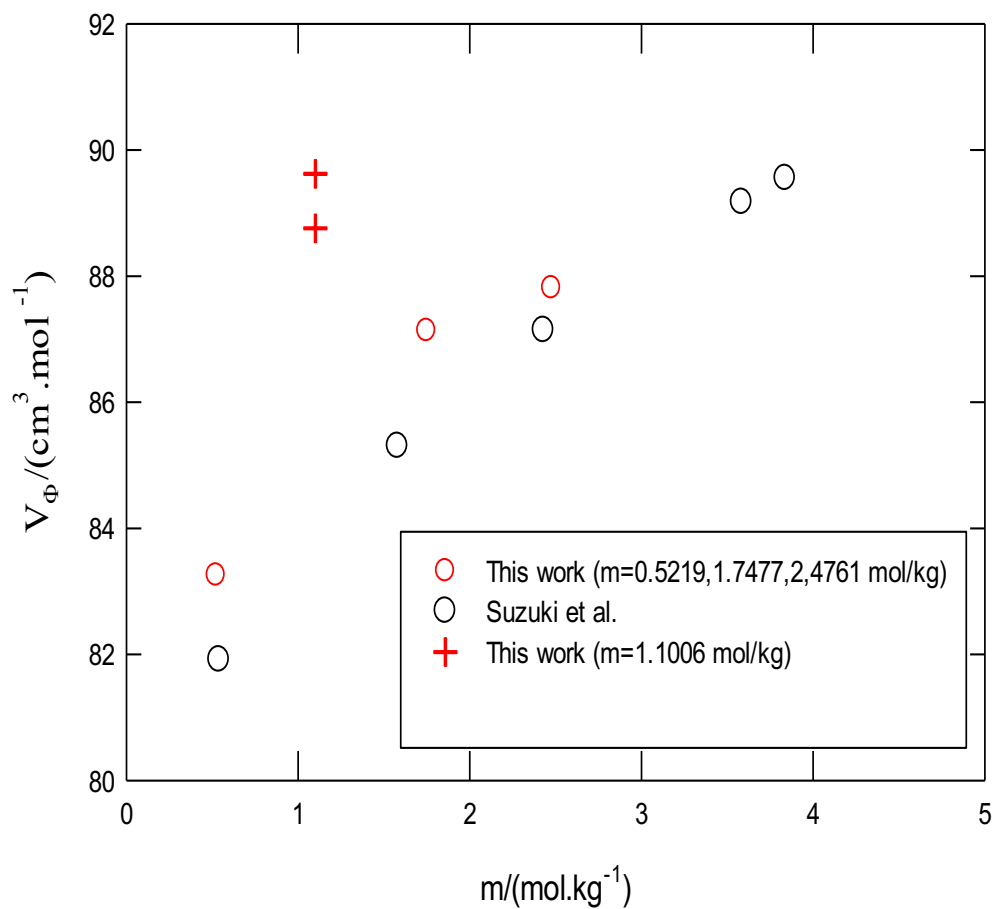


Figura 29: Volume molar aparente (V_ϕ) do GMS na solução tampão de fosfato de sódio (com pH= 7) em função da molalidade (m) à temperatura de 298.15 K comparados com os determinados por (Suzuki et al., 2001) para as soluções de sal.

Na Figura 30 representam-se os valores de V_ϕ do GMS nas soluções de tampão, em função da molalidade (m) para cada temperatura (T).

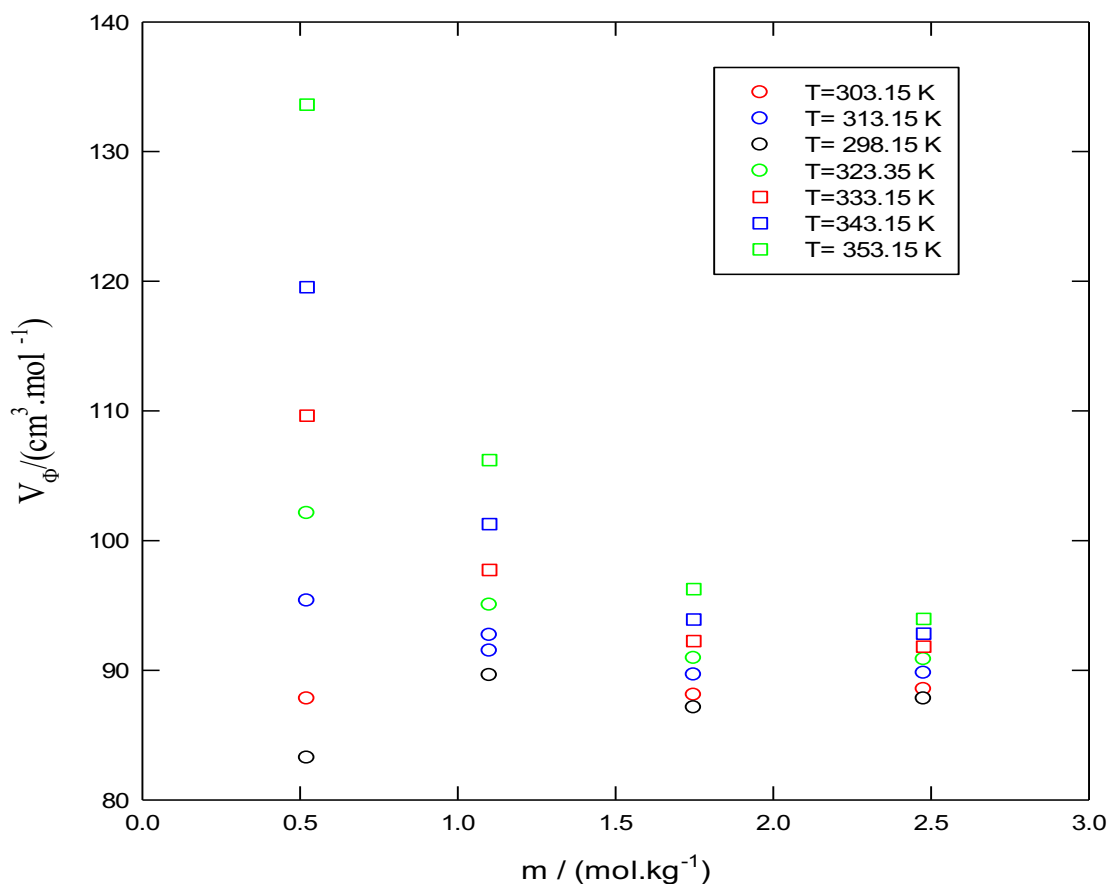


Figura 30: Volume molar aparente (V_ϕ) do GMS na solução tampão de fosfato em função da molalidade (m).

Observando as Figuras 29 e 30, verifica-se que o andamento do volume molar aparente do GMS em função da molalidade se altera sensivelmente para temperaturas superiores a 303.15 K. Abaixo deste valor de temperatura, V_ϕ aumenta com m enquanto para valores superiores a 303.15 K, V_ϕ diminui cada vez mais acentuadamente com m . Da Figura 30 observa-se que para molalidades superiores a 1.5 mol.kg⁻¹ os valores de V_ϕ não apresentam variação acentuada comparando com valores de molalidades inferiores a 1.5 mol.kg⁻¹.

A partir da equação [26] calculou-se o volume molar aparente a diluição infinita, V_ϕ^0 , também conhecido como volume parcial molar padrão. Da equação [26] facilmente se deduz que o volume molar aparente a diluição infinita, V_ϕ^0 , define-se pela equação [27].

$$(V_\phi^0) = \lim_{m \rightarrow 0} V_\phi(m, T) = \lim_{m \rightarrow 0} \sum_{i=0} \sum_{j=0} v_{i,j} m^j T^i (V_\phi^0) \quad [27]$$

Como resultado da equação [27] o V_ϕ^0 do GMS define-se pela equação [28].

$$V_{\phi}^0(\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}) = 710.868 - 5.135 T + 0.01014 T^2 \quad [28]$$

Os valores de V_{ϕ}^0 calculados pela equação [28] estão representados na Figura 31.

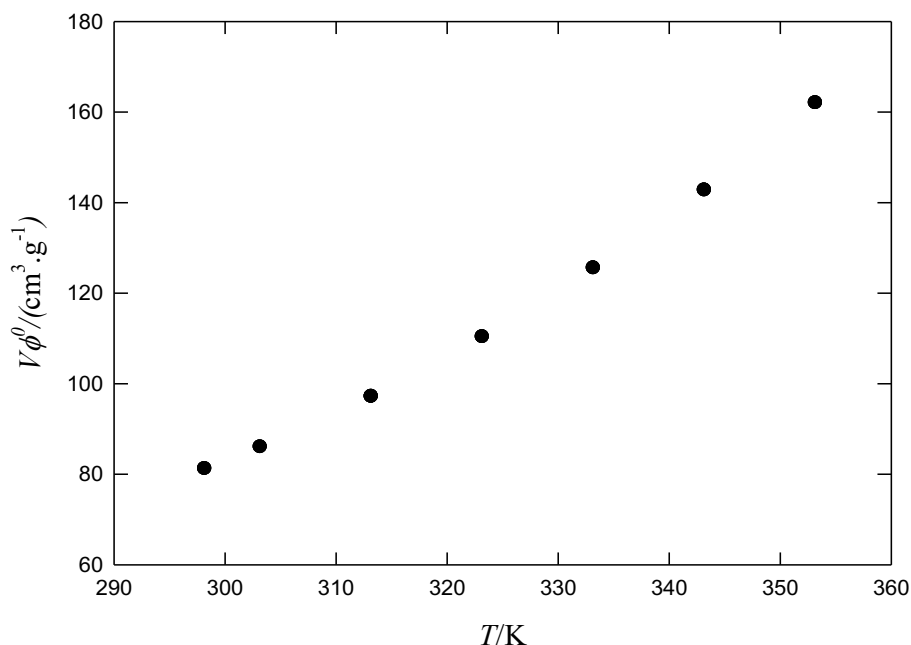


Figura 31: Volume molar aparente a diluição infinita (V_{ϕ}^0) das soluções de GMS em função da temperatura (T).

É reconhecido que o volume molar aparente de soluções aquosas a diluição infinita se torna idêntico ao volume parcial molar. Os valores de V_{ϕ}^0 são influenciados pela água perto dos aniões do GMS e pelos catiões sódio existentes, e essa água não tem o mesmo volume molar que a água pura. O comportamento observado na Figura 30 e 31 poderá ser em parte devido às espécies do ácido glutâmico prevalentes nas condições de pH das soluções pelas razões discutidas na introdução (ver secção 2.3, páginas 13 e 14). Por este motivo determinou-se a variação de pH com a concentração de GMS na solução tampão. Os valores apresentam-se na Tabela 14.

Tabela 14: Variação do pH das soluções de GMS com a concentração do sal (em molaridade).

Solução	PH (medido a T = 25 °C)	
	1ª Medição	2ª Medição
2 M	6.90	6.92
1.5 M	6.86	6.85
1 M	6.82	6.82
0.75 M	6.81	6.81
0.5 M	6.82	6.82
0.25 M	6.89	6.89
0.1 M	7.02	7.03
tampão	7.20	7.21

Como se mostra na Tabela 14 os valores de pH da solução tampão não diferem muito entre si com o aumento de concentração das soluções de GMS de 0.1 M para 2M (ou seja, nas condições de concentrações das soluções testadas). Nota-se, no entanto, a tendência de diminuição do pH com o aumento de concentração da solução relativamente ao valor inicial de pH da solução tampão (pH = 7.2). Tendo que a variação máxima relativamente a este valor ocorre para a solução de 0.75 M em GMS (variação de 5.5%). De qualquer modo para os valores de pH em toda a gama de concentrações de GMS a espécie aniónica existente é a apresentada (Moldovan et al. 2021) na Figura 32.

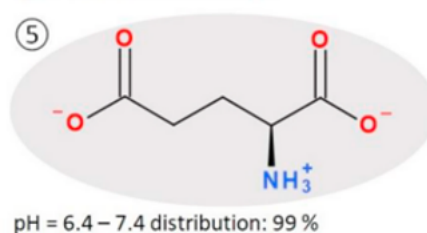


Figura 32: Espécie aniónica do ácido glutâmico prevalente nas condições das soluções de GMS. Adaptado de (Moldovan et al., 2021).

Desta forma será de esperar interações atrativas de Coulomb com energia apreciável entre as diferentes espécies aniónicas do GMS e entre estas espécies com os dipolos circundantes da água gerando uma possível camada (ou camadas) de solvatação. Dada a existência de espécies aniónicas de GMS e catiónicas do Na^+ , ilustrada na Figura 32 em interação temos um quadro muito complexo difícil de avaliar. Podem tirar-se algumas conclusões através da determinação da expansividade molar aparente $(\partial V_\phi^0 / \partial T)_p$ e da sua segunda derivada $(\partial^2 V_\phi^0 / \partial T^2)_p$. A primeira derivada da equação [28] é a equação [29].

$$\left(\frac{\partial V_{\phi}^0}{\partial T}\right)_p = -5.135 + 2.0279 \times 10^{-2}T \quad [29]$$

esta equação corresponde a valores positivos de $\left(\frac{\partial V_{\phi}^0}{\partial T}\right)_p$, o que de acordo com os estudos encontrados na literatura sugere que com o aumento de temperatura se libertam moléculas de água da camada(s) de solvatação do glutamato de sódio contribuindo para um aumento ou diminuição do volume total do sistema, efeito mais importante às temperaturas mais elevadas já que expansividade molar aparente aumenta com o aumento de temperatura (embora este aumento seja porventura exagerado). Quer dizer, a temperaturas elevadas as interativas entre a água e os aniões glutamato são contrariadas mais facilmente que às temperaturas mais baixas a cerca de 303 K.

A análise da segunda derivada $\left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_p$ utiliza a teoria de (Hepler 1969) segundo a qual $\left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_p > 0$ corresponde a uma ação do soluto no sentido de apresentar uma natureza estruturante (o soluto desloca o estado equilíbrio no sentido da formação de aglomerados de água menos densos “structure making”) e quando $\left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_p < 0$ o soluto manifesta uma ação de quebra de estrutura (“structure breaking”- aglomerados de água mais densos).

No caso do GMS, $\left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_p = 0.02 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \text{K}^{-2}$ e deste modo, o glutamato será um soluto com tendência estruturante nas soluções aquosas de tampão de fosfato onde a água se aglomera em torno dos iões de glutamato. Resulta um aumento de densidade da água na sua vizinhança. Este carácter estruturante terá como protagonistas as espécies aniónicas do glutamato da Figura 32 existentes a $\text{pH} \approx 7$. Deve acrescentar-se que a teoria de (Hepler 1969) tem sido considerada como uma teoria aproximada.

4.7. MASSA VOLÚMICA DAS SOLUÇÕES DA LCOG

A massa volúmica das soluções aquosas de LCOG em tampão 10 mM de fosfato de sódio com $\text{pH} = 7.2$ foram determinadas no intervalo de 298 K a 353 K para as concentrações de proteínas de $2.27 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, $4.65 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ e $8.38 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$. Para isso utilizou-se novamente a equação [11] conhecendo os valores dos períodos de vibração das soluções dados no Anexo H. Os resultados de massa volúmica obtidos apresentam-se na Tabela 15. Os coeficientes determinados pelo método de Lavenberg- Marquardt (Protić e Stanković 2021) com um grau de confiança de 95% para a equação [23] são apresentados na Tabela 16.

Tabela 15: Massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de lisozima em solução tampão em função da temperatura (T) e da molalidade (m).

$m(\text{mol.kg}^{-1})$	$T(\text{K})$	$\rho(\text{Kg.m}^{-3})$	$\sigma(\text{Kg.m}^{-3})$	$m(\text{mol.kg}^{-1})$	$T(\text{K})$	$\rho(\text{Kg.m}^{-3})$	$\sigma(\text{Kg.m}^{-3})$
$m = 1.587 \times 10^{-4}$	298.17	1002.56	0.01	$m = 5.876$	298.23	1004.66	0.02
$C = 2.27$ (mg.cm^{-3})	303.37	1001.27	0.01	$\times 10^{-4}$	303.32	1003.60	0.02
	308.74	999.45	0.03	$C = 8.38$	308.27	1001.76	0.03
	313.52	997.49	0.01	(mg.cm^{-3})	313.24	999.56	0.03
	318.67	995.16	0.01		318.21	996.61	0.06
	328.76	989.75	0.02		323.14	994.27	0.04
	333.38	987.26	0.03		328.08	991.17	0.08
	353.06	976.89	0.16		332.98	987.85	0.04
$m = 3.260 \times 10^{-4}$	298.12	1002.91	0.01		337.92	984.13	0.05
$C = 4.65$ (mg.cm^{-3})	303.20	1001.34	0.02		342.84	981.16	0.03
	308.27	999.60	0.02		347.75	978.33	0.01
	313.22	997.54	0.01		352.66	975.90	0.02
	318.19	995.22	0.13				
	323.14	992.70	0.03				
	328.07	990.05	0.02				
	333.00	987.22	0.02				
	337.92	984.49	0.01				
	342.84	981.78	0.02				
	347.76	979.18	0.03				
	352.64	976.87	0.01				

$$\langle \rho \rangle = \sum_i \frac{\rho_i}{N} ,$$

$$\sigma_\rho = \sum_i \frac{(\rho_i - \langle \rho \rangle)^2}{N - 1}$$

Tabela 16: Coeficientes da equação [23] e parâmetros estatísticos relativos do ajustamento aos valores da massa volúmica da Tabela 18.

ρ_{ij}	Value	r^2	$\sigma_\rho(\text{kg.m}^{-3})$	AARD%	AAD (kg.m^{-3})
$\rho_{0,0}$	953.623	0.9959	0.6	0.05	0.5
$\rho_{0,1}$	-180975.4065				
$\rho_{1,0}$	0.674364				
$\rho_{1,1}$	1319.1029				
$\rho_{2,0}$	-0.00171909				
$\rho_{2,1}$	-2.32184				

$$\text{AARD}\% = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{\rho_i^{\text{cal}} - \rho_i^{\text{exp}}}{\rho_i^{\text{exp}}} \right| \qquad \text{AAD}(\text{kg.m}^{-3}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\rho_i^{\text{cal}} - \rho_i^{\text{exp}}|$$

Na Figura 33 encontram-se representados os valores experimentais de ρ para as molalidades m medidas. Representam-se também em linhas contínuas os valores calculados pela equação [23]. Observa-se na Figura 33 que aproximadamente a 335 K os valores da massa volúmica para a solução de maior concentração de proteína, $C = 8.38 \text{ mg.cm}^{-3}$, são menores do que para as soluções de menor concentração mesmo até que a solução tampão, facto que em princípio não seria esperado. Nesta região de temperatura ocorre ainda uma inversão de massa volúmicas para as soluções com $C = 2.27 \text{ mg.cm}^{-3}$ e $C = 4.65 \text{ mg.cm}^{-3}$, cabe aqui referir que se esperava nesta região espera-se a ocorrência de fenómenos de desnaturação. Espera-se também que estas ocorrências influenciem significativamente o cálculo dos volumes molares aparente das soluções aquosas de proteína no tampão através do termo $(1000/m) \left(\frac{\rho_0 - \rho}{\rho_0 \rho} \right)$ da equação [25].

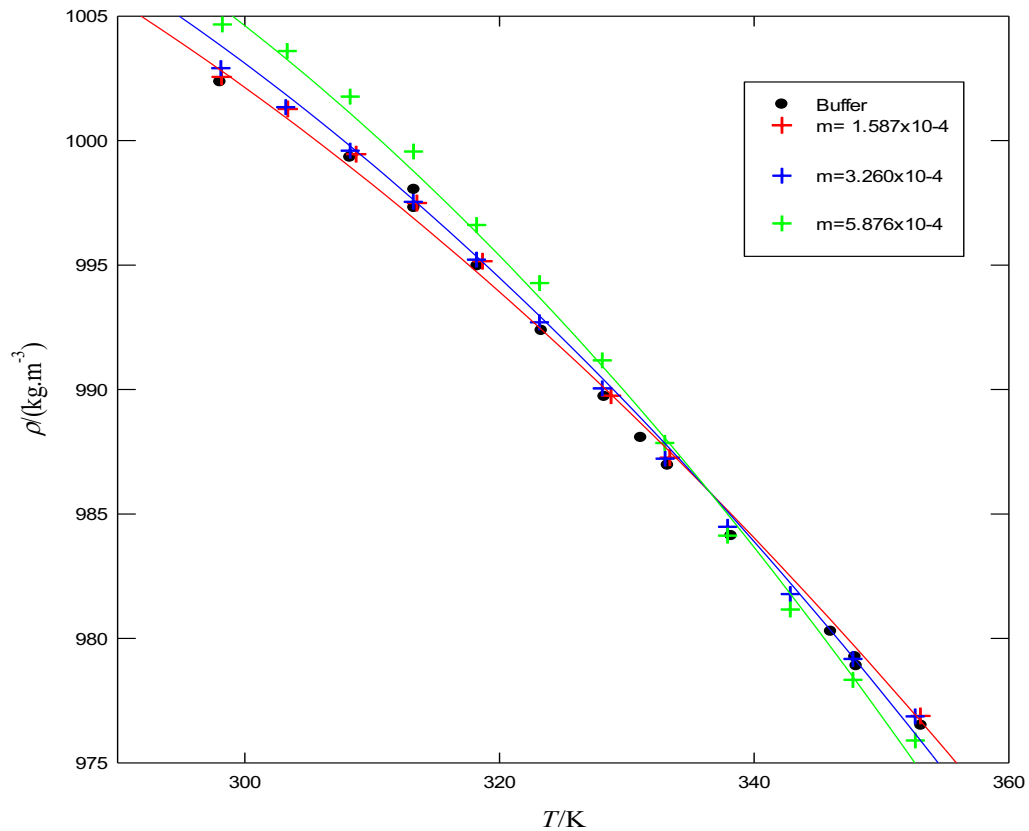


Figura 33: Massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de LCOG em tampão de fosfato em função da temperatura (T).

Na Figura 34 mostram-se os desvios relativos percentuais entre os valores experimentais (ρ) e calculados (ρ_{calc}) com equação [23] e os coeficientes da Tabela 16 em função da temperatura para as molalidades de sal que foram testadas. Como se pode concluir os desvios relativos estão situados na sua maior parte na região definida pelo valor de $AARD = 0.05\%$ para todos os ensaios. É interessante verificar que as curvas de desvio apresentam uma forma senoidal o que não acontece com as curvas que se observam na Figura 26 para os desvios relativos às soluções de GMS.

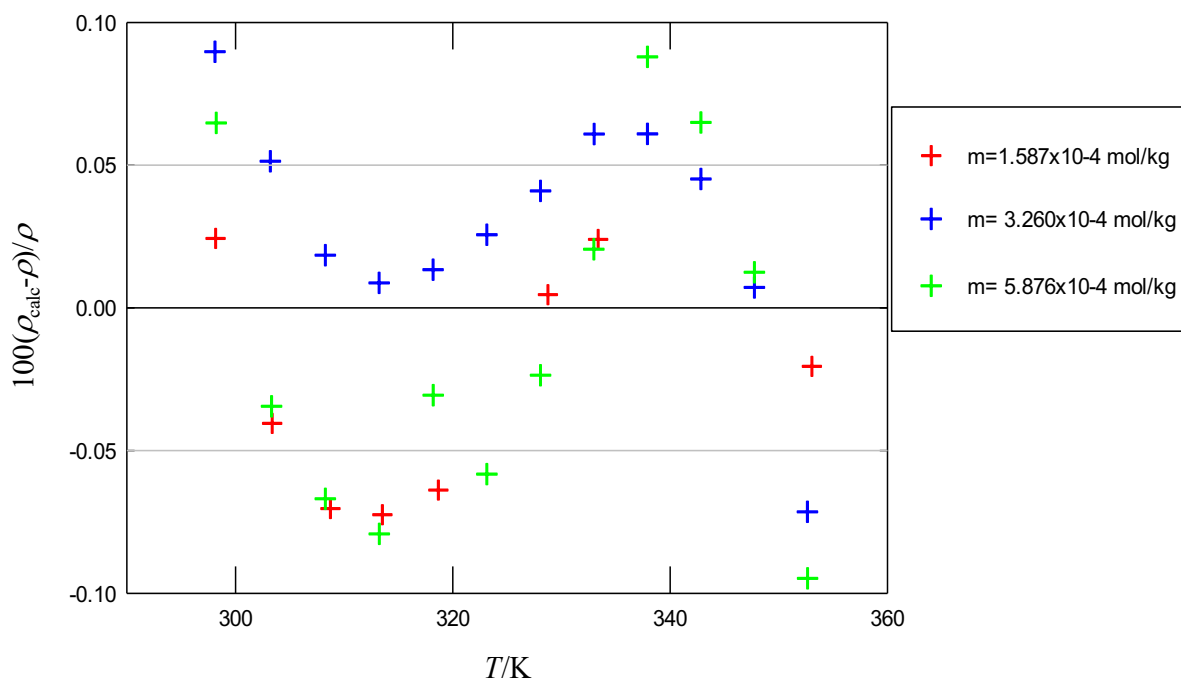


Figura 34: Desvios relativos percentuais da massa volúmica entre valores experimental (ρ) e os calculados (ρ_{calc}) com a equação [23] para as soluções aquosas de LCOG em função da temperatura (T). As linhas a cinzento correspondem a AARD% (Ver Tabela 16).

Na Figura 35 faz-se a representação 3D da massa volúmica (ρ) das soluções aquosas de LCOG no tampão de 10 mM de fosfato de sódio em função de m e T . Os círculos representam os valores experimentais e a malha corresponde à superfície gerada pela equação [23]. Comparando a localização dos valores experimentais no espaço (m , T , ρ) com a superfície correspondente à equação [23] pode-se concluir-se que a equação fornece uma representação razoável dos valores experimentais.

Verifica-se que a equação [23] consegue uma boa representação dos valores experimentais o que é evidenciado pelos baixos valores de AARD% e AAD da Tabela 16, neste caso mesmo até inferiores aos registados na Tabela 11 relativa às soluções de GMS.

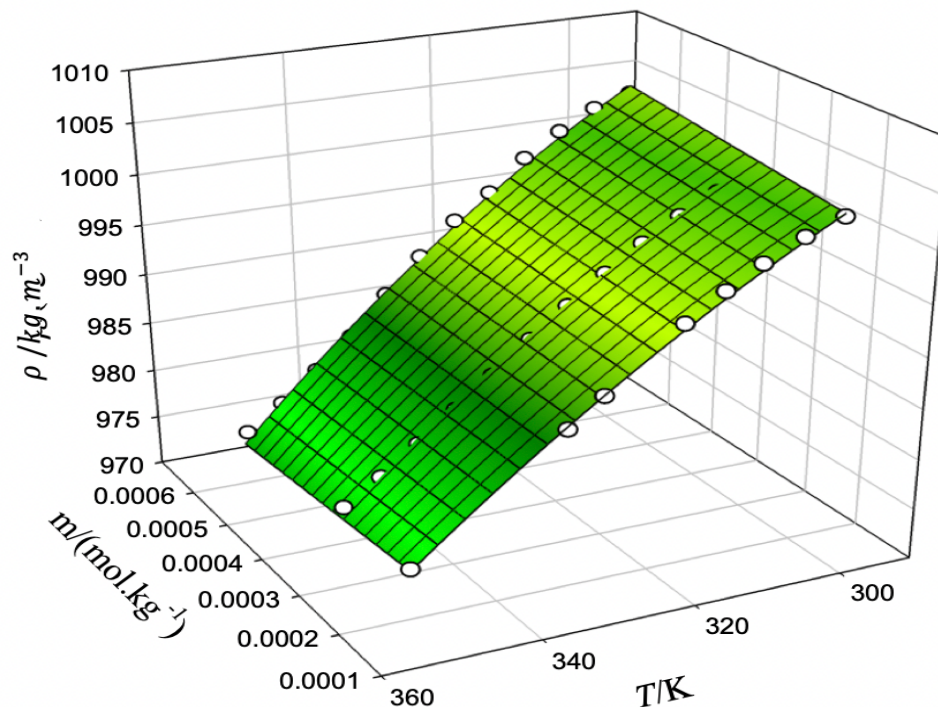


Figura 35: Representação 3D da massa volúmica das soluções de LCOG em tampão de fosfato de sódio em função da temperatura (T) e da molalidade (m) das soluções.

4.8. VOLUME MOLAR APARENTE DAS SOLUÇÕES DA LCOG

Na literatura podem ser encontrados alguns, embora poucos, valores do volume parcial molar da lisozima quer em água quer em solução tampão. (Millero, Ward, e Chetirkin 1976) mediu massa volúmica para soluções aquosas de lisozima a 20°C no intervalo de fração molar de lisozima de 0.05×10^{-2} a 1.08×10^{-2} e a 25°C e 30 °C no intervalo de 0.05×10^{-2} a 0.17×10^{-2} . Outro autores determinaram os valores de volumes molares aparente a partir das massa volúmicas: (Jirasek et al. 2018) efetuaram medidas da massa volúmica de soluções de lisozima em soluções tampão de fosfato de sódio mono e di hidratado (pH=7.0), num densímetro de tubo vibrante Anton Paar DMA 5000M a 298.15 K e determinaram daqui valores de volumes molares aparentes (V_{ϕ}). (Chalikian et al. 1996) determinaram valores de V_{ϕ} para uma concentração de lisozima de 3 mg.cm^{-3} , em soluções aquosas no intervalo 18 a 55 °C. («Son Ikbae, 2017») determinam valores de V_{ϕ} da LCOG em soluções tampão de fosfato de sódio a pH=7.0 no intervalo de temperatura 18, 25, 35 e 45 °C e para uma

concentração de 6 mg.cm^{-3} de LCOG (num densímetro de tubo vibrante Anton Paar DMA 5000M). Alguns destes valores estão representados na Figura 36.

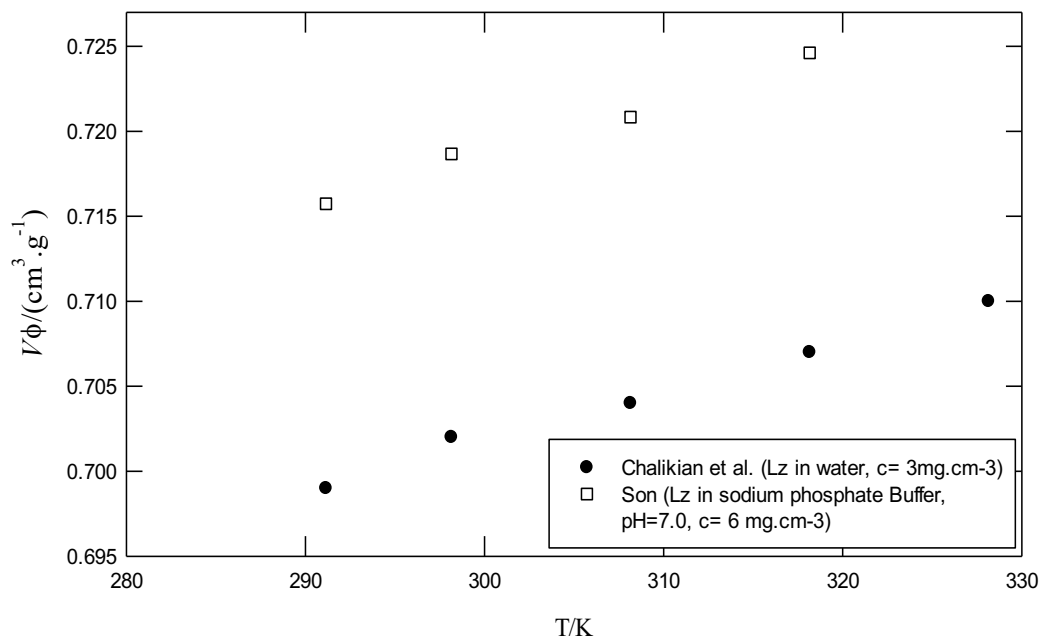


Figura 36: Volumes parciais específicos V_ϕ da LCOG em soluções aquosas em função da temperatura (T) selecionados da literatura.

Na Figura 36 não é evidente uma subida muito acentuada no volume molar aparente da LCOG com a temperatura, que é característica da desnaturação térmica da proteína pois os valores medidos situam-se abaixo da temperatura de desnaturação, $T_d = 344 \text{ K}$ (Li-Blatter e Seelig 2019).

Os volumes molares aparentes das soluções aquosas de LCOG nas soluções de tampão de fosfato de sódio foram calculados pela equação [25] onde ρ é neste caso a massa volúmica (medida) da solução de proteína para uma dada temperatura e molalidade e M designa a massa molar da proteína (ou seja, o soluto, $M=14400 \text{ g.mol}^{-1}$). Nos cálculos foi utilizada novamente a equação [22] para descrever a massa volúmica da solução tampão de fosfato. Para a massa volúmica das soluções aquosas de LCOG utilizaram os valores experimentais registados na Tabela 15.

Tal como se pode verificar na Figura 37 as curvas de volume molar aparente da lisozima em função da temperatura relativas as concentrações ensaiadas são do tipo sigmodal, exibindo uma subida acentuada de V_ϕ a temperaturas superiores a 310 K a 320 K e

estabilizando por volta dos 360 K. Todas mostram um comportamento típico da desnaturação térmica. Na primeira fase, observa-se um aumento ligeiro de V_ϕ com a temperatura, comportamento este que pode estar associado com a mudança do volume do estado nativo da lisozima devido à expansão térmica da proteína e ao aumento do volume da esfera de hidratação. Na segunda fase do gráfico $V_\phi = f(T)$ (315 K a 350 K), observa-se um aumento muito maior do V_ϕ com a temperatura e este comportamento está relacionado com a desnaturação da proteína. A terceira e última fase resulta da expansão térmica da proteína desnaturada observando-se um notório decréscimo do V_ϕ com a T.

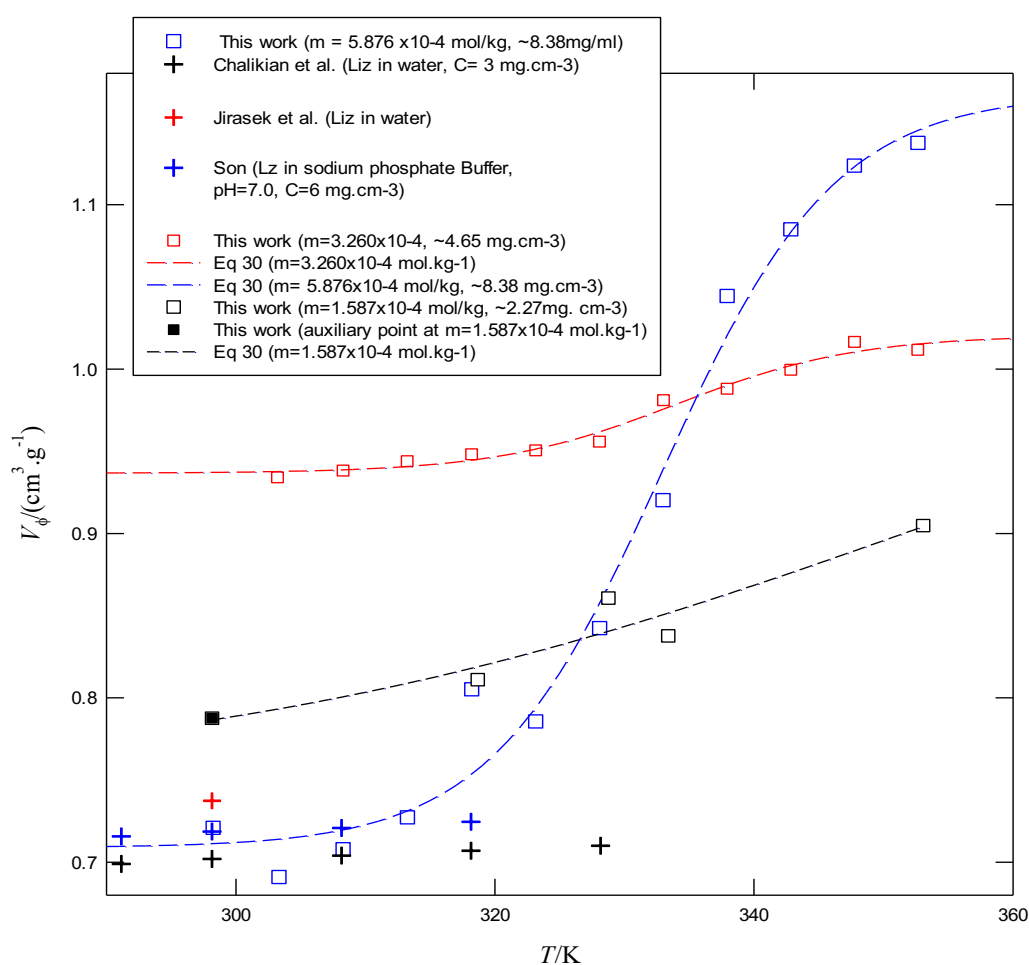


Figura 37: Volumes molares aparentes (V_ϕ) da LCOG na solução tampão de fosfato sódico (com pH = 7.2) em função da temperatura (T). Representam-se também valores selecionados da literatura, para comparação.

O mecanismo de desnaturação das proteínas induzido pela temperatura é altamente complexo e envolve principalmente a desestabilização das principais interações não covalentes. Em primeiro lugar, as interações por pontes de hidrogénio, eletrostáticas e de van der Waals são exotérmicas (classificadas como de natureza entálpica) sendo por conseguintes interações que são desestabilizadas a temperaturas elevadas e estabilizadas a baixa temperatura. No entanto, como as pontes de hidrogénio peptídicas nas proteínas estão principalmente situadas no seu interior, elas permanecem estáveis numa ampla faixa de temperatura. No caso da lisozima e com base nos resultados deste estudo a faixa de temperatura da destabilização inicial poderá ser até 310-320 K correspondente à região de crescimento suave de V_{ϕ} com T. Em segundo lugar, as interações hidrofóbicas comandadas pela água circundante da proteína (água de solvatação) são endotérmicas (determinadas pela entropia) e, por conseguinte, as interações deste tipo são estabilizadas a alta temperatura e desestabilizadas a baixa temperatura. Portanto, à medida que a temperatura aumenta, as mudanças nas estabilidades desses dois grupos de interações não covalentes opõem-se. No entanto, a estabilidade das interações hidrofóbicas não pode aumentar infinitamente com o aumento da temperatura, porque acima de uma certa temperatura, a quebra gradual da estrutura da água acabará por desestabilizar as interações hidrofóbicas. Supõe-se que a intensidade das interações hidrofóbicas atinga um máximo a cerca de 60 - 70°C (correspondente à região 333 a 343 K) ou seja a região onde se situa a temperatura de desnaturação da lisozima. Assim, no caso da lisozima, este facto será certamente influenciado pela destruição da estrutura da água de hidratação que envolve numerosas moléculas de água perto da superfície exposta da proteína que está carregada positivamente. Alguns estudos indicam que a massa volúmica da água na primeira camada de hidratação na região de temperatura cerca de 320 K é elevada, cerca de 15% superior á das regiões interiores da solução (bulk), longe da proteína.(Merzel e Smith 2002). É possível que a crescente destruição da estrutura de solvatação com o aumento de temperatura intensifique as repulsões entre resíduos e obrigue á exposição das partes mais internas ao solvente com subsequente destruição irreversível dessas regiões. À medida que a temperatura aumenta, o aumento da energia cinética térmica da cadeia polipeptídica facilita num grau importante o desdobramento da cadeia polipeptídica. A desnaturação de proteínas pelo calor também depende dos aminoácidos que compõem as proteínas. As proteínas que contêm uma maior proporção de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente de valina, isoleucina, leucina e fenilalanina, tendem a ser mais estáveis do que as proteínas mais hidrofílicas. Supõe-se que

outros fatores, como ligações dissulfeto e a presença de pontes salinas do interior da proteína, também possam contribuir para a termoestabilidade. No caso da lisozima os aminoácidos mais hidrofóbicos representam apenas cerca de 23 % do total (ver no Anexo A). De acordo com a hidropatia, as hélices α mostram algum caráter hidrofóbico enquanto as folhas β um caráter exclusivamente hidrofílico. Dado que a lisozima tem caracter mais hidrofílico que hidrofóbico, a exposição às moléculas de água contribuirá provavelmente para a desnaturação mais rápida.

As proteínas podem ser desnaturadas ao nível das estruturas secundária, terciária e quaternária, mas não no nível primário já que nesta última estrutura, a sequência de aminoácidos é mantida coesa por ligações peptídicas covalentes que não são rompidas pelo processo de desnaturação. Já na influência da desnaturação ao nível da estrutura secundária, as proteínas perdem as unidades de repetição como as hélices α e folhas β e adotam uma configuração onde estas formações se apresentam distribuídas de forma mais ou menos aleatória. Esta situação é determinada em larga medida pela ruptura das ligações de H existente entre aminoácidos de fragmentos diferentes na hélice α ou nas folhas β . A desnaturação ao nível da estrutura terciária envolve a interrupção de interações entre cadeias laterais de aminoácidos (como pontes dissulfeto entre grupos cisteína), de interações de van der Waals dipolo-dipolo entre aminoácidos polares de cadeias laterais e da água circundante, de van der Waals dipolo induzido, interações entre aminoácidos apolares de cadeias laterais (hidrofóbicas) e ligações iônicas como o oxigénio de um grupo carboxilo e um grupo $-\text{NH}_3^+$ de aminoácidos próximos e entre grupos nos aminoácidos ácidos e básicos, caso do ácido aspártico que é muito abundante, cerca de 14 grupos na lisozima comparativamente com outros aminoácidos.

Para determinar a temperatura média de desnaturação da lisozima em soluções aquosas de tampão fosfato, os valores experimentais (T , V_φ) foram ajustados da Tabela 15 à equação [30].

$$V_\varphi = v_0 + \frac{v_1}{1 + \exp[-(T - T_0)/v_2]} \quad [30]$$

A equação [30] foi utilizada na literatura para modelar medidas da absorvância em função do tempo (curvas cinéticas) efetuadas em estudos de agregação da BSA (albumina de soro bovino) em solventes com adição de polissacarídeos (Ahanger, Parray, et al. 2021) açucares e polióis (Sharma, Pasha, e Deep 2010) e soluções de BSA com GMS (Ahanger,

Bashir, et al. 2021). Nestes estudos as curvas cinéticas exibem um perfil muito semelhante ao obtido na Figura 37 e todos os parâmetros encontram um significado físico rigoroso.

Os valores dos coeficientes v_i , T_0 e dos descritores estatísticos apresentam-se na Tabela 17.

Tabela 17: Coeficientes da equação [30] e parâmetros estatísticos relativos do ajustamento aos valores do volume molar aparente das soluções aquosas de LCOG nas soluções de fosfato de sódio.

m (mol.kg ⁻¹)	v_0 (cm ³ .g ⁻¹)	v_1 (cm ³ .g ⁻¹)	v_2 (K)	T_0 (k)	r^2	σ (cm ³ .g ⁻¹)	$AARD$ (%)	AAD (cm ³ .g ⁻¹)
1.587x10 ⁻⁴	0.7470	0.3172	28.4587	353.57	0.6776	0.0257	1.03	0.009
3.260x10 ⁻⁴	0.9367	0.0841	6.9908	334.02	0.9749	0.0048	0.35	0.004
5.876x10 ⁻⁴	0.7088	0.4588	6.6326	332.10	0.9801	0.0243	1.78	0.015

$$AARD \% = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{V_{\phi}^{cal} - V_{\phi}^{exp}}{V_{\phi}^{exp}} \right|$$

$$AAD (cm^3 \cdot g^{-1}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |V_{\phi}^{cal} - V_{\phi}^{exp}|$$

Da Tabela 17 verifica-se que os parâmetros da equação [30] têm valores semelhantes para as duas maiores concentrações de proteína. Para a menor concentração $m = 1.587 \times 10^{-4}$ mol.kg⁻¹ os valores são diferentes devido á falta de valores experimentais de V_{ϕ} como se observa na Figura 37.

A temperatura T_0 da equação [30] corresponde ao máximo da primeira derivada (dV_{ϕ}/dT) ou seja é o ponto de inflexão da curva (V_{ϕ} vs T) como se mostra na Figura 38 onde se representa dV_{ϕ}/dT em função da temperatura para as concentrações de proteína estudadas. O valor de T_0 pode tomar-se como uma boa aproximação da temperatura de desnaturação da lisozima na solução tampão. Portanto, de acordo com este estudo a temperatura de desnaturação da lisozima ocorre por volta de 333 K (60 °C). Este valor é um pouco inferior relativamente a valores mencionados na literatura para soluções de lisozima a tampão de pH = 7.0 (Li-Blatter e Seelig 2019) referem $T_0 = 344$ K (71 °C), determinados através da técnica de dicroísmo circular muito utilizada. Este valor é inferior ao encontrado para a solução 1.587×10^{-4} mol.kg⁻¹ em lisozima.

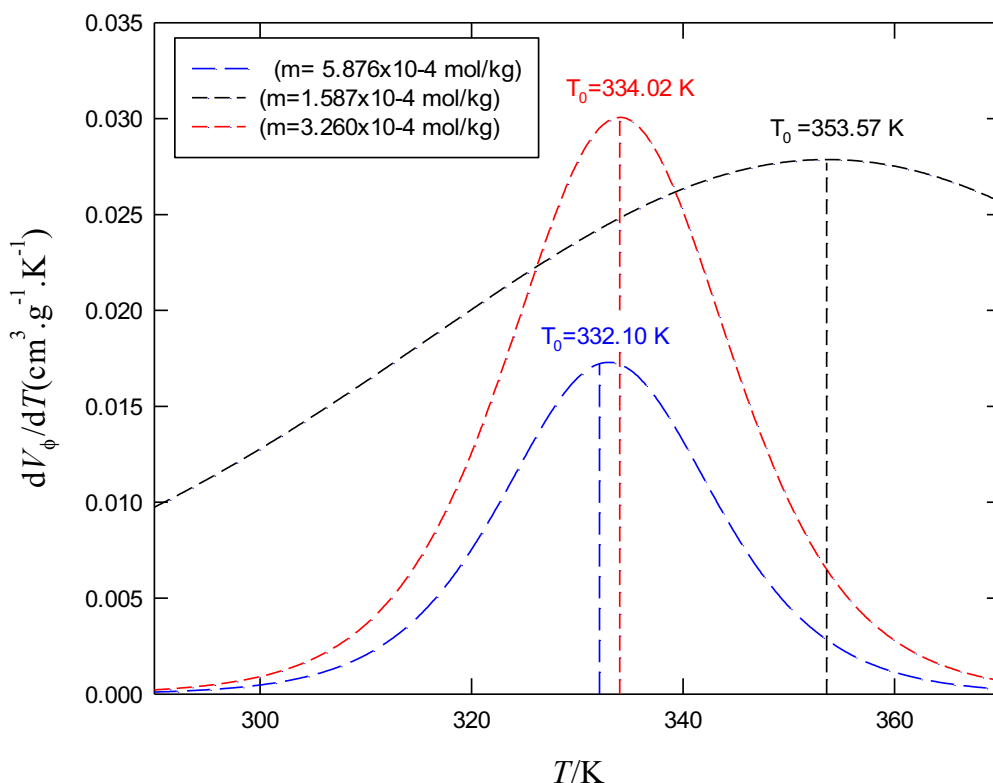


Figura 38: Derivada (dV_{ϕ}/dT) em função da temperatura para as concentrações de lisozima estudadas.

Um dos estudos relevantes encontrados na literatura que corroboram os resultados obtidos neste trabalho foi o de (Mallamace et al. 2015). Os estudos de espectroscopia de RMN levado a cabo por alguns autores sobre a dinâmica da água na primeira camada de hidratação da lisozima permitiram retirar algumas conclusões interessantes sobre os diferentes estados do processo de desdobramento da lisozima na região de temperatura estudada neste trabalho. Nesses estudos, os autores concluíram que o coeficiente de autodifusão (D_s) medido na água de hidratação é menor do que no solvente bulk, e a razão entre esses dois valores em função do inverso da temperatura, mostra três mudanças aproximadamente em 277 K, 316 K e 342 K, com alterações correspondentes na energia de ativação. Quando $T < 277$ K, a rede de ligações de hidrogénio na superfície da proteína é forte e estável e a energia de ativação é aproximadamente 1.8 kcal/mol. A região até 316 K é a região térmica de funcionamento biológico ideal e exibe uma menor energia de ativação (~ 0.4 kcal/mol). Acima de aproximadamente 315 K, a rede de pontes de hidrogénio (LH) da primeira camada de hidratação começa a romper-se e o processo de desdobramento da proteína começa. No entanto, na região $316 \text{ K} < T < 342 \text{ K}$ com energia de ativação aproximadamente 2.7

kcal/mol, o processo de desdobraimento é ainda reversível (Mallamace et al. 2015). Finalmente, a $T \geq 342$ K e para energia de ativação de aproximadamente 5.3 kcal/mol, o processo de desdobraimento torna-se irreversível, estado este referido como aquele em que a rede de ligações de hidrogénio se decompõe completamente, levando a uma estrutura da proteína que se assemelha a uma cadeia linear de aminoácidos. Um parâmetro importante nos estudos da desnaturação de proteínas é o raio hidrodinâmico de partículas, ξ . O raio hidrodinâmico corresponde ao raio de uma esfera rígida que se difunde á mesma velocidade que a proteína. Pode ser determinado a partir de D_s através da relação de Stokes-Einstein equação [31].

$$D_s = \frac{k_B T}{6\pi \eta \xi} \quad [31]$$

onde T designa a temperatura e η a viscosidade dinâmica.

Na Figura 39 representa-se ξ da lisozima em função de T (Mallamace et al. (2015)).

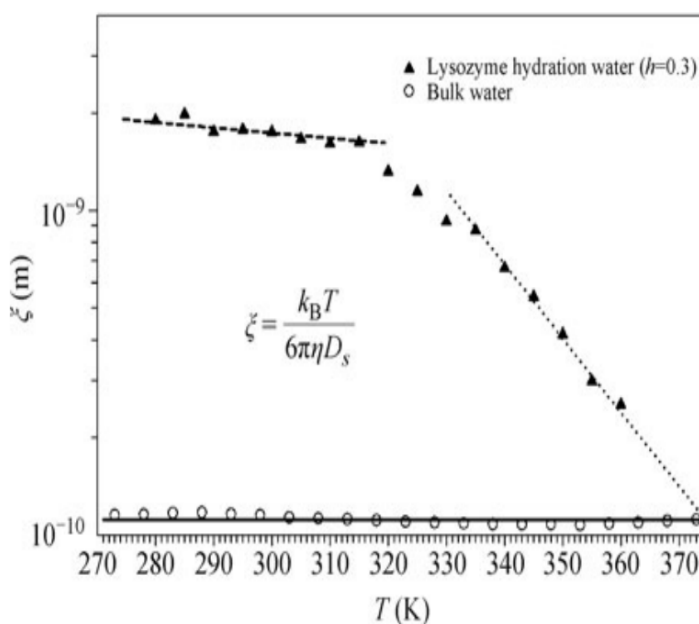


Figura 39: Raio hidrodinâmico em função da temperatura para a água bulk e água da camada de hidratação da lisozima (Mallamace et al., 2015).

À temperatura ambiente o raio é o da lisozima (≈ 1.8 nm) enquanto para $T > 320$ K, ξ diminui acentuadamente até 335 K e depois drasticamente. Quando $T > 345$ K, ξ aproxima-se do valor do correspondente ao da água interior (bulk). Este resultado confirma que quando a lisozima sofre desdobraimento completo, as moléculas de água são livres e não estão ligadas aos resíduos da lisozima.

Para finalizar indicam-se na Figura 40, sobre a curva (V_ϕ vs T) para $m = 3.260 \times 10^{-4}$ mol.kg⁻¹, as regiões de temperatura correspondentes aos diferentes estados da lisozima nas soluções aquosas de tampão de fosfato de sódio de acordo com o exposto anteriormente. Nesta Figura 40 estão assinalados os valores da temperatura de desnaturação deste trabalho e o determinado por (Li-Blatter e Seelig 2019). O valor mencionado por estes autores em termos do presente estudo, encontra-se na região onde a desnaturação está concretizada, ou seja, irreversível.

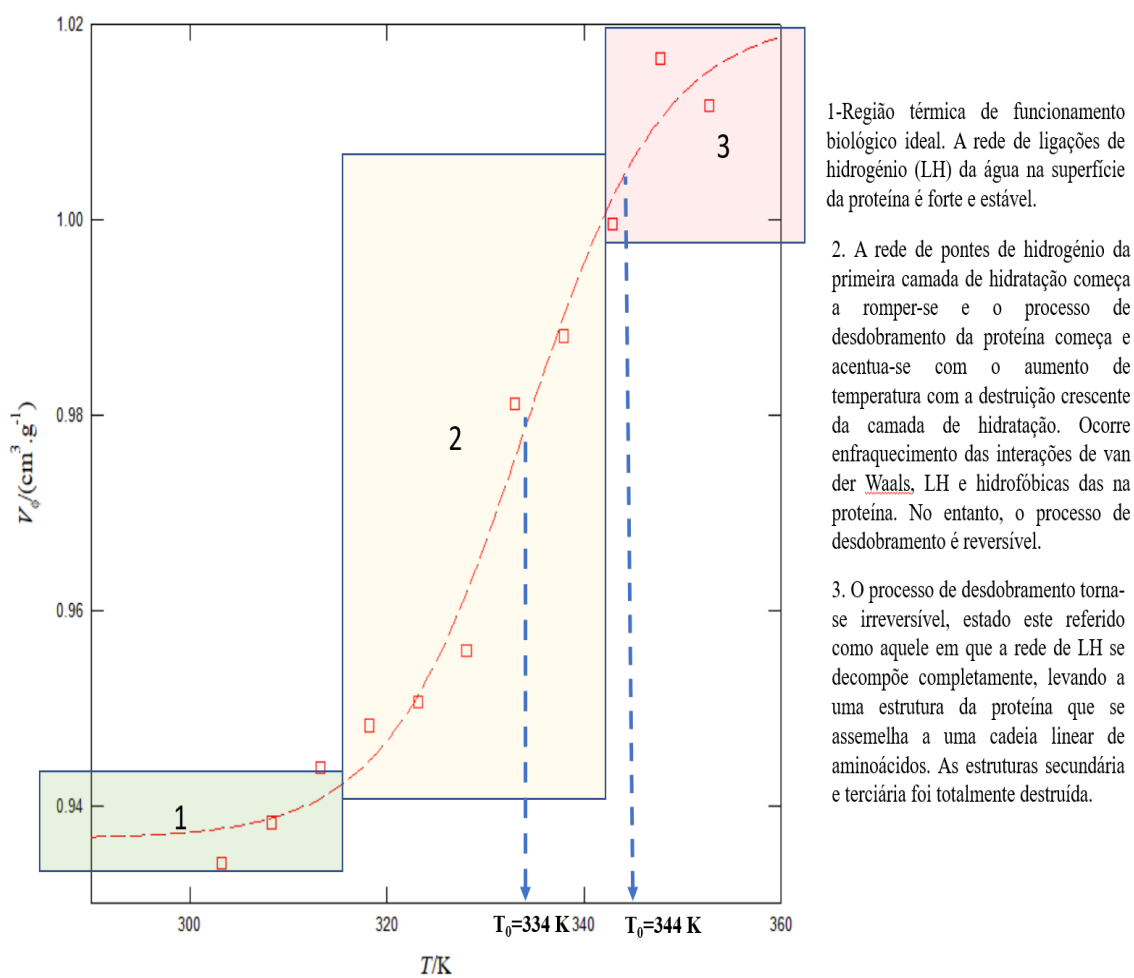


Figura 40: Resumo dos fenómenos ligados à desnaturação da lisozima que ocorrem de acordo com o andamento da curva (V_ϕ vs T) para $m = 3.260 \times 10^{-4}$ mol.kg⁻¹.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidos resultados para a massa volúmica do glutamato de sódio e lisozima da clara de ovo da galinha em solução tampão de fosfato de sódio a $\text{pH} = 7.2$, na faixa de temperatura de 298 K a 353 K e à pressão de 1 atm.

A importância destes resultados tem a ver com os seguintes aspetos:

- O GMS é um sal que tem levantado polémica na sua utilização como aditivo de sabor para os alimentos, com a possibilidade de provocar desnaturação e agregação de proteínas responsáveis por doenças neurodegenerativas;
- As medidas volumétricas do GMS em solução aquosa são muito raras embora sejam de grande importância na investigação;
- Os métodos volumétricos são apontados como essenciais para obtenção das propriedades e comportamento das proteínas em solução particularmente para o estudo da sua desnaturação e agregação em soluções aquosas de sais. A lisozima é uma proteína de baixo custo e referida como modelo nestes estudos;
- Para a lisozima são poucos os estudos volumétricos relevantes sobre a desnaturação térmica em especial no intervalo da temperatura onde ocorre a transição;
- A técnica de densitometria de tubo de vibrante é considerada como muito rigorosa neste tipo de trabalhos onde é exigida uma grande precisão nos resultados para o cálculo V_ϕ do soluto especialmente do seu valor em condições de diluição infinita.

As medidas de massa volúmica para soluções diluídas de GMS em tampão de fosfato de sódio numa gama largada de concentração ($0.25 \text{ mol.kg}^{-1} < m < 2.5 \text{ mol kg}^{-1}$) mostra variações de aproximadamente 155 kg.m^3 ou seja cerca de 15% quer a 298 K quer a 353 K;

Os resultados deste estudo quer de massa volúmica quer de volume molar aparente estão em excelente concordância com os valores encontrados na literatura a 298 K, determinados utilizando uma técnica diferente. O volume molar aparente do GMS dissolvido em solução tampão de fosfato de sódio mostra uma grande variação com a temperatura para soluções com a molalidades inferiores 1.5 mol.kg^{-1} (variações entre $83 \text{ cm}^3.\text{mol}^{-1}$ até $134 \text{ cm}^3.\text{mol}^{-1}$ a 298 K e 353 K, respetivamente $m = 0.5 \text{ mol.kg}^{-1}$) sendo observadas a pequenas variações de V_ϕ para valores elevados de modalidades ($88 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ até $94 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ a 298K e 353 K respetivamente para $m = 2.5 \text{ mol.kg}^{-1}$). A explicação deste comportamento terá a ver

com a forte interação do anião glutamato (com uma carga efetiva negativa a valores de pH 7) com a água circundante segundo um efeito estruturante que conduz á formação de aglomerados de moléculas de água de baixa massa volúmica e, conseqüentemente com o aumento do volume específico do soluto a diluição infinita.

Infelizmente não foi possível esclarecer e confirmar este comportamento quer ao nível quantitativo e qualitativo - por comparação com valores da literatura. Como trabalho futuro sugere-se repetir as medições de massa volúmica no sentido de confirmar as medições feitas e esclarecer o comportamento do volume molar aparente com a temperatura e a concentração de sal nas soluções aquosas ($V_{\phi}(T, m)$).

As medidas de massa volúmica e volume molar aparente da LCOG em solução tampão de fosfato de sódio foi efetuado no mesmo intervalo de temperatura do GMS para concentrações no intervalo de concentração de 2 mg.cm⁻³ a 8 mg.cm⁻³. Neste intervalo de concentração a massa volúmica da LCOG apresentou variações muito pequenas de aproximadamente 1 kg.m⁻³ a 2 kg.m⁻³ no intervalo de temperaturas entre 298 K e 353 K.

Apesar da proximidade dos valores de massa volúmica no intervalo de temperatura considerado e para os valores de concentração, foi possível obter curvas do volume aparente em função da temperatura. Estas curvas apresentaram intervalos de variação de V_{ϕ} muito diferentes entre si, dependendo do valor da concentração considerada. No entanto todas as curvas têm dois pontos em comum: (i) todas as curvas podem ser bem descritas com funções sigmoidais onde o valor máximo da derivada (dV_{ϕ}/dT) permite prever a temperatura em que ocorreu desnaturação da proteína ($T_0 \approx 333$ K) próximo da temperatura referida na literatura ($T_0 \approx 344$ K); (ii) todas as curvas (T, V_{ϕ}) exibem um comportamento típico do processo de desnaturação térmica da proteína. Do trabalho experimental efetuado ficou claro que os estudos volumétricos devem considerar concentrações de LCOG acima de 2 mg cm⁻³ para que as massas volúmicas das soluções de proteína no tampão de fosfato de sódio com pH = 7.2 se evidenciem claramente na região de temperatura considerada.

Este estudo foi um trabalho exploratório importante e um ponto de partida para trabalhos futuros onde em primeiro lugar se devem melhorar os resultados dos volumes molares aparentes quer do GMS quer da LCOG em soluções tampão de fosfato de sódio e em segundo lugar avançar para o estudo da massa volúmica e volumes molares aparentes em função da temperatura e concentração do LCOG em soluções de GMS e tampão de fosfato de

sódio. É a partir destas últimas determinações que serão retiradas conclusões mais definitivas sobre a influência do GMS nos fenómenos de desnaturação e, provavelmente, de agregação irreversível com a formação de fibras de proteínas. Neste contexto, será de avaliar as condições de concentração de LCOG e GMS e de temperatura para os fenómenos de agregação/desnaturação da lisozima em soluções aquosas de GMS, assunto que atualmente está na frente da investigação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

«Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI PDR entry 8H3W». 2023. 2023. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1uco/analysis>.

«Absorbancia». 2019. Em *Wikipedia, la enciclopedia libre*. <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Absorbancia&oldid=121707659>.

Adamenko, I. I., L. A. Bulavin, V. Ilyin, S. A. Zelinsky, e K. O. Moroz. 2006. «Anomalous Behavior of Glycerol–Water Solutions». *Journal of Molecular Liquids, International Conference on Physics of Liquid Matter: Modern Problems*, 127 (1): 90–92. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2006.03.023>.

Ahanger, Ishfaq Ahmad, Sania Bashir, Zahoor Ahmad Parray, Mohamed F. Alajmi, Afzal Hussain, Faizan Ahmad, Md Imtaiyaz Hassan, Asimul Islam, e Anurag Sharma. 2021. «Rationalizing the Role of Monosodium Glutamate in the Protein Aggregation Through Biophysical Approaches: Potential Impact on Neurodegeneration». *Frontiers in Neuroscience* 15: 636454. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.636454>.

Ahanger, Ishfaq Ahmad, Zahoor Ahmad Parray, Khalida Nasreen, Faizan Ahmad, Md. Imtaiyaz Hassan, Asimul Islam, e Anurag Sharma. 2021. «Heparin Accelerates the Protein Aggregation via the Downhill Polymerization Mechanism: Multi-Spectroscopic Studies to Delineate the Implications on Proteinopathies». *ACS Omega* 6 (3): 2328–39. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05638>.

Alharbi, Naiyf S., Shine Kadaikunnan, Jamal M. Khaled, Taghreed N. Almanaa, Ganesh Moorthy Innasimuthu, Baskar Rajoo, Khalid F. Alanzi, e Shyam Kumar Rajaram. 2020. «Optimization of Glutamic Acid Production by *Corynebacterium Glutamicum* Using Response Surface Methodology». *Journal of King Saud University: Science* 32 (2): 1403–8.

Banerjee, Tuhina, e Nand Kishore. 2006. «Interactions of Peptides and Lysozyme with Aqueous Tetraethylammonium Bromide at 298.15 K». *Journal of Solution Chemistry* 35 (10): 1389–99. <https://doi.org/10.1007/s10953-006-9069-2>.

«BIPM». 2023. 2023. <https://www.bipm.org/en/committees/jc/jcgm/publications>.

Bosart, L. W., e A. O. Snoddy. 1927. «New Glycerol Tables1». *Industrial & Engineering Chemistry* 19 (4): 506–10. <https://doi.org/10.1021/ie50208a030>.

Callewaert, Lien, e Chris W. Michiels. 2010. «Lysozymes in the Animal Kingdom». *Journal of Biosciences* 35 (1): 127–60. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>.

Chalikian, Tigran V., Maxim Totrov, Ruben Abagyan, e Kenneth J. Breslauer. 1996. «The Hydration of Globular Proteins as Derived from Volume and Compressibility Measurements: Cross Correlating Thermodynamic and Structural Data». *Journal of Molecular Biology* 260 (4): 588–603. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0423>.

Chiti, Fabrizio, e Christopher M. Dobson. 2006. «Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease». *Annual Review of Biochemistry* 75 (1): 333–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.

Conway, Myra E. 2020. «Alzheimer's Disease: Targeting the Glutamatergic System». *Biogerontology* 21 (3): 257–74. <https://doi.org/10.1007/s10522-020-09860-4>.

Darbari, G. S., R. P. Singh, G. S. Verma, e S. Rajagopalan. 1967. «Acoustic Absorption in Mixtures of Glycerol and Water below 1 MHz. — II». *Il Nuovo Cimento B (1965-1970)* 52 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF02710649>.

David L. Nelson e Michael M. Cox. 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry (7th Edition)* (2017). <http://archive.org/details/lehninger-principles-of-biochemistry-w.-h.-freeman-2017>.

Ding, Jiaying, Xiuyu Hu, Zhihe Feng, e Liming Dong. 2022. «Environmental Life Cycle Assessment of Monosodium Glutamate Production in China: Based on the Progress of Cleaner Production in Recent Ten Years». *Science of The Total Environment* 818 (abril): 151706. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151706>.

Dobson, Christopher M. 2003. «Protein Folding and Misfolding». *Nature* 426 (6968): 884–90. <https://doi.org/10.1038/nature02261>.

Egas, Ana P. V., Nieves M. C. Talavera-Prieto, Abel G. M. Ferreira, Jaime B. Santos, Mário J. Santos, Zaida L. Almeida, e Isabel M. A. Fonseca. 2021. «Speed of Sound and Derived Thermodynamic Properties of Glycerol». *The Journal of Chemical Thermodynamics* 156 (maio): 106367. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106367>.

Egorov, Gennadiy I., e Dmitriy M. Makarov. 2012. «Volumetric Properties of Binary Mixtures of Glycerol + Tert-Butanol over the Temperature Range 293.15 to 348.15 K at Atmospheric Pressure». *Journal of Solution Chemistry* 41 (3): 536–54.

<https://doi.org/10.1007/s10953-012-9813-8>.

Egorov, Gennadiy I., e Dmitriy M. Makarov. 2014. «Volumetric Properties of Binary Liquid-Phase Mixture of (Water+glycerol) at Temperatures of (278.15 to 323.15)K and Pressures of (0.1 to 100)MPa». *The Journal of Chemical Thermodynamics* 79 (dezembro): 135–58. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2014.06.031>.

Egorov, Gennadiy I., Dmitriy M. Makarov, e Arkadiy M. Kolker. 2013. «Volume Properties of Liquid Mixture of Water+glycerol over the Temperature Range from 278.15 to 348.15K at Atmospheric Pressure». *Thermochimica Acta* 570 (outubro): 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2013.07.012>.

Ferreira Machado, Flávia, Jane S. R. Coimbra, Edwin E. Garcia Rojas, Luis A. Minim, Fabíola C. Oliveira, e Rita de Cássia S. Sousa. 2007. «Solubility and Density of Egg White Proteins: Effect of PH and Saline Concentration». *LWT - Food Science and Technology* 40 (7): 1304–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.020>.

Ge, Ming-Lan, Jing-Lan Ma, e Bin Chu. 2010. «Densities and Viscosities of Propane-1,2,3-triol + Ethane-1,2-diol at T = (298.15 to 338.15) K». *Journal of Chemical & Engineering Data* 55 (7): 2649–51. <https://doi.org/10.1021/je900938b>.

Gottardo, Franciele Maria, Ana Paula Alves da Silva, Luciana Ruschel dos Santos, Luciane Maria Colla, e Christian Oliveira Reinehr. 2022. «Use of Monosodium Glutamate in Foods: The Good, the Bad, and the Controversial Side». *ABCS Health Sciences* 47 (agosto): e022305–e022305. <https://doi.org/10.7322/abcshs.2020155.1609>.

Hepler, Loren G. 1969. «Thermal Expansion and Structure in Water and Aqueous Solutions». *Canadian Journal of Chemistry* 47 (24): 4613–17. <https://doi.org/10.1139/v69-762>.

Ihmels, E. Christian, e Jürgen Gmehling. 2001. «Densities of Toluene, Carbon Dioxide, Carbonyl Sulfide, and Hydrogen Sulfide over a Wide Temperature and Pressure Range in the Sub- and Supercritical State». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 40 (20): 4470–77. <https://doi.org/10.1021/ie001135g>.

Jirasek, Fabian, Edder J. Garcia, Eva Hackemann, Nadia Galeotti, e Hans Hasse. 2018. «Influence of PH and Salts on Partial Molar Volume of Lysozyme and Bovine Serum Albumin in Aqueous Solutions». *Chemical Engineering & Technology* 41 (12): 2337–45.

<https://doi.org/10.1002/ceat.201800242>.

Kamiyama, Tadashi, Takanori Matsusita, e Takayoshi Kimura. 2003. «Volumetric Study of Lysozyme in Dimethyl Sulfoxide + Water Solution at 298.15 K». *Journal of Chemical & Engineering Data* 48 (5): 1301–5. <https://doi.org/10.1021/jc0340710>.

Kan, Jianquan, e Kewei Chen, eds. 2021. *Essentials of Food Chemistry*. Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0610-6>.

Kashiwagi, T., C. Sano, T. Kawakita, e N. Nagashima. 1995. «Monosodium L-Glutamate Pentahydrate». *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications* 51 (6): 1053–56. <https://doi.org/10.1107/S0108270194014472>.

Kell, George S. 1975. «Density, Thermal Expansivity, and Compressibility of Liquid Water from 0.Deg. to 150.Deg.. Correlations and Tables for Atmospheric Pressure and Saturation Reviewed and Expressed on 1968 Temperature Scale». *Journal of Chemical & Engineering Data* 20 (1): 97–105. <https://doi.org/10.1021/jc60064a005>.

Khelladi, Hassina, Frédéric Plantier, Jean Luc Daridon, e Hakim Djelouah. 2009. «Measurement under High Pressure of the Nonlinearity Parameter B/A in Glycerol at Various Temperatures». *Ultrasonics* 49 (8): 668–75. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2009.05.001>.

Kijevčanin, Mirjana Lj., Emila M. Živković, Bojan D. Djordjević, Ivona R. Radović, Jovan Jovanović, e Slobodan P. Šerbanović. 2013. «Experimental Determination and Modeling of Excess Molar Volumes, Viscosities and Refractive Indices of the Binary Systems (Pyridine+1-Propanol, +1,2-Propanediol, +1,3-Propanediol, and +glycerol). New UNIFAC-VISCO Parameters Determination». *The Journal of Chemical Thermodynamics* 56 (janeiro): 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2012.06.031>.

Koohyar, Fardad, Abbas Ali Rostami, Mohammad Javad Chaichi, e Farhoush Kiani. 2011. «Refractive Indices, Viscosities, and Densities for L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate + D-Sorbitol + Water, and Glycerol + D-Sorbitol + Water in the Temperature Range between T=303.15 K and T=323.15 K». *Journal of Solution Chemistry* 40 (7): 1361–70. <https://doi.org/10.1007/s10953-011-9714-2>.

Krakowiak, Joanna, Magdalena Krajewska, e Jarosław Wawer. 2019. «Monitoring of Lysozyme Thermal Denaturation by Volumetric Measurements and NanoDSF Technique in the Presence of N-Butylurea». *Journal of Biological Physics* 45 (2): 161–72.

<https://doi.org/10.1007/s10867-019-09521-9>.

Lagourette, B, C Boned, H Saint-Guirons, P Xans, e H Zhou. 1992. «Densimeter calibration method versus temperature and pressure». *Measurement Science and Technology* 3 (8): 699–703. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/3/8/002>.

Li, Qun-Sheng, Ming-Gao Su, e Shui Wang. 2007. «Densities and Excess Molar Volumes for Binary Glycerol + 1-Propanol, + 2-Propanol, + 1,2-Propanediol, and + 1,3-Propanediol Mixtures at Different Temperatures». *Journal of Chemical & Engineering Data* 52 (3): 1141–45. <https://doi.org/10.1021/je060496l>.

Li-Blatter, Xiaochun, e Joachim Seelig. 2019. «Thermal and Chemical Unfolding of Lysozyme. Multistate Zimm-Bragg Theory Versus Two-State Model». *The Journal of Physical Chemistry. B* 123 (48): 10181–91. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b08816>.

Lima, Luís Spencer. 2013. «Lei de Lambert–Beer». *Revista de Ciência Elementar* 1 (1). <https://doi.org/10.24927/rce2013.047>.

Mallamace, Francesco, Carmelo Corsaro, Domenico Mallamace, Nicola Cicero, Sebastiano Vasi, Giacomo Dugo, e H. Eugene Stanley. 2015. «Dynamical Changes in Hydration Water Accompanying Lysozyme Thermal Denaturation». *Frontiers of Physics* 10 (5): 106104. <https://doi.org/10.1007/s11467-015-0486-9>.

Mangialardo, Sara, Lorenzo Gontrani, Francesca Leonelli, Ruggero Caminiti, e Paolo Postorino. 2012. «Role of Ionic Liquids in Protein Refolding: Native/Fibrillar versus Treated Lysozyme». *RSC Advances* 2 (32): 12329. <https://doi.org/10.1039/c2ra21593d>.

May, Eric F., Weparn J. Tay, Manuela Nania, Amos Aleji, Saif Al-Ghafri, e J. P. Martin Trusler. 2014. «Physical Apparatus Parameters and Model for Vibrating Tube Densimeters at Pressures to 140 MPa and Temperatures to 473 K». *Review of Scientific Instruments* 85 (9): 095111. <https://doi.org/10.1063/1.4894469>.

McDuffie, G. E., J. W. Forbes, W. M. Madigosky, e J. J. Von Bretzel. 1969. «Density and compressibility of four higher alcohols for pressures to 2800 kg./sq. cm». *Journal of Chemical & Engineering Data* 14 (2): 176–80. <https://doi.org/10.1021/je60041a006>.

Merzel, Franci, e Jeremy C. Smith. 2002. «Is the First Hydration Shell of Lysozyme of Higher Density than Bulk Water?» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (8): 5378–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.082335099>.

Millero, F J, G K Ward, e P Chetirkin. 1976. «Partial Specific Volume, Expansibility, Compressibility, and Heat Capacity of Aqueous Lysozyme Solutions.» *Journal of Biological Chemistry* 251 (13): 4001–4. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33347-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33347-1).

Moldovan, Octavia-Laura, Aura Rusu, Corneliu Tanase, e Camil-Eugen Vari. 2021. «Glutamate - A Multifaceted Molecule: Endogenous Neurotransmitter, Controversial Food Additive, Design Compound for Anti-Cancer Drugs. A Critical Appraisal». *Food and Chemical Toxicology* 153 (julho): 112290. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112290>.

Neuberger, Albert. 1936. «Dissociation constants and structures of glutamic acid and its esters». *Biochemical Journal* 30 (11): 2085–94.

«NIST». 2023. <https://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>.

Pace, C. Nick, Felix Vajdos, Lanette Fee, Gerald Grimsley, e Theronica Gray. 1995. «How to Measure and Predict the Molar Absorption Coefficient of a Protein». *Protein Science* 4 (11): 2411–23. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>.

Palani, R, G Srinivasan, e B Geeta Lakshmi. 2011. «Ultrasonic Studies on Molecular Interaction of Arginine in Aqueous Disaccharides at 298.15K».

Prieto, Nieves M. C. T., Thiago A. Souza, Ana P. Egas, Abel G. M. Ferreira, Lélío Q. Lobo, e António T. A. Portugal. 2016. «Liquid Glycerol: Experimental Densities at Pressures of up to 25MPa, and Some Derived Thermodynamic Properties». *The Journal of Chemical Thermodynamics* 101 (outubro): 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.05.006>.

Protić, D., e M. Stanković. 2021. «Levenberg-Marquardt». *ArXiv*. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-q-Levenberg-Marquardt-method-for-unconstrained-Proti%C4%87-Stankovi%C4%87/81f03f248a783bd8c2377cca50f62fa9ac8c8f74>.

Rodante, F., G. Marrosu, e F. Fantauzzi. 1989. «Thermodynamics of the Second Proton Dissociation Processes of Nine α -Amino-Acids and the Third Ionization Processes of Glutamic Acid, Aspartic Acid and Tyrosine». *Thermochimica Acta* 141 (março): 297–303. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(89\)87065-0](https://doi.org/10.1016/0040-6031(89)87065-0).

Romero, Carmen M., Manuel S. Páez, e Dairo Pérez. 2008. «A Comparative Study of the Volumetric Properties of Dilute Aqueous Solutions of 1-Propanol, 1,2-Propanediol, 1,3-Propanediol, and 1,2,3-Propanetriol at Various Temperatures». *The Journal of Chemical*

Thermodynamics 40 (12): 1645–53. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2008.07.005>.

Safarov, J., F. Millero, R. Feistel, A. Heintz, e E. Hassel. 2009. «Thermodynamic Properties of Standard Seawater: Extensions to High Temperatures and Pressures». *Ocean Science* 5 (3): 235–46. <https://doi.org/10.5194/os-5-235-2009>.

Sano, Chiaki, Nobuya Nagashima, Tetsuya Kawakita, e Yoichi Iitaka. 1989. «Crystal and Molecular Structures of Monosodium L-Glutamate Monohydrate». *Analytical Sciences* 5 (1): 121–22. <https://doi.org/10.2116/analsci.5.121>.

Seuss-baum, Ingrid. 2007. «Nutritional Evaluation of Egg Compounds». Em *Bioactive Egg Compounds*, editado por Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton, e Rüdiger Schade, 117–44. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_18.

Sharma, Anurag, Javeed M. Pasha, e Shashank Deep. 2010. «Effect of the Sugar and Polyol Additives on the Aggregation Kinetics of BSA in the Presence of N-Cetyl-N,N,N-Trimethyl Ammonium Bromide». *Journal of Colloid and Interface Science* 350 (1): 240–48. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.054>.

Siddique, Jamal Akhter, Sheetal Sharma, Umer Rashid, Kurt E. Geckeler, e Saeeda Naqvi. 2014. «Thermodynamic Behavior of Glucose, Maltose, and Urea on Stabilization Lysozyme Solution». *Arabian Journal for Science and Engineering* 39 (7): 5445–49. <https://doi.org/10.1007/s13369-014-1114-7>.

Singh, Man. 2007. «Structural Interactions of Globular Proteins—Bovine Serum Albumin, Egg Albumin, and Lysozyme, in Aqueous Medium, Elucidated with Molar Volumes, Viscosities, Energy Functions, and IR Spectra from 293.15 to 303.15 K». *Journal of Applied Polymer Science* 103 (3): 1420–29. <https://doi.org/10.1002/app.24626>.

«Son Iksae, 2017». s.d. Acedido a 19 de maio de 2023. https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/80737/1/Son_Iksae_201711_PhD_thesis.pdf.

Suzuki, Yoshihisa, Hiroshi Matsuo, Yoshikata Koga, Katsuya Mukae, Tetsuya Kawakita, e Seiji Sawamura. 2001. «Effects of Pressure and Temperature on the Solubility of Monosodium L-Glutamate Monohydrate in Water». *High Pressure Research* 21 (2): 93–104. <https://doi.org/10.1080/08957950108201007>.

Tanaka, M, G Girard, R Davis, A Peuto, e N Bignell. 2001. «Recommended table for

the density of water between 0 C and 40 C based on recent experimental reports». *Metrologia* 38 (4): 301–9. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/38/4/3>.

Wagner, W., e A. Pruß. 2002. «The IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use». *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 31 (2): 387–535. <https://doi.org/10.1063/1.1461829>.

Xu, Li, Xingen Hu, e Ruisen Lin. 2003. «Volumetric Properties of Glycerol with N,N-Dimethylformamide and with Water at 25 and 35°C». *Journal of Solution Chemistry* 32 (4): 363–70. <https://doi.org/10.1023/A:1023757905334>.

Yadav, Jay Kant. 2010. «Effect of Monosodium Glutamate (MSG) on Alpha-Amylase Activity».

Zielenkiewicz, A. 2001. «Apparent Molar Volumes and Heat Capacities of Nucleating Lysozyme Solutions at 25°C». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 65 (2): 467–72. <https://doi.org/10.1023/A:1017933220138>.

Zielenkiewicz, A., e W. Zielenkiewicz. 2005. «Comparison of Enthalpy and Apparent Molar Volume Data on Nucleating Lysozyme Solution at Various Li₂SO₄, MgCl₂ and (NH₄)₂SO₄ Concentrations». *Journal of Molecular Liquids*, Selected papers of the 2nd International Symposium on the «Thermodynamics and Structure of Liquids», 121 (1): 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2004.08.020>.

Zielenkiewicz, A., e W. Zielenkiewicz. 2007. «Calorimetric and Volumetric Data of Salting of Hen Egg Lysozyme Using NaCl Solution at PH 8.8». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 90 (3): 941–44. <https://doi.org/10.1007/s10973-006-8299-2>.

7. ANEXOS

ANEXO A: Lisozima da clara do ovo da galinha

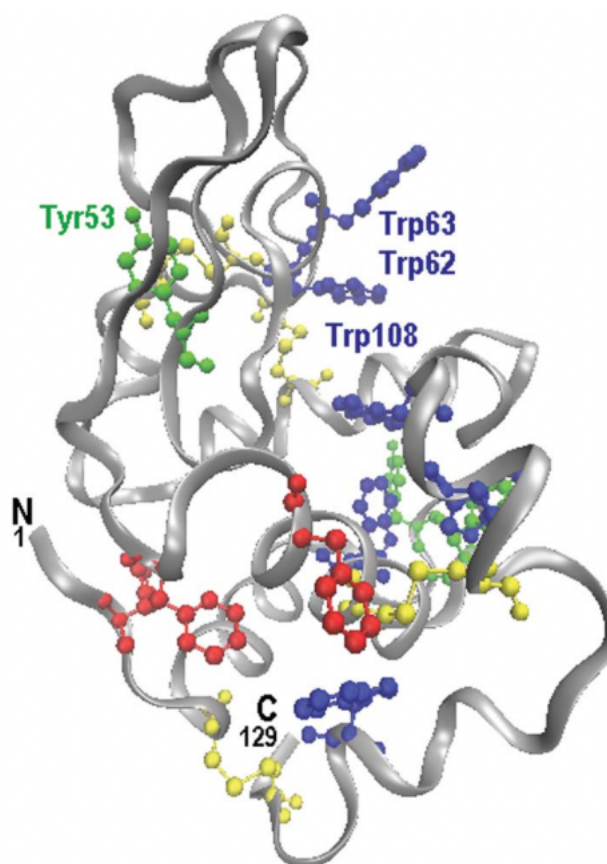


Figura 1. Lisozima de clara de ovo de galinha (HEWL). O terminal N e o terminal C estão marcadas. Os resíduos aromáticos que foram discutidos no texto estão destacados: Phe (vermelho), Tyr (verde), Trp (azul). Entre os resíduos de cisteína (amarelo) ocorrem as pontes de dissulfureto. Tyr53, Trp62, Trp63 e Trp108 encontram-se no sítio activo da enzima (Mangialardo et al. 2012).

ANEXO B: Dados experimentais para a calibração da sonda

Temperatura (T) do termómetro padrão em função da resistência (R).

T/ °C	R/Ω	T/ °C	R/Ω
7.10	102.86	35.01	113.72
7.11	102.87	35.01	113.71
7.12	102.87	34.97	113.70
7.13	102.87	39.81	115.55
10.19	104.05	39.82	115.55
10.21	104.07	39.83	115.56
10.23	104.07	39.82	115.55
15.66	106.19	44.75	117.46
15.67	106.20	44.74	117.45
20.30	107.96	50.19	119.56
20.64	108.13	50.20	119.56
20.70	108.16	55.06	121.44
20.71	108.16	55.13	121.47
20.72	108.17	55.12	121.46
20.73	108.17	60.00	123.34
29.93	111.70	65.09	125.29
29.85	111.69	65.10	125.30
29.84	111.68	70.22	127.26
29.84	111.69	70.23	127.26
34.96	113.67	70.24	127.27
34.95	113.66	74.86	129.04
34.93	113.66	74.88	129.05
30.33	111.90	74.87	129.04
30.32	111.89	79.73	130.86
30.33	111.90	79.74	130.86
34.96	113.69	79.75	130.87

ANEXO C: Dados experimentais para o vácuo

Períodos de oscilação em função da temperatura para o vácuo a pressão na ordem de 5 Pa.

$\tau/\mu\text{s}$	T/K	$\tau/\mu\text{s}$	T/K	$\tau/\mu\text{s}$	T/K	$\tau/\mu\text{s}$	T/K	$\tau/\mu\text{s}$	T/K
3.876027	292.99	3.881607	303.90	3.889216	318.62	3.897059	333.51	3.902087	343.00
3.876030	293.04	3.881606	303.90	3.889215	318.59	3.897060	333.49	3.902087	343.00
3.876035	293.07	3.881606	303.90	3.889217	318.59	3.897060	333.54	3.904881	348.33
3.876040	293.09	3.881606	303.90	3.889216	318.59	3.897059	333.57	3.904947	348.39
3.876042	293.07	3.881605	303.90	3.891765	323.49	3.897059	333.57	3.904977	348.39
3.876045	293.07	3.883971	308.48	3.891764	323.43	3.897059	333.57	3.904987	348.41
3.876047	293.09	3.883968	308.48	3.891761	323.43	3.899713	338.57	3.904991	348.44
3.876047	293.07	3.883965	308.46	3.891760	323.46	3.899736	338.59	3.904990	348.41
3.876048	293.09	3.883962	308.46	3.891758	323.46	3.899745	338.59	3.904988	348.39
3.876049	293.09	3.883962	308.48	3.891755	323.46	3.899745	338.59	3.904985	348.39
3.878888	298.61	3.883962	308.46	3.891754	323.43	3.899742	338.57	3.904984	348.39
3.878886	298.61	3.883961	308.46	3.891753	323.46	3.899741	338.59	3.904984	348.39
3.878885	298.61	3.883960	308.46	3.891752	323.46	3.899739	338.57	3.905727	349.66
3.878884	298.61	3.883960	308.48	3.891752	323.46	3.899737	338.59	3.905677	349.66
3.878884	298.61	3.883959	308.46	3.894580	328.80	3.899735	338.59	3.905655	349.63
3.878881	298.61	3.883959	308.48	3.894578	328.82	3.899733	338.57	3.905650	349.63
3.878879	298.61	3.883958	308.46	3.894575	328.82	3.899732	338.54	3.905650	349.63
3.878879	298.61	3.886805	313.95	3.894573	328.80	3.899729	338.54	3.905652	349.63
3.878879	298.61	3.886802	313.95	3.894570	328.80	3.902086	343.00	3.905655	349.63
3.878878	298.61	3.886799	313.93	3.894568	328.80	3.902094	343.02	3.905656	349.66
3.878877	298.61	3.886796	313.95	3.894566	328.82	3.902098	343.00	3.905657	349.66
3.878878	298.61	3.886796	313.95	3.894564	328.80	3.902101	343.02	3.905902	350.10
3.881614	303.90	3.886793	313.95	3.894562	328.77	3.902101	343.02	3.905897	350.10
3.881611	303.90	3.886791	313.93	3.894560	328.77	3.902094	343.00	3.905891	350.10
3.881609	303.90	3.889220	318.59	3.897071	333.57	3.902090	343.00	3.905889	350.10
3.881610	303.90	3.889219	318.62	3.897066	333.54	3.902088	343.00	3.905886	350.10
3.881607	303.90	3.889217	318.59	3.897062	333.54	3.902085	343.00	3.905884	350.10
3.881606	303.90	3.889217	318.59	3.897061	333.54	3.902085	342.97	3.905881	350.07

ANEXO D: Dados experimentais para o glicerol

Dados experimental para o glicerol (Resistência R (Ω) e período de vibração τ (μ s)).

R (Ω)	τ (μ s)	R (Ω)	τ (μ s)	R (Ω)	τ (μ s)	R (Ω)	τ (μ s)
109.84	4.138223	121.56	4.151412	117.67	4.147025	129.03	4.159915
109.83	4.138241	121.56	4.151413	117.67	4.147025	129.03	4.159917
109.84	4.138249	123.55	4.153676	117.66	4.147022	129.02	4.159914
109.83	4.138252	123.55	4.153673	117.66	4.14702	129.02	4.159911
109.84	4.138253	123.55	4.153672	119.7	4.149313	129.02	4.15991
109.84	4.138254	123.55	4.153671	119.7	4.149313	129.02	4.15991
109.84	4.138253	123.54	4.153671	119.69	4.149309	129.02	4.159909
109.84	4.138254	123.54	4.153669	119.69	4.149306	129.02	4.159908
111.73	4.140383	123.54	4.153669	119.69	4.149304	129.02	4.159908
111.73	4.140379	123.54	4.153669	119.69	4.149305	130.98	4.162164
111.73	4.140377	123.55	4.15367	119.69	4.149304	130.98	4.162163
111.73	4.140374	123.54	4.153669	119.69	4.149303	130.99	4.162164
111.72	4.140372	125.49	4.155874	119.69	4.149303	130.99	4.162164
111.72	4.140371	125.49	4.155878	119.69	4.149302	130.99	4.162163
111.72	4.14037	125.49	4.15588	119.68	4.149302	130.98	4.162162
113.88	4.14279	125.49	4.155879	121.57	4.151419	130.98	4.162161
113.88	4.142787	125.49	4.155878	121.57	4.151418	130.98	4.16216
113.87	4.142783	125.49	4.155876	121.56	4.151417	130.98	4.162161
113.87	4.142782	125.49	4.155877	121.56	4.151416	130.98	4.162161
113.87	4.14278	125.49	4.155876	121.56	4.151415	130.98	4.162157
113.87	4.14278	125.49	4.155877	121.56	4.151415	130.99	4.16216
113.88	4.142778	125.49	4.155876	121.56	4.151413	130.99	4.16216
113.88	4.142775	125.49	4.155875	121.56	4.151413	130.99	4.162161
113.88	4.142775	125.49	4.155876	121.56	4.151412	130.99	4.162161
115.76	4.144891	125.49	4.155876				
115.76	4.144887	127.43	4.158082				
115.75	4.144886	127.43	4.158088				
115.75	4.144884	127.43	4.15809				
115.75	4.144883	127.43	4.15809				
115.75	4.144881	127.43	4.158089				
115.75	4.14488	127.43	4.158088				

117.67	4.147036	127.43	4.158087
117.67	4.147034	127.43	4.158087
117.67	4.14703	127.43	4.158088
117.67	4.147028	127.43	4.158088
117.67	4.147028	129.02	4.159901
117.67	4.147027	129.02	4.159911

ANEXO E: Dados para o glicerol de diferentes autores.

Resumo da massa volúmica de diferentes autores, com as técnicas usadas, gama de temperatura e pressão.

Autores	Ano	Np	ΔT /K	P/MPa	ρ /kg.m ⁻³ (ur) ^a	Método ^b	Pureza (m/m)
(Bosart e Snoddy 1927)	1928	4	288.15–298.15	0.1	(1262–1265) not	PIC	(ns)
(Darbari et al. 1967)	1967	3	313.15–333.15	0.1	(1234–1247) (ns)	PIC	Ns
(McDuffie et al. 1969)	1969	90	223–353	0.1	(1220–1365) (0.05%)	VB	(3'10 ⁻³) de água
(Xu, Hu, e Lin 2003)	2003	2	298.15,308.15	0.1	(1254,1244) (0.01)	VTD	0.995
(Adamenko et al. 2006)	2006	13	290.35–355.95	0.1	(1224–1267) (ns)	PIC	DIST
(Li, Su, e Wang 2007)	2007	8	298.15–333.15	0.1	(1236–1259) (0.3)	PYC	>0.999
(Romero, Páez, e Pérez 2008)	2008	6	283.15–308.15	0.1	(1253–1266) (0.05)	PIC	0.99
(Khelladi et al. 2009)	2009	110	283–373	0.1–100	(1209–1291) (0.05%)	VTD	Ns
(Ge, Ma, e Chu 2010)	2010	9	298.15–338.15	0.1	(1233–1258) (1%)	PIC	>0.997
(Egorov e Makarov 2012)	2012	6	293.15–348.15	0.1	(1226–1261) (0.05)	VTD	0.995
(Palani, Srinivasan and Lakshmi, 2012)	2012	3	303–313	0.1	(1251–1258)	PIC	Ns
(Kijevčanin et al. 2013)	2013	3	293–303	0.1	(1255–1261) (0.3)	VTD	0.995
(Koohyar et al. 2011)	2013	3	303–323	0.1	(1243–1256)	VTD	0.98
(Egorov, Makarov, e Kolker 2013)	2013	8	278.15–348.15	0.1	(1226–1271) (0.05)	VTD	>0.995
(Egorov e Makarov 2014)	2014	30	278.15–323.15	0.1–100	(1242–1299) (0.05)	VTD	>0.995 (2'10 ⁻⁴) de água
(Prieto et al. 2016)	2016	60	298.15–348.15	0.1–25	(1229–1267)	VTD	>0.995 (0.001) de água

^a incerteza na massa volúmica, $u(\rho)$ é dada em kg.m⁻³ ou em percentagem. Os limites superior e inferior de massa volúmica foram arredondados para valores inteiros. ^b métodos VB: célula de volume variável; VTD: densímetro de tubo vibrante; PIC: picnómetro.

ANEXO F: Dados experimentais para as soluções de tampão.*Dados experimentais para a solução tampão.*

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)
109.99	4.086078	120.74	4.097702
109.99	4.086053	120.73	4.097687
109.99	4.086026	120.73	4.097684
109.99	4.086005	120.73	4.09768
109.99	4.085983	120.73	4.097675
109.99	4.08596	120.73	4.097671
109.99	4.085942	120.72	4.097668
109.99	4.085923	120.72	4.097665
109.99	4.085907	120.72	4.097662
111.69	4.087386	122.86	4.099969
111.74	4.08765	122.86	4.099961
111.75	4.087792	122.86	4.099955
111.75	4.087863	122.86	4.09995
111.75	4.087893	122.86	4.099938
111.75	4.087897	122.86	4.099935
111.74	4.0877889	122.86	4.099932
111.74	4.087874	122.86	4.099929
111.74	4.087855	124.8	4.098907
111.74	4.087837	124.8	4.098867
111.74	4.087818	124.8	4.098838
111.73	4.087799	124.8	4.098832
111.73	4.087782	124.8	4.09883
111.73	4.087766	124.8	4.098836
111.73	4.087753	124.8	4.098838
111.72	4.087739	124.8	4.098837
111.72	4.087727	126.6	4.100436
111.72	4.087715	126.6	4.100434
113.85	4.090154	126.6	4.100429
113.85	4.090142	126.59	4.100425
113.84	4.090128	126.59	4.100424
113.84	4.090116	126.59	4.100422

113.84	4.090102	126.59	4.100422
113.84	4.090083	126.59	4.100419
113.84	4.090083	126.59	4.10042
113.84	4.090072	127.95	4.101412
113.84	4.090064	127.96	4.101442
113.84	4.090057	127.97	4.101472
115.65	4.092121	127.97	4.101475
115.64	4.092118	127.97	4.101501
115.64	4.092108	127.97	4.101506
115.64	4.09210	127.97	4.101525
115.64	4.092093	130.24	4.10316
115.64	4.092087	130.23	4.103076
115.64	4.092082	130.23	4.102978
115.64	4.092079	130.23	4.10293
118.18	4.094947	130.23	4.102962
118.17	4.094938	130.23	4.102966
118.17	4.094927	130.23	4.102961
118.17	4.094917	131.55	4.103719
118.17	4.094910	131.55	4.103741
118.17	4.094903	131.56	4.10375
118.17	4.094896	131.56	4.103743
118.17	4.094891	131.56	4.103723
118.17	4.094889	131.56	4.103743
118.17	4.094885	131.56	4.103744
120.74	4.097719	131.56	4.103744
120.74	4.097712	131.56	4.103744

ANEXO G: Dados experimentais para as soluções de GMS.

Dados experimentais do GMS para o ensaio 1 m = 0.2546/A1 mol.kg.⁻¹

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K) media	ρ (kg.m⁻³) media
110.00	4.093948	117.80	4.102915	293.80	1019.00
110.00	4.093944	117.80	4.102913	303.87	1013.27
110.00	4.093940	117.80	4.102912	313.91	1005.89
110.00	4.093938	117.80	4.102911	318.46	1001.48
110.00	4.093936	117.80	4.102911	323.53	996.57
110.00	4.093934	117.80	4.102910	333.09	986.31
110.00	4.093935	117.80	4.102910		
110.00	4.093934	119.70	4.105069		
111.78	4.096011	119.70	4.105067		
111.78	4.096007	119.70	4.105065		
111.78	4.096004	119.70	4.105065		
111.78	4.096003	123.52	4.109245		
111.78	4.096000	123.52	4.109243		
111.78	4.095998	123.52	4.109243		
111.78	4.095998	123.51	4.109240		
111.78	4.095997	123.51	4.109240		
111.78	4.095997	123.51	4.109240		
111.78	4.095997	127.25	4.113096		
113.81	4.098367	127.25	4.113096		
113.81	4.098363	127.25	4.113095		
113.81	4.098359	127.25	4.113087		
113.81	4.098356	127.24	4.113086		
115.77	4.100612	127.24	4.113085		
115.77	4.100610	127.24	4.113083		
115.77	4.100607	127.24	4.113082		
115.77	4.100606	127.24	4.113079		
115.77	4.100605	127.24	4.113077		
115.77	4.100605	131.11	4.116589		
115.77	4.100605	131.11	4.116589		

115.77	4.100605	131.11	4.116575
117.80	4.102920	131.11	4.116563
117.80	4.102917	131.11	4.116553
117.80	4.102916	131.11	4.116553

Dados experimentais do GMS para o ensaio 2 m = 0.2546/A2 mol.kg⁻¹ (replica).

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K) media	ρ (kg.m⁻³) media
108.23	4,091616	119,5	4,099079	298.22	1012.57
108.23	4,091612	119,5	4,105801	303.42	1010.43
108.22	4,091607	119,5	4,105788	308.77	1007.20
108.22	4,091602	119,5	4,105777	313.55	1003.97
108.22	4,091599	119,5	4,105773	318.70	1000.36
108.22	4,091592	119,5	4,105764	323.75	996.45
111.07	4,095021	119,5	4,105757	333.46	988.66
111.07	4,094983	119,5	4,105751	338.57	984.35
111.07	4,094966	119,5	4,105744	343.10	980.54
111.07	4,094950	119,5	4,105737	348.02	975.82
111,06	4,095032	119,5	4,105724	353.13	970.79
111,06	4,094917	121,55	4,105719		
111,06	4,094899	121,55	4,107902		
111,06	4,094869	121,55	4,107898		
111,06	4,094854	121,55	4,107884		
111,06	4,094838	121,55	4,107879		
113,99	4,097956	121,55	4,107875		
113,99	4,097927	121,55	4,107871		
113,99	4,097894	121,55	4,107867		
113,98	4,097867	121,55	4,107864		
113,98	4,097820	121,55	4,107862		
113,98	4,097802	121,55	4,10786		
113,98	4,097769	121,55	4,107856		
113,98	4,097785	123,24	4,109577		
115,3	4,099137	123,24	4,109569		

115,3	4,099127	123,24	4,109563
115,3	4,099109	123,24	4,10956
115,29	4,099104	123,24	4,109556
115,29	4,099097	123,24	4,109556
115,29	4,099091	123,24	4,109556
115,29	4,099087	123,24	4,109569
115,29	4,099083	123,24	4,109577
115,29	4,101221	129,47	4,115274
117,29	4,101216	129,47	4,11527
117,28	4,101212	129,47	4,115266
117,28	4,101206	129,47	4,115257
117,28	4,101203	129,47	4,115252
117,28	4,101299	129,47	4,115248
117,28	4,101296	129,47	4,115246
117,28	4,101293	130,88	4,116296
117,28	4,101290	130,88	4,116284
117,28	4,101289	130,88	4,116273
117,28	4,106118	130,88	4,116255
117,28	4,106074	130,88	4,116251
119,49	4,106074	130,88	4,116248
119,49	4,106034	130,88	4,116245
119,49	4,105970	130,88	4,116242
119,49	4,105963	130,88	4,116241
119,49	4,105932	130,87	4,116237
119,49	4,105901	130,87	4,116231
119,49	4,105976	130,87	4,116224
119,49	4,105954	130,87	4,116219

Dados experimentais do GMS para o ensaio 3 m = 0.5219/Al mol.kg⁻¹

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K) media	ρ (kg.m⁻³) Media
110.00	4.093959	117.80	4.102917	298.64	1037.39
110.00	4.093952	117.80	4.102916	303.25	1035.12
110.00	4.093948	117.80	4.102916	308.51	1032.27
110.00	4.093942	117.80	4.102915	313.59	1029.12
110.00	4.093944	117.80	4.10213	318.85	1025.60
110.00	4.093940	119.71	4.105071	323.77	1022.19
110.00	4.093938	119.70	4.105072	333.66	1014.60
111.78	4.096011	119.70	4.105069	343.32	1006.38
111.78	4.096007	119.70	4.105067	353.34	996.27
111.78	4.096004	119.70	4.105065		
111.78	4.096003	123.52	4.109245		
111.78	4.096000	123.52	4.109243		
111.78	4.095998	123.52	4.109240		
111.78	4.095998	123.51	4.109240		
111.78	4.095997	123.51	4.109240		
113.97	4.098367	127.25	4.113096		
113.97	4.098363	127.25	4.113096		
113.97	4.098359	127.25	4.113095		
113.97	4.098356	127.25	4.113087		
113.97	4.098354	127.25	4.113086		
113.97	4.098352	127.25	4.113085		
113.97	4.098352	127.24	4.113083		
115.77	4.100612	127.24	4.113082		
115.77	4.100610	127.24	4.113082		
115.77	4.100610	127.24	4.113079		
115.77	4.100607	127.24	4.113077		
115.77	4.100606	127.24	4.113075		
115.77	4.100605	131.00	4.125304		
115.77	4.100605	131.00	4.125295		
115.77	4.100605	131.00	4.125283		

115.77	4.100605	131.00	4.12528
115.77	4.100605	131.00	4.125279
117.80	4.102920	131.00	4.125277
117.80	4.102917	131.00	4.125275
117.80	4.102920	131.00	4.125273
117.80	4.102917	131.00	4.125272

Dados experimentais do GMS para o ensaio 4 m = 0.5219/A2 mol.kg⁻¹ (replica)

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K) media	ρ (kg.m⁻³) Media
109.89	4.102944	119.64	4.113842	298.34	1044.93
109.89	4.102935	119.64	4.113839	303.34	1041.69
109.89	4.102925	119.64	4.113838	308.32	1037.80
109.88	4.10292	119.63	4.113837	313.26	1034.16
109.88	4.102913	119.63	4.113834	318.22	1029.77
109.88	4.102907	119.63	4.113833	323.15	1025.33
109.88	4.10290	119.63	4.11383	328.09	1021.13
111.85	4.105136	119.63	4.11383	333.03	1016.92
111.85	4.105131	121.61	4.1159993	337.96	1012.61
111.85	4.105131	121.61	4.11599	342.86	1006.73
111.85	4.105126	123.51	4.11805	347.78	1001.01
111.85	4.105123	123.51	4.118046	352.67	995.70
111.85	4.105119	123.51	4.118044		
111.85	4.105117	123.51	4.11804		
111.85	4.105115	123.51	4.118037		
113.97	4.107539	123.51	4.118032		
113.97	4.107534	123.51	4.118031		
113.97	4.10753	123.51	4.118027		
113.97	4.107525	127.35	4.121992		
113.97	4.107521	127.35	4.121985		
113.97	4.107517	127.35	4.121979		
113.97	4.107515	127.35	4.121977		
115.66	4.109456	127.35	4.121975		
111.65	4.109447	127.35	4.121973		
111.65	4.109444	127.35	4.12197		
111.65	4.109438	127.35	4.121969		
111.65	4.109436	127.35	4.121968		
111.65	4.109434	131.00	4.125304		
111.65	4.109432	131.00	4.125295		
117.69	4.111733	131.00	4.125283		

117.68	4.111729	131.00	4.12528
117.68	4.111723	131.00	4.125279
117.68	4.11172	131.00	4.125277
117.68	4.111717	131.00	4.125275
117.68	4.111714	131.00	4.125273
117.68	4.111713	131.00	4.125272

Dados experimentais do GMS para o ensaio 5 m = 1.1006 mol.kg⁻¹.

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K)	ρ (kg.m⁻³)
				media	Media
109.89	4.102944	117.68	4.111720	298.34	1082.74
109.89	4.102935	117.68	4.111717	303.43	1079.83
109.89	4.102925	117.68	4.111714	308.92	1076.47
109.89	4.102920	117.68	4.111720	313.30	1073.68
109.89	4.102913	119.64	4.113839	318.54	1069.96
109.89	4.102907	119.64	4.113840	323.60	1065.90
111.85	4.105136	119.64	4.113839	328.73	1061.91
111.85	4.105131	119.63	4.113838	333.64	1057.87
111.85	4.105131	119.63	4.113837	343.59	1049.22
111.85	4.105126	119.63	4.113834	353.05	1039.68
111.85	4.105123	119.63	4.113833		
111.85	4.105119	119.63	4.113830		
111.85	4.105117	121.62	4.116027		
111.85	4.105114	121.62	4.116022		
113.97	4.117539	121.62	4.116015		
113.97	4.117539	121.62	4.116010		
113.97	4.117534	121.62	4.116005		
113.97	4.117530	121.62	4.116002		
113.97	4.117525	121.61	4.115997		
113.97	4.117521	123.36	4.118050		
113.97	4.117517	123.51	4.118050		
113.97	4.117515	123.51	4.118046		
113.97	4.117515	123.51	4.118044		
115.66	4.109456	123.51	4.118037		
115.66	4.109447	123.51	4.118032		
115.66	4.109444	123.51	4.118031		
115.66	4.1094543	123.51	4.118027		
115.66	4.109442	127.35	4.121992		
115.66	4.109441	127.35	4.121985		
115.66	4.109439	127.35	4.121979		

115.66	4.109440	127.35	4.121977
115.65	4.109438	127.35	4.121975
115.65	4.109436	131.04	4.125304
115.65	4.109434	131.04	4.125295
115.65	4.109432	131.04	4.125283
117.69	4.111733	131.04	4.125280
117.68	4.111733	131.04	4.125283
117.68	4.111729	131.04	4.125280
117.68	4.111723	131.04	4.121979

Dados experimentais do GMS para o ensaio 6 m = 1.1006 mol.kg⁻¹ (replica).

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K) media	ρ (kg.m⁻³) Media
108.13	4.087677	119.62	4.099708	298.35	1082.04
108.13	4.08767	119.62	4.099707	303.35	1079.59
108.13	4.087662	119.62	4.099713	308.29	1077.59
108.13	4.087654	119.62	4.099710	313.26	1074.75
108.13	4.087648	119.62	4.099707	318.18	1071.99
108.13	4.087643	123.32	4.103209	323.15	1068.93
108.13	4.087637	123.32	4.103196	328.09	1065.56
108.13	4.087633	123.32	4.103184	333.03	1061.68
108.13	4.087627	123.31	4.103171	337.95	1058.48
108.13	4.087623	123.31	4.103161	342.86	1055.70
112.03	4.092019	123.31	4.103153		
112.03	4.091968	123.31	4.103146		
112.03	4.091956	123.31	4.103139		
112.03	4.091945	123.31	4.103134		
112.03	4.091932	123.31	4.103127		
112.02	4.091924	123.31	4.103126		
112.02	4.091916	123.31	4.103120		
112.02	4.091912	123.31	4.103115		
112.02	4.091907	123.31	4.103110		
112.02	4.091903	127.31	4.106147		
112.02	4.091905	127.31	4.106124		
112.02	4.091905	127.31	4.106100		
112.02	4.091904	127.31	4.106076		
115.90	4.096104	127.31	4.106062		
115.90	4.096098	127.31	4.106044		
115.90	4.096094	127.31	4.106034		
115.90	4.096090	127.31	4.106025		
115.90	4.096087	127.31	4.106027		
115.90	4.096084	127.31	4.106017		
115.90	4.096076	127.31	4.106009		

115.90	4.096074	127.30	4.106001
115.90	4.096066	127.30	4.105995
115.90	4.096062	130.87	4.106831
115.90	4.096060	130.87	4.106803
115.90	4.096056	130.87	4.106790
117.67	4.097830	130.87	4.106779
117.67	4.097816	130.87	4.106770
117.66	4.097802	130.87	4.106755
117.66	4.097795	130.87	4.106743
117.66	4.097793	130.87	4.106729
117.66	4.097792	130.87	4.106718
117.66	4.097790	130.87	4.106711
117.66	4.097789	130.87	4.106704
117.66	4.097787	130.87	4.106696
117.66	4.097785	130.87	4.106690
119.62	4.099749	130.87	4.106684
119.62	4.099741	130.87	4.106682
119.62	4.099734	130.87	4.106678
119.62	4.099730	130.87	4.106674
119.62	4.099724	130.87	4.106668
119.62	4.099717	130.87	4.106658
119.62	4.099713	130.87	4.106652

Dados experimentais do GMS para o ensaio 7 $m = 1.1477 \text{ mol.kg}^{-1}$.

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K)	ρ (kg.m^{-3})
109.79	4.087865	121.56	4.100721	298.25	1126.65
109.79	4.087863	121.56	4.100716	303.82	1123.10
109.79	4.087861	121.56	4.100711	308.90	1120.22
109.78	4.087859	121.56	4.100708	313.57	1117.20
109.78	4.087855	121.56	4.100705	318.93	1113.54
109.78	4.087850	121.56	4.100703	323.55	1110.32
109.78	4.087846	121.56	4.100699	333.25	1103.00
109.78	4.087842	121.56	4.100696	343.23	1095.15
109.78	4.087839	121.56	4.100696	353.15	1086.22
109.78	4.087834	121.56	4.100693		
109.78	4.087830	121.56	4.100693		
109.78	4.087827	123.43	4.102686		
109.78	4.087823	123.43	4.102681		
109.78	4.087820	123.43	4.102675		
111.83	4.090230	123.43	4.102669		
111.83	4.090217	123.43	4.102663		
111.83	4.090203	123.43	4.102658		
111.83	4.090191	123.43	4.102653		
111.83	4.090179	123.43	4.102648		
111.83	4.090168	123.43	4.102645		
111.83	4.090158	123.43	4.102642		
111.83	4.090148	123.43	4.102641		
111.83	4.090139	123.43	4.102638		
111.83	4.090130	123.43	4.102636		
111.83	4.090122	125.41	4.104703		
111.83	4.090114	125.41	4.104700		
113.88	4.092385	125.41	4.104698		
113.87	4.092379	125.41	4.104695		
113.87	4.092368	125.41	4.104694		
113.87	4.092359	125.41	4.104691		
113.87	4.092350	125.41	4.104689		

113.87	4.092344	125.41	4.104686
113.87	4.092338	125.41	4.104684
113.87	4.092332	125.40	4.104682
113.87	4.092327	127.35	4.106595
113.87	4.092321	127.35	4.106585
113.87	4.092317	127.35	4.106580
113.87	4.092313	127.35	4.106576
113.87	4.092310	127.35	4.106572
115.87	4.094521	127.35	4.106569
115.87	4.094514	127.35	4.106565
115.86	4.094510	127.35	4.106562
115.86	4.094505	127.35	4.106558
115.86	4.094502	127.35	4.106559
115.86	4.094500	127.35	4.106557
115.86	4.094498	127.35	4.106556
115.86	4.094493	129.21	4.108285
115.86	4.094493	129.21	4.108276
115.86	4.094489	129.21	4.108268
115.86	4.094487	129.21	4.108261
117.67	4.096528	129.21	4.108256
117.67	4.096521	129.21	4.108251
117.67	4.096511	129.21	4.108245
117.67	4.096506	129.21	4.108240
117.67	4.096500	129.21	4.108236
117.66	4.096496	129.20	4.108230
117.66	4.096492	129.20	4.108225
117.66	4.096484	129.20	4.108221
117.66	4.096480	130.88	4.109582
117.66	4.096480	130.88	4.109561
117.66	4.096478	130.88	4.109543
117.66	4.096471	130.88	4.109528
117.66	4.096468	130.88	4.109516
119.58	4.098587	130.87	4.109509
119.58	4.098579	130.87	4.109500

119.58	4.098578	130.87	4.109493
119.58	4.098577	130.87	4.109486
119.58	4.098574	130.87	4.109482
119.58	4.098571	130.87	4.109481
119.58	4.098583	130.87	4.109482
119.58	4.098582	130.87	4.109477
119.58	4.098580	130.87	4.109473
119.58	4.098580	130.87	4.109467
119.57	4.098578	130.87	4.109461
119.57	4.098576	130.87	4.109459
119.57	4.098575	130.87	4.109456

Dados experimentais do GMS para o ensaio 8 m = 2.4761 mol.kg⁻¹.

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K)	ρ (kg.m⁻³)
111.92	4.122228	119.58	4.130897	303.61	1164.29
111.92	4.122223	123.41	4.135239	313.55	1157.93
111.92	4.122218	123.41	4.135232	323.47	1150.71
111.92	4.122213	123.41	4.135228	333.37	1143.41
111.92	4.122210	123.40	4.135223	343.20	1136.29
111.92	4.122204	123.40	4.135222	353.02	1129.04
111.92	4.122200	123.40	4.135222		
111.92	4.1222195	123.40	4.135221		
111.92	4.1222188	123.40	4.135220		
115.76	4.126612	123.40	4.135220		
115.76	4.126610	123.40	4.135220		
115.76	4.126605	127.20	4.139448		
115.76	4.126598	127.20	4.139448		
115.76	4.126592	127.20	4.139449		
115.75	4.126586	127.20	4.139451		
115.75	4.126580	127.20	4.139454		
115.75	4.126573	127.20	4.139454		
115.75	4.126567	127.20	4.139455		
115.75	4.126561	127.20	4.139457		
115.75	4.126554	127.20	4.139460		
119.59	4.130923	130.99	4.143431		
119.59	4.130917	130.99	4.143436		
119.58	4.130915	130.99	4.143442		
119.58	4.130911	130.99	4.143447		
119.58	4.130908	130.99	4.143450		
119.58	4.130907	130.99	4.143457		
119.58	4.130904	130.99	4.143461		
119.58	4.130903	130.99	4.143466		
119.58	4.130901	130.99	4.143471		
119.58	4.130899	130.99	4.143476		
119.58	4.130897				

ANEXO H: Dados experimentais para as soluções de LCOG.*Dados experimentais para LCOG ensaio 1 $C = 2.27 \text{ mg.cm}^{-3}$.*

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K)	ρ (kg.m^{-3})
				media	media
109.88	4.086801	121.54	4.098526	298.17	1002.56
109.88	4.086805	121.54	4.098521	303.37	1001.27
109.88	4.086775	121.54	4.098538	308.74	999.45
110.01	4.086773	121.54	4.098535	313.52	997.49
110.01	4.086774	121.54	4.098535	318.67	995.16
110.01	4.086772	121.54	4.098532	328.76	989.75
110.01	4.086772	121.54	4.098530	333.38	987.26
110.01	4.086771	123.41	4.100493	353.06	976.89
110.01	4.086771	123.41	4.100491		
110.01	4.086770	123.41	4.100487		
110.01	4.086769	123.41	4.100483		
110.01	4.086768	123.41	4.100480		
110.01	4.086768	123.41	4.100478		
110.01	4.086767	123.41	4.100476		
110.01	4.086784	123.41	4.100475		
111.89	4.089171	123.41	4.100473		
111.89	4.089170	123.41	4.100473		
111.89	4.089170	123.41	4.100468		
111.89	4.089169	123.41	4.100468		
111.89	4.089170	123.41	4.100466		
111.89	4.089169	123.41	4.100465		
111.89	4.089168	123.41	4.100463		
111.89	4.089168	123.41	4.100462		
111.89	4.089168	125.32	4.102432		
111.89	4.089167	125.32	4.102428		
111.89	4.089168	125.32	4.102422		
113.85	4.091631	125.32	4.102418		
113.85	4.091629	125.32	4.102414		

113.85	4.091627	125.32	4.102413
113.85	4.091627	125.32	4.098526
113.85	4.091626	125.32	4.098521
113.85	4.091625	125.31	4.098538
113.85	4.091624	125.31	4.098535
113.85	4.091623	125.31	4.098535
113.85	4.091622	125.31	4.098532
113.85	4.091623	125.31	4.098530
113.85	4.091622	125.31	4.100493
113.85	4.091623	125.31	4.100491
113.85	4.091622	125.31	4.100487
113.85	4.091621	125.31	4.100483
113.85	4.091620	127.14	4.100480
113.85	4.091620	127.14	4.100478
113.85	4.091620	127.14	4.100476
115.92	4.093199	127.14	4.100475
115.92	4.093166	127.14	4.100473
115.92	4.093129	127.14	4.100473
115.92	4.093100	127.14	4.100468
115.92	4.093075	127.14	4.100468
115.92	4.093054	127.14	4.100466
115.92	4.093034	127.14	4.100465
115.92	4.093016	127.13	4.100463
115.92	4.092998	127.13	4.100462
115.92	4.099830	127.13	4.102432
115.92	4.092966	127.13	4.102428
115.92	4.092953	127.13	4.102422
115.92	4.092941	127.13	4.102418
115.92	4.092929	127.13	4.102414
115.92	4.092917	129.26	4.102413
115.92	4.092907	129.26	4.098526
115.92	4.092897	129.26	4.098521
115.92	4.092888	129.26	4.098538
115.92	4.092888	129.26	4.098535

115.92	4.092888	129.26	4.098535
115.92	4.092881	129.26	4.098532
115.92	4.092872	129.26	4.098530
117.80	4.094772	129.26	4.100493
117.80	4.094771	129.26	4.100491
117.80	4.094769	129.26	4.100487
117.80	4.094769	129.26	4.100483
117.80	4.094767	129.26	4.100480
117.80	4.094766	129.26	4.100478
117.80	4.094763	129.26	4.100476
117.80	4.086801	129.26	4.100475
117.80	4.086805	129.26	4.100473
117.80	4.086775	129.26	4.100473
117.80	4.086773	129.26	4.100468
117.80	4.086774	130.93	4.100468
117.80	4.086772	130.93	4.100466
117.80	4.086772	130.93	4.100465
117.80	4.086771	130.93	4.100463
117.80	4.086771	130.93	4.100462
119.59	4.086770	130.93	4.102432
119.59	4.086769	130.93	4.102428
119.59	4.086768	130.93	4.102422
119.59	4.086768	130.93	4.102418
119.59	4.086767	130.93	4.102414
119.59	4.086784	130.93	4.102413
119.59	4.089171	130.93	4.098526
119.59	4.089170	130.93	4.098521
119.59	4.089170	130.93	4.098538
119.59	4.089169	130.93	4.098535
119.59	4.089170	130.93	4.098535
119.59	4.089169	130.93	4.098532
119.59	4.089168	130.93	4.098530
119.59	4.089168	130.93	4.100493
119.59	4.089168	132.93	4.100491

119.59	4.089167	132.93	4.100487
119.59	4.089168	132.93	4.100483
119.59	4.091631	132.93	4.100480
119.59	4.091629	132.93	4.100478
119.59	4.091627	132.93	4.100476
121.55	4.091627	132.93	4.100475
121.55	4.091626	132.93	4.100473
121.54	4.091625	132.93	4.100473
121.54	4.091624	132.93	4.100468
121.54	4.091623	132.93	4.100468
121.54	4.091622	132.93	4.100466
121.54	4.091623	132.93	4.100465
121.54	4.091622	132.93	4.100463
121.54	4.091623	132.93	4.100462
121.54	4.091622	132.93	4.102432
121.54	4.091621	132.93	4.102428
121.54	4.091620	132.93	4.102422
121.54	4.091620	132.93	4.102418
121.54	4.091620	132.93	4.102414

Dados experimentais para LCOG ensaio 2 C = 4.35 mg.m⁻³.

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K)	ρ (kg.m⁻³)
109.88	4.086619	119.47	4.098525	298.12	1002.91
109.88	4.086618	119.47	4.098525	303.20	1001.34
109.88	4.086619	119.47	4.098525	308.27	999.60
109.88	4.086617	119.47	4.098525	313.22	997.54
109.88	4.086617	121.38	4.100835	318.19	995.22
109.88	4.086616	121.38	4.100836	323.14	992.70
109.88	4.086614	121.38	4.100836	328.07	990.05
109.88	4.086615	121.38	4.100836	333.00	987.22
109.88	4.086614	121.38	4.100834	337.92	984.49
109.88	4.086615	121.38	4.100833	342.84	981.78
109.88	4.086613	121.38	4.100832	347.76	979.18
109.88	4.086613	121.38	4.100832	352.64	976.87
109.88	4.086612	121.38	4.100833		
109.88	4.086610	121.38	4.100834		
109.88	4.086609	121.38	4.100834		
109.88	4.086607	121.38	4.100834		
111.81	4.089080	121.38	4.100834		
111.81	4.089079	121.38	4.100833		
111.81	4.089076	121.38	4.100832		
111.81	4.089075	121.38	4.100830		
111.81	4.089075	123.27	4.103113		
111.81	4.089073	123.27	4.103112		
111.81	4.089072	123.27	4.103112		
111.81	4.089071	123.28	4.103116		
111.81	4.089070	123.28	4.103116		
111.81	4.089069	123.28	4.103115		
111.81	4.089068	123.27	4.103114		
111.81	4.089069	123.27	4.103112		
111.81	4.089068	123.27	4.103109		
111.81	4.089067	123.27	4.103108		
111.81	4.089065	123.27	4.103107		

111.81	4.089063	123.27	4.103108
111.81	4.089062	123.27	4.103108
111.81	4.089061	125.18	4.105377
111.81	4.089059	125.18	4.105377
113.73	4.091470	125.18	4.105378
113.73	4.091468	125.18	4.105377
113.73	4.091468	125.17	4.105376
113.73	4.091466	125.17	4.105376
113.73	4.091465	125.17	4.105376
113.73	4.091464	125.18	4.105377
113.73	4.091464	125.18	4.105377
113.73	4.091463	125.17	4.105376
113.73	4.091461	125.17	4.105375
113.73	4.091461	125.17	4.105375
113.73	4.091459	125.17	4.105375
113.73	4.091460	125.17	4.105373
113.73	4.091458	125.17	4.105374
113.73	4.091459	125.17	4.105370
113.73	4.091459	125.17	4.105368
113.73	4.091458	127.08	4.107616
115.65	4.093846	127.08	4.107616
115.65	4.093847	127.08	4.107612
115.65	4.093849	127.08	4.107612
115.65	4.093852	127.08	4.107612
115.65	4.093853	127.08	4.107611
115.65	4.093855	127.08	4.107611
115.65	4.093853	127.08	4.107613
115.65	4.093853	127.08	4.107612
115.65	4.093851	127.08	4.107610
115.65	4.093850	127.08	4.107607
115.65	4.093847	127.08	4.107605
115.65	4.093848	127.08	4.107603
115.65	4.093846	128.98	4.109828
115.65	4.093846	128.98	4.109828

115.65	4.093847	128.97	4.109825
115.65	4.093845	128.97	4.109824
115.65	4.093844	128.97	4.109824
115.65	4.093844	128.97	4.109823
115.65	4.093843	128.97	4.109821
117.56	4.09619	128.97	4.109820
117.56	4.096195	128.97	4.109821
117.56	4.096197	128.97	4.109821
117.55	4.096196	128.97	4.109822
117.55	4.096194	128.97	4.109819
117.55	4.096191	128.97	4.109820
117.55	4.096192	130.87	4.112027
117.55	4.096191	130.87	4.112026
117.55	4.096193	130.87	4.112028
117.55	4.096191	130.87	4.112027
117.55	4.096191	130.87	4.112026
117.55	4.096193	130.87	4.112023
117.55	4.096194	130.87	4.112023
117.55	4.096193	130.87	4.112022
117.55	4.096190	130.86	4.112019
119.47	4.098529	130.86	4.112017
119.47	4.098529	130.86	4.112018
119.47	4.098528	130.86	4.112017
119.47	4.098527	130.86	4.112018
119.47	4.098528	130.86	4.112017
119.47	4.098526	130.86	4.112017
119.47	4.098527		

Dados experimentais para LCOG ensaio 3 C = 8.38 mg.m⁻³.

R (Ω)	τ (μs)	R (Ω)	τ (μs)	T (K)	ρ (kg.m⁻³)
109.84	4.087101	119.47	4.099019	298.23	1004.66
109.84	4.087103	121.38	4.101286	303.32	1003.60
109.84	4.087106	121.38	4.101283	308.27	1001.76
109.84	4.087116	121.38	4.101266	313.24	999.56
109.84	4.087108	121.38	4.101259	318.21	996.61
109.84	4.087106	121.38	4.101256	323.14	994.27
109.84	4.087107	121.38	4.101252	328.08	991.17
109.85	4.087111	121.38	4.101242	332.98	987.85
109.85	4.087115	121.37	4.101237	337.92	984.13
109.85	4.087115	121.37	4.101232	342.84	981.16
111.81	4.089668	121.37	4.101231	347.75	978.33
111.81	4.089672	121.37	4.101221	352.66	975.90
111.81	4.089675	121.37	4.101220		
111.81	4.089674	123.27	4.103419		
111.81	4.089672	123.27	4.103409		
111.81	4.089669	123.27	4.103409		
111.81	4.089668	123.27	4.103405		
111.81	4.089667	123.27	4.103400		
111.81	4.089664	123.27	4.103399		
111.81	4.089665	123.27	4.103398		
111.81	4.089664	123.27	4.103398		
111.81	4.089663	123.27	4.103394		
111.81	4.089662	123.27	4.103393		
113.73	4.092060	123.27	4.103388		
113.72	4.092059	123.27	4.103387		
113.72	4.092056	125.18	4.105493		
113.72	4.092054	125.18	4.105459		
113.72	4.092053	125.18	4.105486		
113.72	4.092048	125.18	4.105485		
113.72	4.092050	125.18	4.105483		
113.72	4.092048	125.18	4.105479		

113.72	4.092046	125.18	4.105474
113.72	4.092044	125.18	4.105472
113.72	4.092041	125.18	4.105471
113.72	4.092044	125.18	4.105469
113.72	4.092042	125.18	4.105469
115.65	4.094444	127.08	4.107676
115.65	4.094432	127.08	4.107673
115.65	4.094428	127.08	4.107670
115.65	4.094425	127.08	4.107667
115.65	4.094422	127.08	4.107663
115.64	4.094424	127.08	4.107668
115.64	4.094421	127.08	4.107664
115.64	4.094409	127.08	4.107663
115.64	4.094405	127.08	4.107660
115.64	4.094407	127.08	4.107658
115.64	4.094408	127.08	4.107655
115.64	4.094408	127.08	4.107654
115.64	4.094409	128.98	4.109839
115.64	4.094410	128.98	4.109840
117.57	4.096680	128.98	4.109839
117.57	4.096680	128.98	4.109841
117.56	4.096674	128.98	4.109840
117.56	4.096668	128.98	4.109840
117.56	4.096662	128.98	4.109840
117.56	4.096662	128.98	4.109843
117.56	4.096656	128.98	4.109843
117.56	4.096650	128.98	4.109843
117.56	4.096648	130.88	4.112047
117.56	4.096643	130.88	4.112046
117.56	4.096638	130.88	4.112046
117.56	4.096638	130.88	4.112043
119.47	4.099044	130.88	4.112042
119.47	4.099043	130.88	4.112040
119.47	4.099037	130.87	4.112038

119.47	4.099033	130.87	4.112037
119.47	4.099029	130.87	4.112035
119.47	4.099028	130.87	4.112034
119.47	4.099027	130.87	4.112034
119.47	4.099019	130.87	4.112033
119.47	4.099018		
