

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EQUILÍBRIO DE FASES EM SISTEMAS AQUOSOS  
PEG/FOSFATO DE POTÁSSIO**

Parecer

*Este exemplar corresponde a cópia final  
da tese defendida por Luiza Helena Meller  
da Silva e aprovada pela Comissão Julga-  
dora em 06.12.94.*

**LUIZA HELENA MELLER DA SILVA 539  
QUÍMICA INDUSTRIAL**

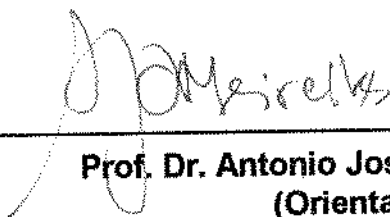
*A. Meirelles*

*Luiza*  
**Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ DE A. MEIRELLES 11  
ORIENTADOR**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**CAMPINAS-SP  
DEZEMBRO/94**

# BANCA EXAMINADORA



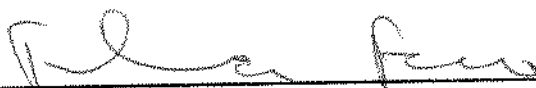
---

**Prof. Dr. Antonio José de A. Meirelles**  
(Orientador)



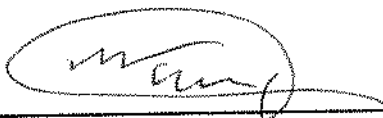
---

**Prof. Dr. Saul Gonçalves D'Avila**  
(membro)



---

**Profa. Dra. Telma Teixeira Franco**  
(membro)



---

**Prof. Dr. Satoshi Tobinaga**  
(Suplente)

Campinas, 01 de Dezembro de 1994.

**DEDICO**

**A meus pais TITA e EDA, meus irmãos  
DADO,ITI e ODA, a cunhada MONE  
e a "boneca"GABRIELA.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio José, "Tom Zé", pela orientação, paciência e dedicação dispensadas durante a realização deste trabalho.

Ao técnico Ariovaldo Astini, do LASEFI, pela assessoria na montagem do equipamento.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado.

A minha família aqui, Jorge Alberto, Maria Lúcia, Flávia, Marcelo, Frederico, Bernadete (Biló) e Tatiana pelo incentivo nas horas difíceis.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos pela colaboração e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho. Em especial a Maria, Ana, Isaura e Célia.

Aos colegas de turma da Pós-Graduação, pelos bons momentos durante este período.

Ao amigo Gasparetto pelo apoio oferecido durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Jorge Eduardo, Hosiberto, Eduardo e Sandro pelos momentos de descontração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

|                                                    |     |
|----------------------------------------------------|-----|
| RESUMO .....                                       | i   |
| SUMMARY .....                                      | iii |
| INTRODUÇÃO .....                                   | 1   |
| OBJETIVOS .....                                    | 3   |
| Capítulo 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....            | 4   |
| 1.1.Sistemas Aquosos Bifásicos.....                | 4   |
| 1.2.Sistemas Polietileno Glicol (PEG)/Dextrana.... | 8   |
| 1.2.1.Efeito do Peso Molecular do Polímero ...     | 8   |
| 1.2.2.Efeito da Temperatura .....                  | 9   |
| 1.2.3.Efeito do pH .....                           | 10  |
| 1.3.Sistemas Polietileno Glicol (PEG)/Sal .....    | 11  |
| 1.4.Características Gerais dos Reagentes .....     | 13  |
| 1.4.1.Polietileno Glicol.....                      | 13  |
| 1.4.1.1.Formas de análise .....                    | 14  |
| 1.4.1.2.Nomes Comerciais .....                     | 15  |
| 1.4.2.Albuminas.....                               | 15  |
| 1.4.3.Fosfato de Potássio Monobásico e             |     |
| Dibásico.....                                      | 15  |
| Capítulo.2.MATERIAIS E MÉTODOS .....               | 17  |
| 2.1.Materiais .....                                | 17  |
| 2.1.1.Reagentes.....                               | 17  |
| 2.1.2.Proteína.....                                | 17  |
| 2.1.3.Equipamentos.....                            | 18  |
| 2.1.4.Célula de Equilíbrio Líquido-líquido...      | 18  |
| 2.2.Métodos .....                                  | 19  |
| 2.3.Análises .....                                 | 23  |
| 2.3.1.Concentração de sal.....                     | 23  |
| 2.3.2.Escolha do segundo Componente.....           | 27  |
| 2.3.3.Concentração de Água.....                    | 30  |
| 2.3.4.Concentração de Proteína.....                | 31  |
| 2.3.5.Determinação do erro experimental.....       | 32  |
| 2.3.5.1.Balanço de massa .....                     | 33  |

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Capítulo 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                         | 36 |
| 3.1.Diagrama de Equilíbrio.....                                 | 36 |
| 3.2.Comparação dos dados experimentais com<br>a literatura..... | 39 |
| 3.3.Apresentação e Análise de dados .....                       | 41 |
| 3.3.1.Influência do pH.....                                     | 41 |
| 3.3.2.Influência da temperatura.....                            | 49 |
| 3.3.3.Influência do peso molecular do polímero<br>.....         | 55 |
| 3.3.4.Correlação empírica para as linhas de<br>amarração .....  | 56 |
| 3.3.5.Coefficiente de partição .....                            | 60 |
| 3.5.1.Influência do pH .....                                    | 60 |
| 3.5.2.Influência da temperatura .....                           | 61 |
| Capítulo 4 CONCLUSÕES .....                                     | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                | 69 |
| APÊNDICE 1. ....                                                | 73 |
| APÊNDICE 2 .....                                                | 81 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA.1.Esquema da Célula de Equilíbrio Líquido-líquido...                                                                      | 20 |
| FIGURA 2.Curva de titulação (pH X Vol.KOH) obtida para a fase inferior do sistema PEG 1000/fosfato de potássio, T=40, pH=9 ..... | 25 |
| FIGURA.3.Derivada primeira ( $\delta pH/\delta Vol$ ) do sistema PEG 1000/fosfato de potássio, T = 40, pH = 9 .....              | 26 |
| FIGURA.4.Gráfico comparativo do erro experimental/literatura .....                                                               | 35 |
| FIGURA 5a.Diagrama de equilíbrio sistema PPG 425/cloreto de sódio/água à 25°C em coordenadas triangulares .....                  | 37 |
| FIGURA 5b.Diagrama de equilíbrio sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 25°C , pH 7 em cordenadas cartesianas .....              | 37 |
| FIGURA 6.Gráfico comparativo do sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 25°C, pH 8 .....                                     | 40 |
| FIGURA 7.Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 4°C , pH 9 .....                                       | 43 |
| FIGURA 8.Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 25°C , pH 7 .....                                      | 44 |
| FIGURA 9.Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 40°C , pH 6 .....                                      | 45 |
| FIGURA 10.Influência do pH no comportamento da linha binodal .....                                                               | 46 |

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA.11.</b> Influência do pH no sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 4°C .....                                          | 47 |
| <b>FIGURA 12.</b> Influência do pH no sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 25°C .....                                         | 48 |
| <b>FIGURA.13.</b> Influência do pH no sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 40°C .....                                         | 48 |
| <b>FIGURA 14.</b> Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfato de potássio à 4°C , pH 9 .....                             | 50 |
| <b>FIGURA 15.</b> Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfato de potássio à 25°C , pH 9 .....                            | 50 |
| <b>FIGURA 16.</b> Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfato de potássio à 40°C , pH 7 .....                            | 51 |
| <b>FIGURA 17.</b> Influência da temperatura no comportamento da linha binodal .....                                             | 52 |
| <b>FIGURA 18.</b> Influência da temperatura no sistema PEG 1000/fosfato de potássio a pH 7 .....                                | 53 |
| <b>FIGURA 19.</b> Influência da temperatura no sistema PEG 1000/fosfato de potássio a pH 9 .....                                | 54 |
| <b>FIGURA 20.</b> Influência do peso molecular do polímero na curva binodal .....                                               | 55 |
| <b>FIGURA 21.</b> Teste do método de Othmer e Tobias para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio a pH 7, temperatura 25°C ..... | 57 |
| <b>FIGURA 22.</b> Teste do método de Bachman para para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio a pH 7, temperatura 25°C .....    | 58 |

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 23.</b> Teste do método de Hand para para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio a pH 7, temperatura 25°C..... | 58 |
| <b>FIGURA 24.</b> Influência do pH no coeficiente de partição da proteína.....                                           | 63 |
| <b>FIGURA 25.</b> Influência do coeficiente de partição da proteína com o comprimento da "tie line".....                 | 64 |
| <b>FIGURA 26.</b> Influência da temperatura no coeficiente de partição da proteína.....                                  | 65 |
| <b>FIGURA 27.</b> Influência do coeficiente de partição da proteína com o comprimento da "tie line".....                 | 66 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1.Sistemas utilizados experimentalmente .....                                                                    | 21 |
| TABELA 2.Proporções de $M_1/M_2$ utilizadas nos experimentos ...                                                        | 23 |
| TABELA 3.Comparação de dados do sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 25°C , pH 8 .....                           | 39 |
| TABELA 4.Composição das fases do sistema PEG 8000/ fosfato de potássio/água à 4°C, pH 9 .....                           | 43 |
| TABELA 5.Composição das fases para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 25°C, pH 7 .....                       | 44 |
| TABELA 6.Composição das fases do sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 40°C , pH 6 .....                          | 45 |
| TABELA 7.Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 4°C , pH 9 .....                           | 49 |
| TABELA 8. Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 25°C , pH 9 .....                         | 49 |
| TABELA 9.Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 40°C , pH 7 .....                          | 51 |
| TABELA 10.Constantes obtidas pelo método de HAND para os sistemas PEG/sal .....                                         | 59 |
| TABELA 11 Coeficiente de partição obtido experimentalmente para proteína albumina (BSA) no sistema PEG 8000/fosfato ... | 61 |

## RESUMO

Tendo em vista a falta de dados experimentais na literatura, para sistemas aquosos bifásicos compostos por um polímero e um sal e, com o intuito de fornecer um suporte maior ao estudo da partição de biomoléculas nestes sistemas, apresentamos neste trabalho dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol 8000/fosfato de potássio/água e polietileno glicol 1000/fosfato de potássio/água a diferentes valores de temperatura e pH. Os métodos analíticos utilizados foram: titulação potenciométrica para a determinação da concentração do sal e umidade em estufa a vácuo a 60°C por 24h para a determinação da concentração da água; a concentração do polímero obtida por diferença. O pH, variado em função da equação de Henderson Hasselbach e a temperatura mantida no interior da célula por um banho termostático garantindo uma variação não superior a 0,1°C. Os resultados obtidos permitem observar que um aumento na região de separação é causado com a elevação da temperatura e do pH, obtendo-se deste modo uma maior diferença na concentração do polímero entre as duas fases. Deve-se destacar que o coeficiente de partição de biomoléculas é significativamente dependente desta diferença de concentração (comprimento da "tie line").

Verificou-se que a temperatura influencia o equilíbrio de fases de duas formas, mudando a inclinação das linhas de amarração e deslocando a linha binodal, aumentando ou diminuindo a região de separação. Se a temperatura é aumentada, aumenta também a região de separação e as linhas de amarração tendem a ter um grau de inclinação maior se diminuída o efeito é inverso. No caso de partição de proteínas a temperatura é de fundamental importância, pois seu manuseio (variação) pode causar desde mudanças de estrutura à desnaturação. Além disso, verificou-se também que o efeito da temperatura é maior na região entre 4°C e 25°C, do que de 25°C para 40°C, apesar do gradiente ser praticamente o mesmo.

Com respeito ao pH, observa-se que a medida que ele aumenta, aumenta também a região de separação e varia a inclinação das linhas de amarração, como a temperatura. Porém o efeito de inclinação nas linhas de amarração é maior. Nos experimentos, observou-se que em temperaturas menores a separação se torna mais difícil e se o pH for diminuído causa a formação de três fases. Pouco se conhece na literatura sobre o comportamento desta variável.

## SUMMARY

This work presents experimental equilibrium data for two-phase polymer-salt aqueous systems. This is an important contribution to the study of partition of biomolecules. It is important to remind the lack of such data in the literature. The systems studied covers polyethylene glycol 8000 and 1000 plus potassium phosphate in water at a range of temperature and pH. Methods of analysis were: potentiometric titration for salt concentration and water content in a vacuum oven at 60° during 24 hours. Equation of Henderson-Haselbach was used for pH while temperature was maintained within  $\pm 0,1$  °C. Results indicate an increase in the separation region caused by elevation of temperature and pH thus giving an higher difference in polymer concentration between phases. It must be emphasized that biomolecules partition coefficient is highly dependent on this concentration difference (tie line lenght). It was demonstrated that temperature affects phase equilibrium by changing the gradient of tie lines and moving the binodal curve thus affecting the separation region. the elevation of temperature increases the separation region and tie lines tend to higher gradients; the opposite is also verified. For proteins separation temperature is of paramount importance due to structure changes and denaturation. it was seen that temperature importance is higher in the 4°C - 25°C region as compared to 25°C - 40°C. Increasing the pH it was observed an increase both in the separation region and gradient of tie lines but little is known or reported in the literature about this topic. It was observed that at lower values of both temperature and pH a third phase (a solid one) was produced.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o crescente desenvolvimento da área biotecnológica, tornou-se necessário o conhecimento de novas técnicas de separação e purificação de compostos obtidos em baixas concentrações nestes processos.

Devido a grande sensibilidade e fragilidade destes compostos, torna-se necessário a escolha de um método que não os agrida, mantendo suas propriedades físicas e químicas intactas

Dos vários métodos existentes na literatura, a extração líquido-líquido vem ganhando destaque por atender aquelas exigências básicas e sua aplicação industrial ser viável. Os sistemas de duas fases aquosas, podem ser obtidos com os sistemas de extração constituídos por duas fases imiscíveis, formadas pela adição em meio aquoso de dois polímeros (como polietileno glicol/dextrana), ou de um destes com um sal (como polietileno glicol/fosfato de potássio). Além de utilizar os conhecimentos e equipamentos da extração líquido-líquido tradicional, estes sistemas são compostos em grande parte por água, propiciando assim um ambiente favorável às proteínas. Outra vantagem, é que os sistemas aquosos bifásicos são compatíveis com praticamente todas as proteínas conhecidas, sendo assim uma alternativa bastante atrativa para os processos já citados.

Apesar da importância atribuída às técnicas extrativas nestes sistemas, não existem trabalhos suficientes para a predição do coeficiente de partição de proteínas,  $K_p$ , que é definido como a razão entre a concentração do soluto na fase superior sobre a concentração do soluto na fase inferior. Ele depende de vários fatores, entre os quais pH e temperatura do sistema, tipo e concentração do sal e polímero utilizados.

Para um melhor conhecimento da influência destas variáveis sobre o coeficiente de partição de proteínas, é necessário um estudo preliminar do equilíbrio de fases nestes sistemas.

Apresentaremos aqui um estudo sistemático sobre o equilíbrio em sistemas aquosos polietileno glicol 1000/fosfato de potássio e polietileno glicol 8000/fosfato de potássio a diferentes valores de pH e temperatura, e a influência destas variáveis no coeficiente de partição da proteína Albumina.

## OBJETIVOS

Este trabalho, tem como objetivo fornecer um maior número de dados de equilíbrio para sistemas polímero/sal, e relacionar a influência de algumas variáveis no comportamento de partição de proteínas e no equilíbrio de fases destes sistemas. Estes objetivos foram realizados em duas etapas :

1.Determinação de dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol 1000/fosfato de potássio/água e polietileno glicol 8000/fosfato de potássio/água a diferentes valores de pH e temperatura.

2.Determinação da influência da temperatura, pH e peso molecular do polímero no equilíbrio de fases e no coeficiente de partição,  $K_p$ , da proteína albumina BSA.

# CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. Sistemas Aquosos Bifásicos

Sistemas aquosos com duas fases formam-se espontaneamente quando uma solução de dois compostos hidrófilos são misturados e uma certa concentração dos mesmos é excedida (KULA, 1990).

O fenômeno de separação de fases em sistemas aquosos, foi observado pela primeira vez em 1896 pelo microbiologista holandês Beijerinck (DIAMOND et alii, 1989). A partir daí uma variedade destes fenômenos tem sido observada quando um ou mais polímeros são dissolvidos em água, na presença ou ausência de um soluto com baixo peso molecular.

ALBERTSSON (1960), anos mais tarde, descreveu sistemas aquosos e investigou suas propriedades. Neste sentido muitos trabalhos de diagramas de fases foram determinados experimentalmente para estes sistemas.

Por se constituírem em grande parte por água, estes sistemas formam um ambiente favorável a células, organelas celulares e proteínas biologicamente ativas. A distribuição de tais partículas e componentes entre as duas fases dos mesmos, pode então ser explorada com objetivos de purificação e separação.

Somente dois dos muitos tipos de sistemas de fases formados são geralmente aplicados na distribuição de materiais biológicos: os compostos por dois polímeros e os compostos por um polímero e um sal.

Na separação de proteínas, a pressão osmótica do sistema não precisa ser considerada. Neste caso, os sistemas compostos por um polímero e um sal são mais adequados, já que

apresentam maior seletividade e menor custo em relação aos formados por dois polímeros (KULA, 1990).

Muitos autores, que no início da década de 70 utilizavam e estudavam métodos de separação e purificação de enzimas intracelulares, diziam ser a ampliação de escala ("scale up") o maior problema. HUSTEDT et alii (1978), ao utilizarem sistemas aquosos bifásicos para este fim, não encontraram dificuldades no "scale up", obtendo ainda bons resultados.

A extração nestes sistemas oferece vantagens sem igual para processos em grande escala, como alto rendimento de extração, forte aproximação do equilíbrio, fácil "scale up" e emprego em processos contínuos. Além disso, permite o uso de equipamentos desenvolvidos para a extração líquido-líquido tradicional.

A base para a separação de substâncias com o emprego de sistemas de duas fases aquosas está na distribuição seletiva dos mesmos entre as fases formadas. O dado relevante neste caso é o coeficiente de distribuição da substância de interesse, definido por:

$$K = \frac{C_S}{C_I} \quad (1)$$

onde  $C_S$  e  $C_I$  são as concentrações da substância em mol/l nas fases superior e inferior respectivamente (BASKIR et alii, 1988).

O coeficiente de distribuição da substância de interesse é dependente principalmente do sistema de fases escolhido (do seu diagrama de equilíbrio), da concentração da

substância, da temperatura e do pH, sendo a seleção do sistema de fases o passo chave do trabalho de partição. Também depende fortemente das propriedades de superfície da substância a ser particionada (carga elétrica, hidrofobicidade, peso molecular, sítio ativo).

Num sistema bifásico em equilíbrio, o potencial químico ( $\mu$ ) de cada componente é igual nas duas fases. O problema de modelagem destes sistemas é justamente relacionar o potencial químico com o conjunto de fatores que interferem no equilíbrio. Apesar do progresso significativo que tem sido feito modelando termodinamicamente a distribuição de proteínas nestes sistemas, ainda faltam estudos fundamentais da partição da biomolécula entre as duas fases. E, em alguns casos, falta uma modelagem mais apropriada mesmo para os dados de equilíbrio do próprio sistema empregado.

Sistemas aquosos bifásicos diferem do tradicional sistema de extração líquido-líquido porque ambas as fases contém uma alta porcentagem de água (70 - 95%) (KING et alii, 1988). Em concentrações tão altas de água, todos os sais e grupos ionizáveis presentes nas proteínas são dissociados em função do pH, dificultando ainda mais a modelagem.

Para facilitar o uso de tais sistemas e fornecer uma base para a predição quando os dados não são disponíveis, uma metodologia é necessária para a correlação da partição da biomolécula em função da composição das duas fases (DIAMOND et alii, 1989).

Várias teorias tem sido propostas para propriedades termodinâmicas e correlações de dados de equilíbrio. No entanto, muitas destas teorias só se aplicam para sistemas simples, não polares, com interações não específicas, tais como pontes de hidrogênio (KING et alii, 1988).

BAMBERGER et alii (1984) estudaram a partição dos sais fosfato e cloreto de sódio em sistemas Polietileno Glicol/Dextrana e verificaram que ânions polivalentes distribuem-se preferencialmente na fase rica em dextrana, provocando uma diferença de potencial eletrostático significativa entre as fases. Observaram também, que isso deslocava o ponto crítico ("plat point") do sistema.

Com base nestas informações BASKIR et alii (1988) estudaram a partição de proteínas nestes sistemas e observaram que vários aspectos afetam a partição ( tamanho da proteína, peso molecular dos polímeros, concentração do sal utilizado, etc.), e empregando alguns modelos, correlacionaram estas variáveis com a partição. Concluíram que ainda faltam dados e conhecimentos mais específicos para a modelagem.

KING et alii (1988) testaram vários modelos termodinâmicos para a separação de biomoléculas em sistemas polietileno glicol/dextrana. Concluíram que para desenvolver mecanismos e teorias de partição em sistemas aquosos bifásicos é essencial estabelecer conjuntos de dados sobre interações proteína-proteína, polímero-polímero, e sobre a influência do pH e de diferentes soluções de sais, obtiveram com isso, bons resultados com a modelagem de sistemas PEG/dextrana. Tais dados para sistemas polímero/sal são ainda muito escassos.

DIAMOND et alii (1989) no estudo da partição em sistemas polietileno glicol/dextrana, propuseram um modelo simples para correlacionar a partição da biomolécula, com base na Teoria de Flory Huggins, mas a correlação obtida só se aplica a solutos e proteínas de baixo peso molecular.

Estes resultados apresentados na literatura indicam já um razoável progresso na modelagem de sistemas aquosos compostos por dois polímeros, que contenham baixa concentração de ions. Um exemplo disto é a modelagem de sistemas PEG/dextrana baseada na equação de estado UNIQUAC (KING et

alii, 1988). O mesmo não pode ser dito com relação aos sistemas polímero/sal.

Em função disto, o estágio atual de pesquisa com sistemas polímero/sal se concentra ainda na obtenção de dados de equilíbrio e na quantificação da influência das principais variáveis no mesmo.

## **1.2.Sistemas Polietileno Glicol (PEG)/Dextrana**

Entre a variedade de sistemas aquosos bifásicos existentes, o sistema PEG/dextrana é o mais estudado para a partição de proteínas, em contraste com os sistemas PEG/sal (FRANCO, 1992). Em consequência disso, tomaremos como base as informações para os sistemas PEG/dextrana, utilizando-as como parâmetros de comparação para os resultados obtidos em nosso sistema.

O estudo do coeficiente de partição de proteínas nestes sistemas, depende de conhecimentos fundamentais e do efeito de algumas variáveis (temperatura, pH, peso molecular do polímero, etc.) no equilíbrio.

### **1.2.1.Efeito do Peso Molecular do Polímero**

Segundo ALBERTSSON (1960) para sistemas PEG/dextrana, quanto maior o peso molecular dos polímeros utilizados menor é a concentração necessária para que ocorra a separação de fases e quanto maior a diferença de tamanho entre eles, mais assimétrica é a curva binodal.

O peso molecular do polímero afeta diretamente a partição do biomaterial, alterando o diagrama de fases e mudando o número de interações polímero-proteína.

Em geral, se o peso molecular de um dos polímeros for aumentado, a concentração da biomolécula será maior na fase oposta, ou seja, a proteína é fortemente atraída por polímeros menores e repelida por polímeros maiores. Esse comportamento só se observa se todos os outros fatores, como pH, temperatura, concentração dos polímeros e composição dos sais forem mantidos constantes (BASKIR *et alii* 1988).

A magnitude deste efeito decresce com o aumento do comprimento da cadeia do polímero e depende da proteína utilizada. Para algumas proteínas o coeficiente de partição definido como a razão de concentração da proteína na fase superior (rica em PEG) e inferior (rica em dextrana) respectivamente, aumenta com o aumento do peso molecular de dextrana, sob condições constantes (para proteínas com baixo peso molecular este efeito é pequeno, não muito significativo). Já para polietileno glicol, o coeficiente de partição diminui com o aumento de seu peso molecular (FRANCO, 1992). Em sistemas PEG/dextrana, este efeito é mais pronunciado devido a diferença de potencial eletrostático entre as fases, causada pela adição de sais, que se distribuem preferencialmente na fase rica em dextrana (BAMBERGER *et alii* 1984).

### **1.2.2.Efeito da Temperatura**

Em sistemas PEG/dextrana há formação de fases mesmo a baixas concentrações e baixas temperaturas. A sensibilidade do sistema à temperatura é mais pronunciada nas concentrações próximas ao ponto crítico ("plat point") da binodal (ALBERTSSON, 1960). Chamamos de ponto crítico o ponto que divide a região monofásica da bifásica, onde, uma pequena mudança de composição pode deslocar o sistema para um dos dois lados.

Na partição da biomolécula o efeito da temperatura geralmente é indireto e se manifesta através de mudanças na forma da curva binodal (diagrama de fases), de alterações na estrutura da proteína ou através de sua desnaturação, fatores que interferem na partição da mesma (BASKIR et alii 1988). Quando o coeficiente de partição da proteína é menor que 1, ele aumenta com o aumento da temperatura.

O efeito da temperatura nestes sistemas é mais pronunciado do que efeito do peso molecular do polímero. O aumento da temperatura acarreta mudanças na linha binodal com redução do comprimento das "tie-lines", que são obtidas pela diferença de concentração de PEG, na fase rica em PEG, somadas a diferença de concentração de sal, na fase rica em sal. Este efeito desloca a região de separação para valores iniciais de concentração menores, aumentando esta região (FORCINITI et alii 1991).

### 1.2.3. Efeito do pH

O estudo do pH é de fundamental importância para o conhecimento do comportamento de partição, pois sua variação acarreta mudanças complexas e ainda desconhecidas na estrutura e na carga da proteína. Apesar disso, existem poucos trabalhos neste aspecto.

FORCINITI et alii (1992) estudaram a influência simultânea do pH e do peso molecular do polímero na partição das proteínas lizozima, quimotripsinogênio A, albumina e catalase. Observaram que:

-Para a lizozima o coeficiente de partição é mais afetado pelas mudanças de pH em altas concentrações dos polímeros. Seu valor é mais sensível ao pH em pesos moleculares maiores, tanto para PEG como dextrana.

-Para chimotripsinogem A o coeficiente de partição é mais afetado pelas mudanças de pH em altas concentrações de polímeros e mais sensível ao pH somente em altos pesos moleculares de PEG.

-Para a albumina o coeficiente de partição é mais afetado pelas mudanças de pH em baixas concentrações de polímeros. Ela é mais sensível ao pH em baixos pesos moleculares de PEG e para todos os pesos moleculares de dextrana.

-Para a catalase o coeficiente de partição é mais afetado pelas mudanças de pH em baixas concentrações de polímeros e mais sensível ao pH em baixos pesos moleculares de PEG.

Os autores observaram que a influência do pH no coeficiente de partição das proteínas, varia significativamente de proteína para proteína e depende de outros fatores como forma estrutural, ponto isoelétrico, etc, não permitindo ainda conclusões generalizadoras.

### **1.3 Sistemas Polietileno Glicol (PEG)/sal**

Mesmo tendo sido descobertos há várias décadas, poucos estudos fundamentais existem para sistemas polietileno glicol/sal.

Recentemente, devido a suas vantagens em comparação aos sistemas PEG/dextrana, sua aplicação em grande escala para processos de separação vem crescendo. Além do menor custo e maior seletividade, a separação nestes sistemas ocorre mais rapidamente devido a grande diferença de densidade e de viscosidade entre as fases, agilizando o processo em extratores contínuos.

Os sistemas PEG/sal são formados por sais inorgânicos como: sulfato de magnésio, sulfato de sódio,

carbonato de sódio, sulfato de amônia e fosfato de potássio, entre outros.

GREVE *et alii* (1990) estudaram uma forma de reciclar estes sais no processo de separação de proteínas extracelulares, e observaram que este processo é técnica e economicamente viável em equipamentos contínuos. A reciclagem destes sais é importante não só economicamente, como também em função de sua carga poluidora.

LEE *et alii* (1990) estudaram o comportamento do equilíbrio em sistemas aquosos bifásicos PEG/fosfato de potássio a 4°C e pH 7 para vários pesos moleculares do polímero, e a influência do pH no sistema PEG 3400/fosfato de potássio. Concluíram que com o aumento do peso molecular do polímero, a curva binodal se desloca para concentrações menores de PEG e fosfato de potássio. Quanto ao pH, observaram que o mesmo acontece à medida que o pH aumenta.

VERNAU *et alii* (1990) estudaram a extração de proteínas em sistemas PEG/citrato, que causam menos problemas ao ambiente, pois o citrato é biodegradável e menos tóxico. O fator de purificação( grau de pureza do componente obtido ao fim do processo de separação)para proteínas nestes sistemas, foi menor do que os observados para os sistemas PEG/fosfato de potássio.

CHEN (1991) estudou a partição e a separação de  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina em sistemas PEG/fosfato de potássio, determinaram a influência das variáveis temperatura, concentração de sal, concentração de polímero, peso molecular do polímero e pH sobre o comprimento das linhas de amarração ("tie line") e o coeficiente de partição das proteínas. A separação destas proteínas,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina em sistemas PEG/fosfato de potássio, também foi estudada utilizando extratores do tipo Graesser em processo contínuo, por COIMBRA *et alii* (1992), com bons resultados.

WANG *et alii* (1991), estudaram a extração de desidrogenases em sistemas aquosos bifásicos utilizando substâncias coloridas como ligantes, para facilitar a determinação do coeficiente de partição das proteínas.

CHELUGET *et alii* (1994) estudaram o equilíbrio líquido-líquido em misturas aquosas de polipropileno glicol/cloreto de sódio e determinaram as regiões de separação do sistema (monofásica, bifásica e sólido-líquida).

Os dados de equilíbrio e de coeficiente de partição de proteínas em sistemas PEG/sal ainda são insuficientes e, em particular, a influência simultânea do pH e temperatura ainda não foi estudada com a devida extensão.

## **1.4.Características Gerais dos Reagentes**

Sistema escolhido: Polietileno Glicol/Fosfato de Potássio

Proteína escolhida: Albumina de soro bovino (BSA)

### **1.4.1.Polietileno Glicol**

Polietileno glicol,  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{H}$ , é um material de grande importância comercial e como tal, é produzido mundialmente em grande quantidade e em vários pesos moleculares. Arbitrariamente, a designação PEG é usada para materiais com baixos pesos moleculares (abaixo de 20000), facilmente determinado pelos grupos hidroxilas, enquanto a designação PEO, óxido de polietileno, é frequentemente restrita para materiais com altos pesos moleculares (maior que 100000) que não evidenciam a funcionalidade da hidroxila. Ambos grupos de peso molecular podem ser chamados de

polioxietilenos. Os materiais com alto e baixo pesos moleculares se distinguem pelo método de preparo ; PEG é feito da polimerização de óxido de etileno com um catalisador ácido ou básico, enquanto PEO emprega catalisadores heterogêneos. É difícil preparar PEG com peso molecular acima de 10000 pela fácil desidratação do terminal hidroxietileno, produzindo um alqueno na polimerização.

Os polietileno glicóis com peso molecular acima de 10000, são frequentemente obtidos pela ligação de cadeias de baixo peso molecular. Este processo de ligação pode introduzir uma ramificação ou um sítio hidrofóbico numa molécula, que pode afetar certamente suas propriedades moleculares. Polietileno glicóis são altamente higroscópicos e absorvem uma quantidade significativa de água se expostos a altas umidades.

O comportamento de solubilidade do PEG é interessante: é solúvel em água, benzeno, dicloro metano e tetracadofurano; com um pequeno aquecimento, é solúvel em metanol, acetona, etanol e tolueno; é insolúvel em hexano e éter etílico.

Os polietileno glicóis são moléculas relativamente estáveis e atóxicas. São muito utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. São bastante estáveis na forma de solução, pó seco ou flocos, como geralmente são vendidos (em baixos pesos moleculares tem a forma líquida ou de pasta) (WALTER et alii, 1985).

#### **1.4.1.1. Formas de Análise**

As formas de análise de PEG vão desde a simples determinação do ponto de fusão a complexa espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NRM). Mais recentemente vem crescendo o uso de técnicas como índice de refração e cromatografia líquida (HPLC).

#### **1.4.1.2.Nomes Comerciais**

Dependendo do fabricante polietileno glicol pode ser conhecido como: Poliglicol E, Carbowax e Pluracol E.

#### **1.4.2.Albumina de Soro Bovino**

De acordo com sua estrutura e composição química, albuminas são proteínas solúveis em água e soluções salinas diluídas. Desnaturam e precipitam facilmente com o calor.

O fenômeno de solubilidade de uma proteína deve ser vizualizado como a capacidade de um número substancial de grupos polares localizados na superfície da mesma, se solvatar na água através de pontes de hidrogênio.

Mudanças de pH no meio, desde que não sejam extremas ( $\pm 1$  ou 1,5 unidades) em torno do pH natural, causam desnaturação reversível nas estruturas terciárias da maioria das proteínas (FARFAN, 1990).

A albumina quando em pH entre 5 e 8 tem sua forma nativa (N), em pH 8 há uma transição da forma N para a forma B, que corresponde a um leve decréscimo em sua hélice. Acima de pH 9 e a baixas temperaturas, possui forma A (proteína desnaturada). Em pHs ácidos ela agrega, forma E; 4 a 4,5 (abre parcialmente), abaixo de 4 (forma colóide). O coeficiente de partição da albumina (IP = 4,6) tem um valor mínimo a pH 5,6 (FORCINITI *et alii*, 1991).

#### **1.4.3.Fosfato de Potássio Monobásico e Dibásico**

Fosfatos são sais inorgânicos, amplamente conhecidos. São utilizados em sistemas polímero/sal por

organizarem a estrutura da água e, portanto formarem duas fases na presença do polímero (PEG). Além do menor custo em relação à dextrana e maior facilidade de utilização industrial.

O fosfato de potássio monobásico ou também chamado de fosfato diácido de potássio, tem peso molecular 136,09 e sua fórmula molecular é  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (anidro). Em solução a 5% e temperatura de 25°C seu pH fica entre 4,1-4,5.

O fosfato de potássio dibásico anidro, tem peso molecular 174,18 e sua fórmula molecular é  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Em solução a 5% e temperatura de 25°C seu pH fica entre 8,5-9,6.

## **CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo falaremos sobre os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento experimental de nosso trabalho, realizado no Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) deste departamento.

### **2.1.Materiais**

#### **2.1.1.Reagentes**

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Polietileno Glicol (PEG) 1000    | Sigma |
| Polietileno Glicol (PEG) 8000    | Sigma |
| Fosfato de Potássio mono-básico  | Merck |
| Fosfato de Potássio di-básico    | Merck |
| Hidróxido de Potássio P.A.       | Merck |
| Ácido clorídrico fumegante (37%) | Merck |

#### **2.1.2.Proteína**

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Albumina bovina (BSA) | Sigma |
|-----------------------|-------|

### 2.1.3.Equipamentos

| NOME                                 | MODELO          | MARCA         |
|--------------------------------------|-----------------|---------------|
| Agitador magnético                   | AMA 18          | PEMEM         |
| Agitador magnético                   | 221-1           | QUIMIS        |
| Balança analítica eletrônica         | A200S           | SARTORIUS     |
| Banho termostático analógico         | TE084           | TECNAL        |
| Bomba à vácuo                        | 1399            | WELCH         |
| Célula de equilíbrio líquido-líquido | -               | SUPRILAB      |
| Espectrofotômetro UV visível         | -----           | VARIAN        |
| Estufa à vácuo                       | EIV             | EDG           |
| Estufa de secagem e esterilização    | 320SE           | FANEM         |
| HPLC ( 5 módulos)                    |                 |               |
| Auto sampler                         | 9095            | VARIAN        |
| Bomba dosadora                       | 9010            | VARIAN        |
| Detector índice de refração          | RI4             | VARIAN        |
| Forno para aquecimento de colunas    | SPH99           | SPARK-HOLLAND |
| Integrador                           | 4400            | VARIAN        |
| Coluna                               | PW(300 X 7,5mm) | TSK G1000     |
| Potenciômetro                        | pH300           | ANALYSER      |
| Termômetro padrão (precisão 0,1°C)   | -30/+50°C       | INCOTERM      |
| Ultrassom                            | -----           | VARIAN        |

A seguir, faremos um breve comentário sobre a célula de equilíbrio líquido-líquido, por ser ela nosso equipamento chave no trabalho experimental.

### 2.1.4.Célula de Equilíbrio Líquido-líquido

A célula de equilíbrio líquido-líquido foi baseada inicialmente no modelo de BUENO (1990) e STRANGEVITCH (1992), mas algumas modificações foram necessárias devido à natureza dos componentes dos sistemas aquosos bifásicos.

Ela é feita de vidro pyrex para permitir a visualização da separação de fases, seu volume interno é de 60 ml e dispõe de uma entrada superior onde são alimentados os componentes que formam o sistema. É encamisada, com saída e entrada para conexão do banho termostático. Vedada com rolha de teflon esmerilhada, com abertura para encaixe do termômetro. A célula foi fabricada pela firma Suprilab. A figura 1 mostra um esquema da célula de equilíbrio

## 2.2.Métodos

Com base nos dados de SNYDER *et alii* (1992), para o sistema polietileno glicol/fosfato de potássio a 25°C e pH 8, foram preparados sistemas para testes preliminares. Observou-se que mesmo utilizando uma metodologia de análise diferente para a determinação das concentrações das fases, obteve-se um bom resultado, com uma boa reprodutibilidade destes dados apresentados na literatura.

A partir disto, adotou-se as concentrações mássicas globais dos sistemas apresentados pelos autores como referência para nossos experimentos. Com base nestes dados foi possível estimar o volume das fases, com o objetivo de garantir que a interface ficasse aproximadamente na metade da célula, facilitando a retirada das amostras, sem perturbações apreciáveis às fases em equilíbrio.

Quando já se conhece algumas linhas de amarração, mesmo em condições diferentes das de interesse, torna-se mais fácil estimar o volume de cada fase a partir destas composições de equilíbrio.

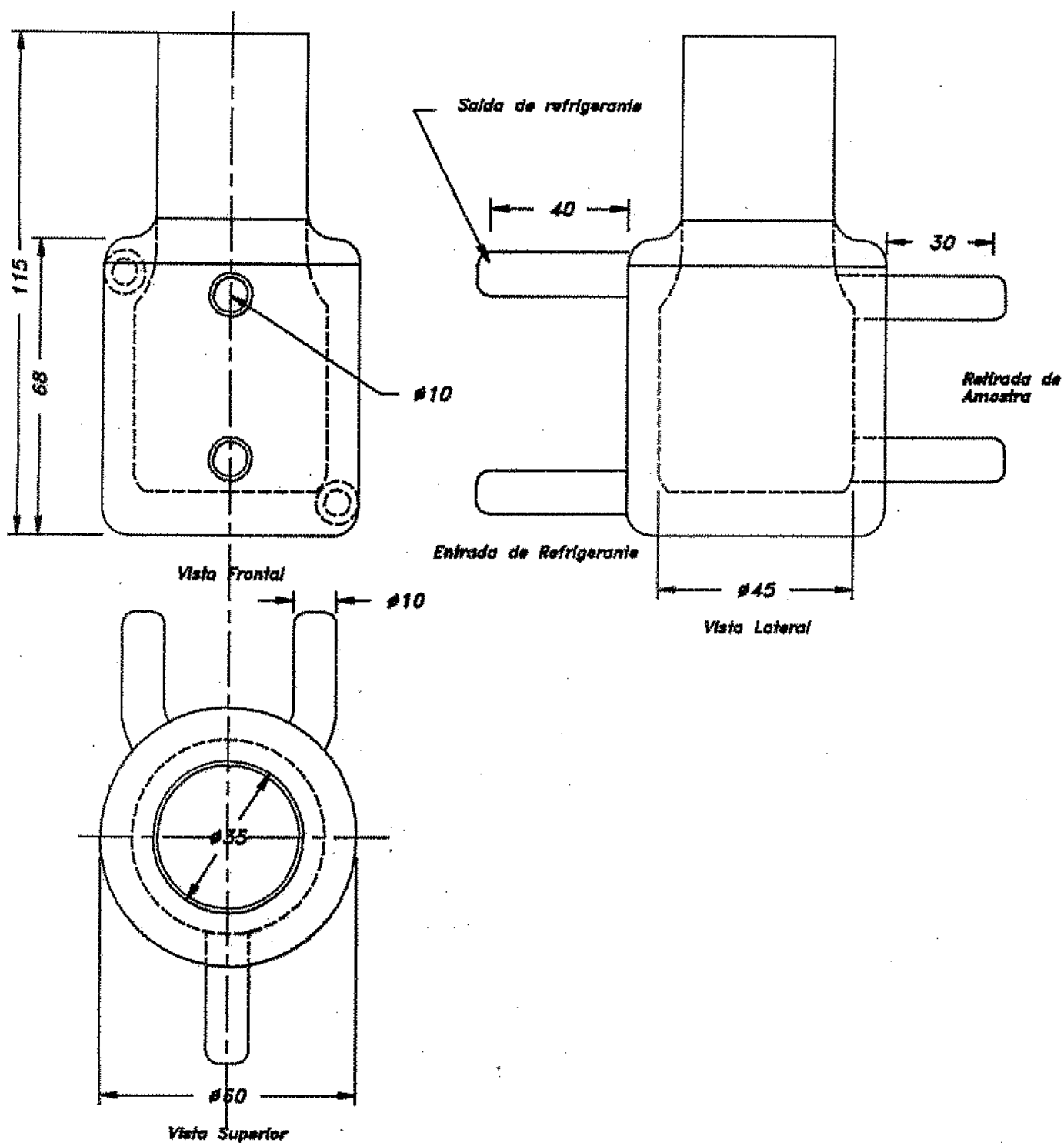


FIGURA.1. Esquema da Célula de Equilíbrio Líquido-líquido

Quantidades pré-calculadas da cada componente (por exemplo: polietileno glicol 8000, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, água) foram pesadas (massa/massa) em balança analítica e introduzidas no interior da célula que já estava conectada ao banho termostático. Várias combinações de polietileno glicol, pH e temperatura foram utilizados nos experimentos, e estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 - Sistemas utilizados experimentalmente

| SISTEMA* | pH | TEMPERATURA(°C) |
|----------|----|-----------------|
| P8FA     | 7  | 4               |
| P8FA     | 9  | 4               |
| P8FA     | 6  | 25              |
| P8FA     | 7  | 25              |
| P8FA     | 9  | 25              |
| P8FA     | 6  | 40              |
| P8FA     | 7  | 40              |
| P8FA     | 9  | 40              |
| P1FA     | 7  | 4               |
| P1FA     | 9  | 4               |
| P1FA     | 7  | 25              |
| P1FA     | 9  | 25              |
| P1FA     | 7  | 40              |
| P1FA     | 9  | 40              |

\*P8FA - Polietileno Glicol 8000/fosfato de potássio/água

\*P1FA - Polietileno Glicol 1000/fosfato de potássio/água

Fez-se a agitação da mistura com agitador magnético por 15 min ou até completa solubilização. O tempo necessário para alcance do equilíbrio, foi estimado com base em

experimentos preliminares de equilíbrio. Adotou-se um tempo inicial mínimo de 2 horas de repouso.

A separação de fases ocorre em dois estágios: o primeiro (rápido) acontece logo após o término da agitação; o segundo (lento) ocorre quando gotas residuais de uma fase, ainda dispersas na outra fase, coalescem. O sistema é dito em equilíbrio quando as duas fases formadas estão límpidas e transparentes com uma interface bem definida, isto é, quando suas concentrações não variam mais, a uma temperatura constante do sistema.

Dos testes preliminares concluiu-se que em 4 horas o equilíbrio era alcançado. O tempo foi contado a partir da hora em que a temperatura no interior da célula fosse a desejada e se mantivesse constante nesse período, com uma variação não superior a  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , medida com termômetro padrão.

Alcançado o equilíbrio, retirava-se em torno de 8ml de amostras da fase superior e inferior com auxílio de seringas plásticas de 10 ml, para a análise.

Com base na equação 2 de Henderson-Hasselbach (BACCAN et alii, 1979), determinou-se a razão  $M_1$  ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) /  $M_2$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a ser utilizada em cada experimento para se obter o pH desejado. As proporções de  $M_1/M_2$  em função do pH estão na tabela 2. O pH final do sistema foi medido posteriormente nas amostras que foram retiradas para análise.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{m_1}{m_2} \quad (2)$$

**TABELA 2.** Proporções de  $M_1/M_2$  utilizadas nos experimentos

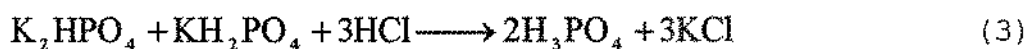
| pH | Razão $M_1/M_2$ |
|----|-----------------|
| 6  | 0,1807          |
| 7  | 1,807           |
| 9  | 180,71          |

## **2.3.Análises**

Geralmente em sistemas aquosos bifásicos, quando se analisa sua composição, determina-se a concentração de apenas dois dos componentes. A terceira concentração obtem-se por diferença. Na maioria dos casos apresentados na literatura, para sistemas polímero/sal, determina-se a concentração de sal e a de polímero, obtendo-se a de água por diferença. A escolha dos componentes para análise das concentrações deve levar em conta alguns fatores como, método utilizado, disponibilidade de equipamentos, tempo de análise e qualidade dos resultados obtidos . A partir disto, adotamos também a determinação de dois componentes, detalhadas a seguir.

### **2.3.1.Concentração de Sal**

A concentração de sal foi determinada de acordo com GREVE (1990). Num bequer vazio de 10ml, pesou-se de 1 - 1,5 g da amostra contida na seringa e completou-se para 20g com água destilada. Mediu-se o pH da solução. Em seguida, adicionou-se de 1 a 5 ml dependendo da fase (superior ou inferior) de uma solução 10% de ácido clorídrico , até pH próximo de 2, para a transformação de fosfatos, garantindo assim que todos os fosfatos existentes na solução sejam transformados em ácido fosfórico. A equação a seguir mostra esta transformação:



Titula-se esta solução (titulação potenciométrica) com hidróxido de potássio 0,1M. É conhecido que o ácido fosfórico é um ácido forte, triprótico e que possui somente dois hidrogênios ionizáveis, o primeiro a pH próximo de 4 e o segundo a pH próximo de 9. Com os dados obtidos na titulação, é possível construir a curva de titulação (pH X vol KOH) e determinar o volume real titulado, que é obtido pela diferença de volume dos dois pontos de inflexão da curva (hidrogênios ionizados), como mostra a figura 2.

Fazendo a derivada primeira ( $\delta\text{pH}/\delta\text{Vol}$ ) destes pontos em relação ao volume, obtém-se com melhor precisão este valor. A figura 3 mostra um resultado típico.

Transformamos este volume em concentração de fosfato utilizando as equações abaixo (GREVE, 1990):

$$V_{\text{KOH}} \cdot N_{\text{KOH}} = n_{\text{mol}} \cdot \text{PO}_4^{-3} \quad (4)$$

$$\text{MPO}_4^{-3} = \frac{m_1}{174,18} + \frac{m_2}{136,09} \quad (5)$$

$$n_{\text{mol}} \text{PO}_4^{-3} = \text{MPO}_4^{-3} \quad (6)$$

Para pH = 6

$$M_{\text{total}} = 140,8451 \cdot \text{MPO}_4^{-3} \quad (7)$$

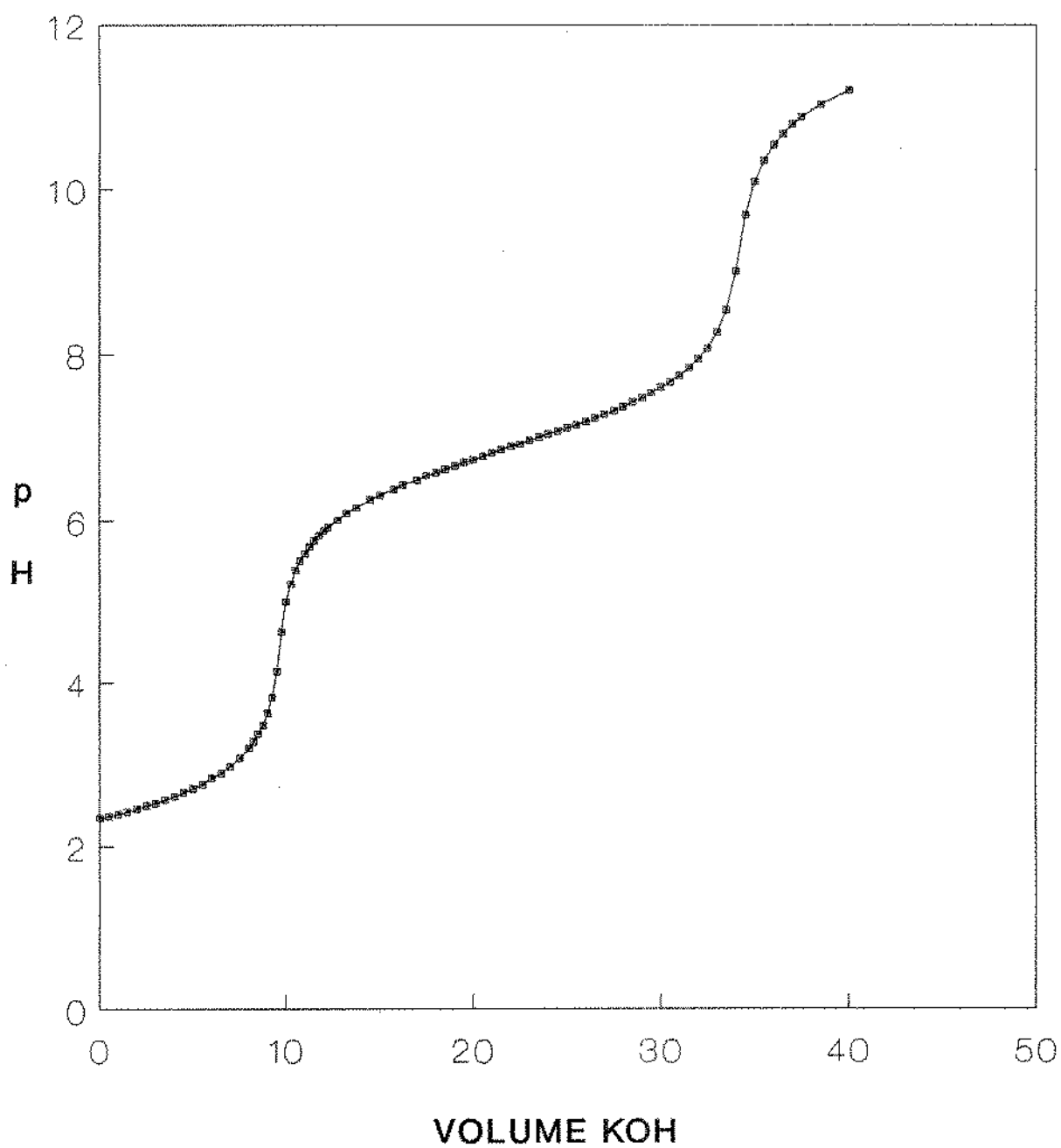


FIGURA 2. Curva de titulação (pH X Vol. KOH) obtida para a fase inferior do sistema PEG 1000/fosfato de potássio, T=40, pH=9.

dpH/dVol

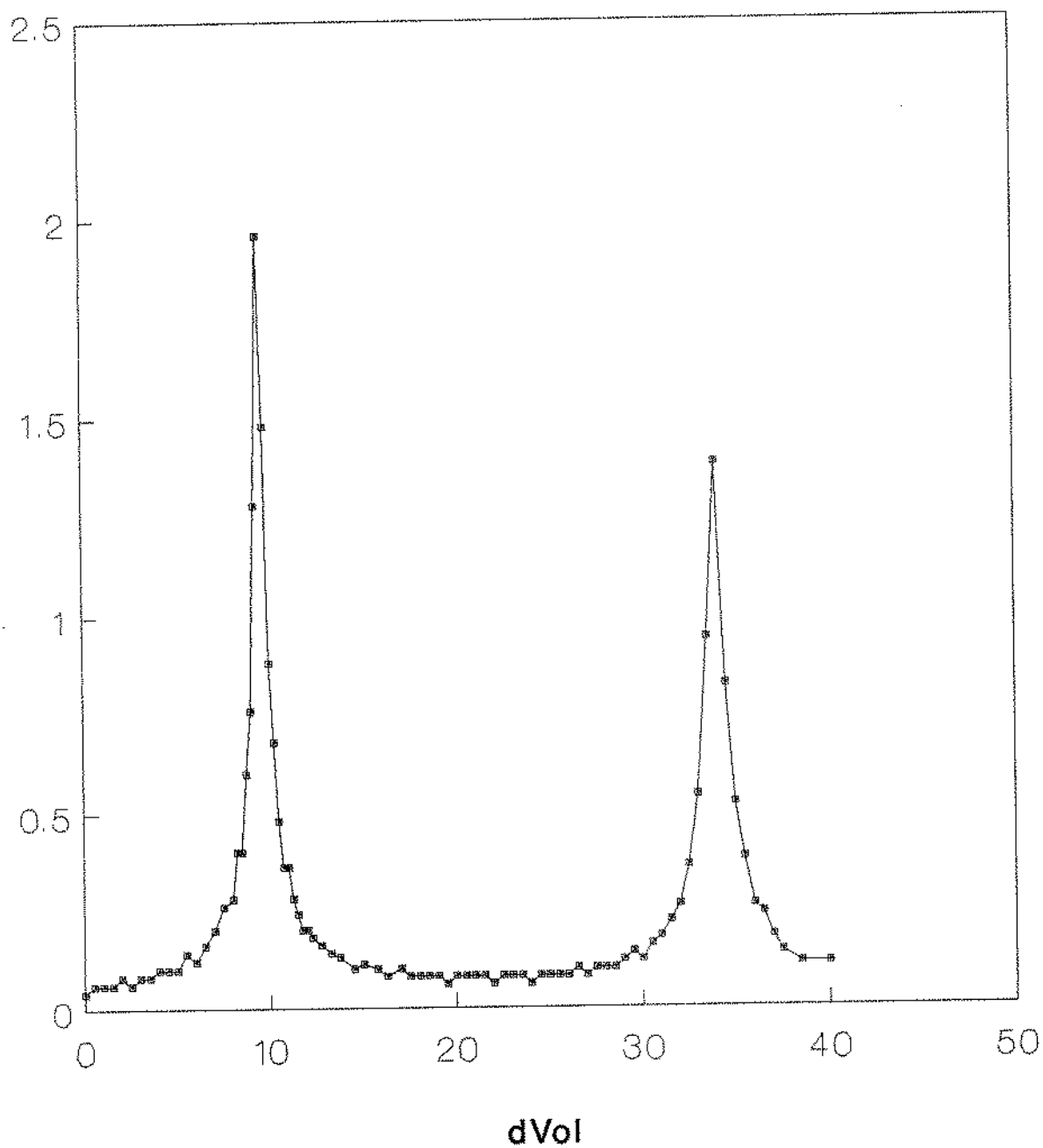


FIGURA. 3. Derivada primeira ( $\delta\text{pH}/\delta\text{Vol}$ ) do sistema PEG 1000/fosfato de potássio,  $T = 40$ ,  $\text{pH} = 9$ .

Para pH = 7

$$M_{\text{total}} = 158,7302. \text{MPO}_4^{-3} \quad (8)$$

Para pH = 9

$$M_{\text{total}} = 175,4386. \text{MPO}_4^{-3} \quad (9)$$

$$\%C_{\text{sal}} = M_{\text{total}} / M_{\text{amostra}} \cdot 100 \quad (10)$$

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras da outra fase. Todas as análises foram feitas em duplicata para garantia da reprodutibilidade.

### 2.3.2. Escolha do segundo componente

A escolha do segundo componente para análise de concentração trouxe alguns problemas do ponto de vista experimental. A priori, optamos por adotar o método de SNYDER (*et alii*, 1992) para a determinação da concentração de PEG. Vários testes preliminares foram realizados para otimização do método com soluções padrões compostas só pelo polímero, onde os resultados obtidos foram bastante favoráveis.

A aplicação do método HPLC ("high-performance liquid chromatographic") para a separação de macromoléculas é um desenvolvimento bastante recente. Antes de iniciar o trabalho experimental é necessário o conhecimento de algumas regras

básicas de funcionamento do equipamento, tais como: todas as soluções e amostras a serem injetadas no cromatógrafo devem ser preparadas com água milli Q, degaseificadas (ultrassom) e filtradas; o equipamento deve ser mantido ligado por um período mínimo de 24 horas, para sua estabilização, antes de iniciar o trabalho de injeção das amostras, a temperatura ambiente deve se manter constante durante todo o processo.

O método escolhido para a construção da curva padrão foi o do padrão interno. Ele é assim chamado pois utiliza-se uma solução de concentração conhecida de um composto com características semelhantes ao padrão, mas com tempo de retenção diferente, para que o comportamento da curva padrão seja reproduzido nas amostras das fases.

A curva padrão foi construída da seguinte maneira:

1. Soluções padrão de PEG 8000 com concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 90 e 100mg/ml foram preparadas segundo os critérios já citados anteriormente;
2. A solução do padrão interno, PEG 10000, com concentração de 25mg/ml também foi preparada;
3. Adotou-se como base a proporção 2:1 para a construção da curva padrão, isto é para cada 10 ml de solução de PEG 8000 utilizou-se 5 ml de solução de PEG 10000;
4. Uma alíquota de 1 ml desta solução 2:1, foi utilizada para injeção e construção da curva padrão.

Cada corrida cromatográfica durou em torno de 20 min. O detector utilizado foi o de índice de refração, a fase móvel  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,3 mM, a vazão de 1 ml/min, temperatura da coluna de 40°C, temperatura ambiente de 20°C, a coluna TSK G1000 PW(300 X 7,5 mm) e injeção automática (auto sampler). Todas as injeções foram feitas em duplicata.

De posse da curva padrão, iniciou-se a injeção das amostras das fases dos sistemas preparados, seguindo os mesmos critérios adotados na construção da curva padrão e nos testes preliminares com soluções compostas só com o polímero.

Os resultados, no entanto, indicaram que a concentração obtida nas amostras não reproduzia os valores de concentração esperados. A concentração de sal contida nas amostras das fases interferia decisivamente nos resultados, chegando inclusive a aproximar o tempo de retenção dos diferentes polímeros, o PEG 8000 das amostras a serem analisadas e o PEG 10000, empregado como padrão interno.

Novos testes foram realizados, agora com uma etapa de "purificação" das amostras por diálise antes da injeção. Bons resultados foram obtidos, mas o tempo necessário para a diálise, de no mínimo 24 horas, dificultaria a realização de um grande número de experimentos.

Como os métodos de análise de concentração de sal e de água já estavam otimizados, com bons resultados, e como o método de análise para PEG mostrou ser bastante complexo, e necessitava de um tempo bastante grande para sua realização, optamos por obter a concentração do PEG por diferença.

A concentração de água pode ser determinada por métodos convencionais em estufa com circulação de ar. No caso de soluções poliméricas, a redução do teor de umidade eleva sua viscosidade e dá origem a uma película na superfície da amostra que impossibilita a saída da água ainda presente. A técnica sugerida na literatura para sistemas polímero/polímero e polímero/sal é normalmente a liofilização (FORCINITI et alii, 1992). No entanto, este tipo de problema na secagem de fluídos viscosos é encontrado na determinação de umidade em diversos alimentos, sendo sugerido o emprego de microesferas de vidro para evitar a formação desta película.

Uma comparação foi realizada entre as duas técnicas citadas, para uma mesma solução aquosa do polímero resultando em uma diferença nas concentrações medidas de 0,1%. Neste caso, utilizamos a técnica de determinação de umidade para substâncias viscosas (geléias) sugerida pela AOAC devido ao menor custo e disponibilidade de equipamento, descrita a seguir.

### 2.3.3. Concentração de Água

A concentração de água foi obtida com base no método da AOAC, sugerida para a determinação de umidade em geléias e alimentos viscosos. Os materiais (vidros e microesferas) previamente secos em estufa com circulação de ar a 40°C por uma hora, eram introduzidos no dessecador, onde ficavam por aproximadamente 45 min para esfriar. Após esse tempo, fazia-se a pesagem em balança analítica das amostras.

Para facilitar o trabalho experimental utilizamos uma tabela que continha os materiais a serem pesados como segue:

| Fases      | Placa | Micro esferas | Amostra | Bastão | Peso Total |
|------------|-------|---------------|---------|--------|------------|
| Superior 1 |       |               |         |        |            |
| Superior 2 |       |               |         |        |            |
| Inferior 1 |       |               |         |        |            |
| Inferior 2 |       |               |         |        |            |

Fez-se a pesagem das amostras. A esse conjunto chamou-se massa úmida ( $M_{\text{úmida}}$ ). Após cada pesagem anotou-se o valor na tabela e tarou-se a balança. A placa utilizada era de vidro com diâmetro de  $\pm 5$  cm, a granulometria das micro esferas

de 42 mesh e o bastão de vidro com 5 mm de espessura por 10 cm de comprimento.

Procedeu-se da mesma forma para todas as outras amostras. Todas as análises foram feitas em duplicata. Ao final da pesagem, colocou-se os conjuntos na estufa à vácuo a 60°C. O tempo utilizado foi determinado por testes preliminares.

Segundo o método adotado o tempo ideal é dado quando, depois de no mínimo três pesagens consecutivas o peso permaneça constante (não varie mais pelo menos até a terceira casa decimal). Em nossos experimentos a variação máxima admitida nos experimentos foi  $2 \times 10^{-4}g$ . Com base nesta informação o tempo utilizado foi de 24 horas.

Passado as 24 horas retirou-se as amostras da estufa colocando-as no dessecador onde ficaram por mais 45 min. Procedeu-se a pesagem novamente. A este conjunto chamou-se de massa seca ( $M_{seca}$ ). Com estes valores calculou-se a concentração de água pela equação 11.

$$\%H_2O = \frac{M_{úmida} - M_{seca}}{M_{amostra}} \cdot 100 \quad (11)$$

#### 2.3.4. Concentração de Proteína

A determinação do coeficiente de partição da albumina no sistema PEG/sal foi realizada para algumas condições experimentais. Utilizou-se a linha de amarração H (composição bruta em fração mássica : 17.90% PEG 8000, 10.80%

sal , 71.30%, água), pHs 6,7,8 e 9 e temperaturas de 4,25 e 40°C. Estes experimentos não foram realizados na célula de equilíbrio. Adotou-se o procedimento sugerido por FORCINITI et alii (1992). Sistemas com massa global final de 20g foram preparados em tubos de ensaio de 25ml, sendo que a cada sistema adicionou-se 5g de uma solução de proteína com concentração de 1mg/ml, incorporada juntamente com a quantidade de água calculada para o sistema. Isto é, se para um dado sistema a quantidade necessária de água calculada é 15g, adiciona-se 10g de água e 5g da solução de proteína. Agitou-se vagarosamente o sistema para que não ocorresse desnaturação da proteína ( por isso a não utilização da célula de equilíbrio). Os tubos foram imersos em um banho termostático, com temperatura constante por 4 horas. Com auxílio de seringas de 5ml e agulhas especiais (10cm de comprimento por 1mm de diâmetro), retirou-se cuidadosamente amostras da fase superior e inferior. Na literatura geralmente retira-se as fases com auxílio de pipetas descartando a interface, em nosso sistema isso causava grandes perturbações no equilíbrio do sistema. Fez-se a leitura das fases em espectrofotômetro UV visível a 280 nm.

Sistemas com composições idênticas, sem adição de proteínas, também foram preparados par serem utilizados como branco na leitura das amostras. Este método só é válido quando a concentração de proteína nas fases for maior que 0,01 mg/ml

### **2.3.5.Determinação do Erro Experimental**

Como não existe teste de consistência para dados de equilíbrio líquido-líquido é necessário recorrer a outros procedimentos para atestar a qualidade dos dados obtidos. Normalmente isto é feito pela verificação da compatibilidade entre a concentração global do sistema e a concentração das

fases em equilíbrio. Isto pode ser visualmente observado em um diagrama de equilíbrio através do alinhamento dos três pontos que representam as concentrações. No entanto para uma melhor avaliação da qualidade dos dados pode-se proceder a um cálculo de balanço de massa para cada componente como indicado abaixo.

### 2.3.5.1. Balanço de massa

Para este cálculo é necessário dispor da massa das duas fases em equilíbrio. Não é possível uma determinação experimental precisa da massa destas fases. Neste caso, optou-se por determinar a massa das duas fases com base na hipótese que o erro para o balanço de massa da água é nulo.

A escolha da concentração de água se deve à maior presença deste componente no sistema e à maior precisão na determinação de sua concentração. A partir desta hipótese a massa das fases foi determinada pelas equações 12 e 13 abaixo.

$$MT = MT_1 + MT_2 \quad (12)$$

$$MT_1 \cdot \%H_2O_{(1)} + MT_2 \cdot \%H_2O_{(2)} = MH_2O \quad (13)$$

$$MT_1 \cdot \%PEG_1 + MT_2 \cdot \%PEG_2 = MP \quad (14)$$

$$MT_1 \cdot \%Sal_1 + MT_2 \cdot \%Sal_2 = MS \quad (15)$$

onde:  $MT_1$  é a massa da fase 1;  
 $MT_2$  é a massa da fase 2;  
 $MPEG_1$  é a concentração de polímero na fase 1;  
 $MPEG_2$  é a concentração de polímero na fase 2;  
 $MSal_1$  é a concentração de sal na fase 1;  
 $MSal_2$  é a concentração de sal na fase 2;  
 $MH_2O_{(1)}$  é a concentração de água na fase 1;  
 $MH_2O_{(2)}$  é a concentração de água na fase 2;  
 $MP$  é a massa total de polímero no sistema;  
 $MS$  é a massa total de sal no sistema;  
 $MH_2O$  é a massa total de água no sistema;  
 $MT$  é a massa total do sistema.

Sabendo os valores de  $MT_1$  e  $MT_2$  (obtidos no programa) e os valores de concentração de todos os reagentes nas duas fases (PEG, sal e água), obtém-se o erro relativo experimental de cada componente (equação 14 para PEG e equação 15 para sal) segundo a seguinte equação:

$$ERRO = \frac{|A-B|}{B} \quad (16)$$

Os resultados obtidos para estes erros comparados aos observados na literatura, mostraram-se bastante próximos. Das cinquenta linhas de amarração calculadas experimentalmente neste trabalho, 60% delas apresentou erro no balanço de massa entre 2 que 5%, 10% apresentou erro entre 7 e 9% e 30% menor que 2%. Para avaliar o significado destes resultados realizou-

se o mesmo cálculo para dados de equilíbrio de sistemas similares apresentados por outros autores.

Estes erros como se observa na figura 4 para os principais dados completos para sistemas PEG/sal, apresentam erros numa mesma faixa e distribuição razoavelmente similar. Obviamente este tipo de erro não deve ser superestimado, a medida que se parte de uma premissa de erro nulo no balanço de massa para água, como de fato essa hipótese não é verdadeira, o erro nos outros balanços deve ser menor do que o determinado por nós.

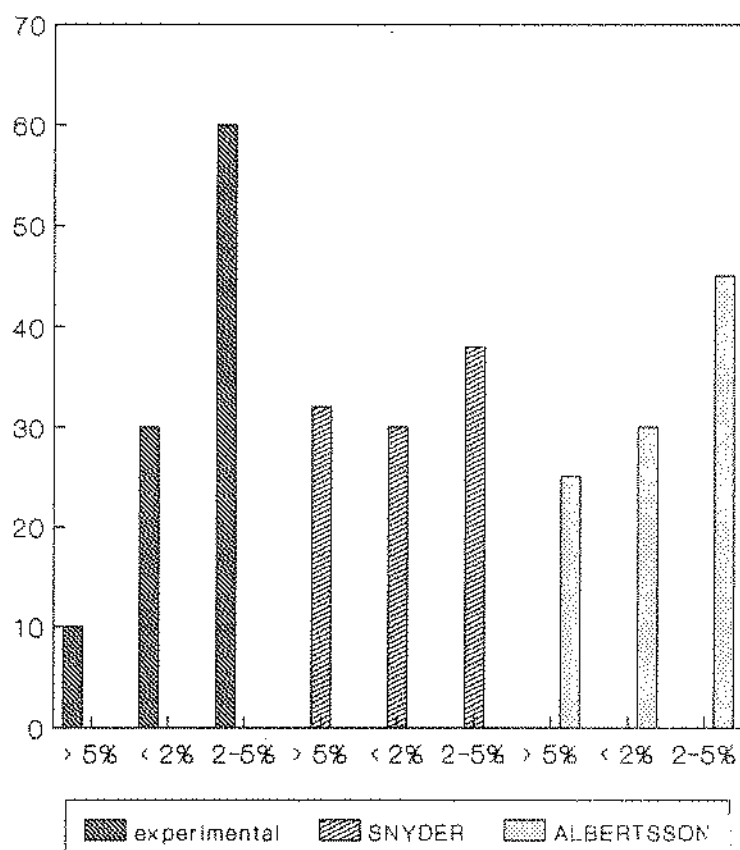


FIGURA.4. Gráfico comparativo do erro experimental/literatura

## **CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Este capítulo objetiva detalhar e comparar os resultados obtidos experimentalmente com os apresentados na literatura. Lembrando que, em alguns casos, faremos uso dos resultados apresentados na literatura para sistemas PEG/dextrana, por falta de parâmetros de comparação para sistemas PEG/sal.

Antes de apresentarmos os resultados obtidos, é conveniente esclarecer alguns conceitos e representações gráficas normalmente empregadas no caso de sistemas aquosos bifásicos, diferenciando-os dos correspondentes no equilíbrio líquido-líquido tradicional.

### **3.1. Diagrama de Equilíbrio**

Chamamos de diagrama de equilíbrio a representação utilizada para expressar as concentrações do sistema ternário. Existem duas formas mais comumente utilizadas, a forma triangular, que expressa a concentração dos três componentes (figura 5a), e a forma de eixos cartesianos, que expressa apenas duas das concentrações do sistema (figura 5b). Esta última representação é freqüentemente empregada em sistemas aquosos bifásicos, para os quais a região de interesse se concentra na parte do diagrama com elevada concentração de água.

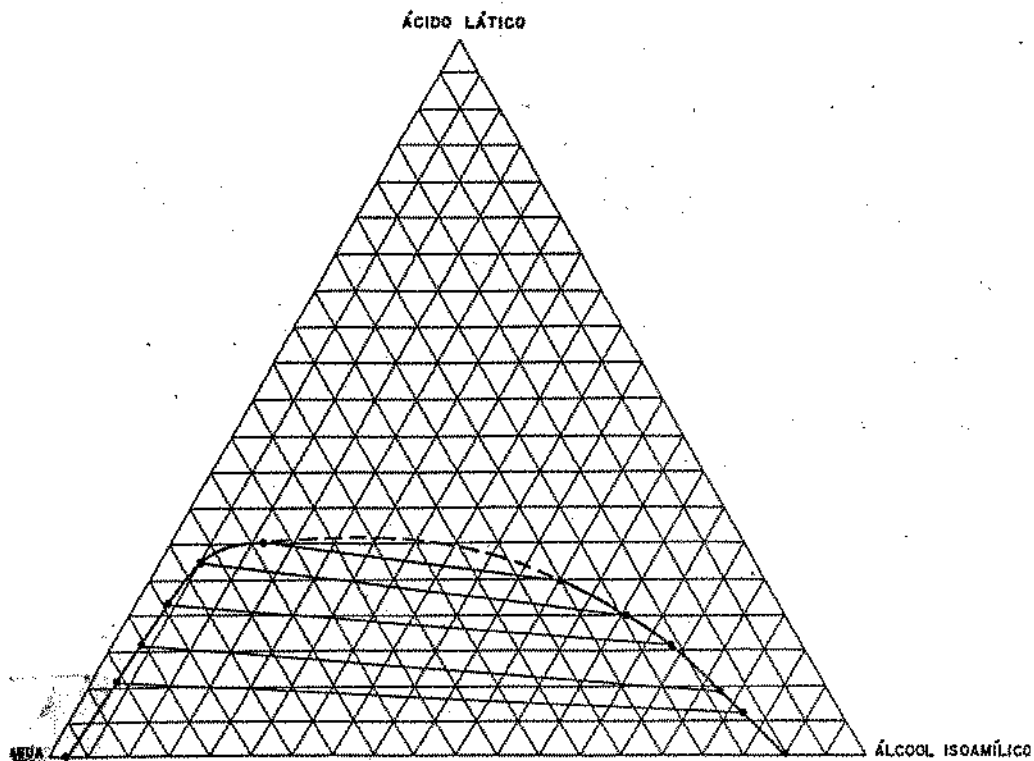


FIGURA 5a. Diagrama de equilíbrio sistema ácido láctico/álcool iso-amílico/água em coordenadas triangulares.

Fonte: COIMBRA, (1991)

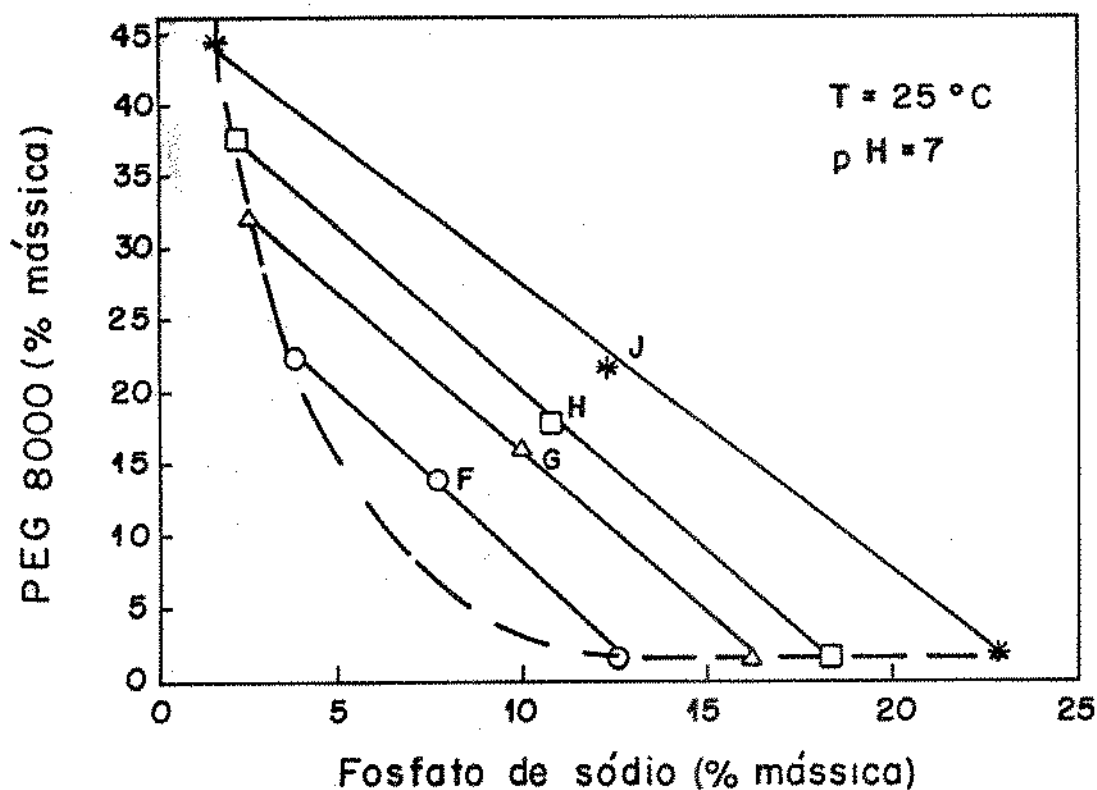


FIGURA 5b. Diagrama de equilíbrio sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 25°C , pH 7 em cordenadas cartesianas.

Os diagramas de equilíbrio são compostos por: linhas de amarração e curva binodal. A curva binodal e as linhas de amarração são contruídas simultâneamente através de análise química do sistema.

1.Linhas de amarração (linhas contínuas), são formadas através da união das concentrações obtidas experimentalmente dos componentes nas fases superior e inferior, passando pela concentração mássica global do sistema. É importante salientar que a linearidade dos pontos obtidos, é prova de bons resultados (vide ítem 2.3.5). Estas linhas também são conhecidas como "tie-lines".

2.Linha binodal (linha tracejada), separa o diagrama de equilíbrio em duas regiões, região monofásica e região bifásica . É obtida pela união dos pontos extremos das linhas de amarração. Através de métodos empíricos para os dados de equilíbrio pode-se estimar o ponto crítico ("PLAIT POINT"), que delimita as regiões, para cada sistema .

A diferença das concentrações de polímero e sal entre as duas fases tem uma grande influência no coeficiente de partição das proteínas nestes sistemas. Na literatura emprega-se para representar esta diferença de concentração o conceito de comprimento das linhas de amarração, procurando relacioná-lo com diferentes variáveis como pH, temperatura, peso molecular do polímero, etc. A equação 17 apresenta a forma de cálculo para o comprimento das linhas de amarração ("TIE LINE LENGHT - TLL").

$$TLL = \left[ (PEG_2 - PEG_1)^2 + (Sal_2 - Sal_1)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (17)$$

onde os sub índices 1 e 2 representam a fase 1 (rica em PEG) e 2 (rica em sal) respectivamente.

### 3.2.Comparação dos Dados Experimentais com a Literatura

Os resultados preliminares, obtidos experimentalmente para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio a 25 °C e pH 8, estão apresentados na figura 6 juntamente com os dados de SNYDER et alii (1992). Apesar de utilizarmos métodos de análise diferentes e determinarmos a concentração de outros componentes (sal e água), observa-se que a linha de amarração obtida experimentalmente e a da literatura, praticamente se sobrepõem, o que demonstra uma grande aproximação dos resultados. Na tabela 3 estão apresentados os valores de concentração (em fração mássica) dos componentes, obtidos experimentalmente e por SNYDER et alii (1992) respectivamente.

TABELA 3. Comparação de dados do sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 25°C, pH 8.

| Sistema | Composição total |      |                  | Fase superior |      |                  | Fase inferior |     |                  |
|---------|------------------|------|------------------|---------------|------|------------------|---------------|-----|------------------|
|         | SAL              | PEG  | H <sub>2</sub> O | SAL           | PEG  | H <sub>2</sub> O | SAL           | PEG | H <sub>2</sub> O |
| TLG*    |                  |      |                  |               |      |                  |               |     |                  |
| SNYDER  | 10.0             | 16.1 | 73.9             | 2.6           | 34.6 | 62.9             | 16.3          | 1.6 | 82.1             |
| EXPER.  | 10.0             | 16.1 | 73.9             | 3.1           | 34.8 | 62.1             | 16.9          | 0.2 | 82.9             |

\*TLG - "Tie-Line" obtida para o experimento G.

Para os dois principais componentes em cada fase os dois métodos fornecem resultados sem dúvida muito próximos. Mas as pequenas diferenças aí observadas são suficientes para tornar significativa a diferença na concentração do componente

presente em menor quantidade. Não é possível tirar conclusões definitivas, a partir desta comparação, quanto à melhor qualidade de um ou outro destes dois métodos. A diferença nos valores de concentração pode ser consequência não somente da metodologia empregada. Isto porque PEGs com peso molecular próximos a 10000, quando preparados, podem apresentar pequenas diferenças estruturais já que são formados por várias cadeias de polímeros menores (WALTER et alii, 1985; KANG e SANDLER, 1988) o que certamente pode interferir na distribuição dos vários componentes no sistema

Considerando estes aspectos e a boa reprodutibilidade dos dados para as duas principais concentrações resolvemos adotar este método como base para todo o desenvolvimento experimental.

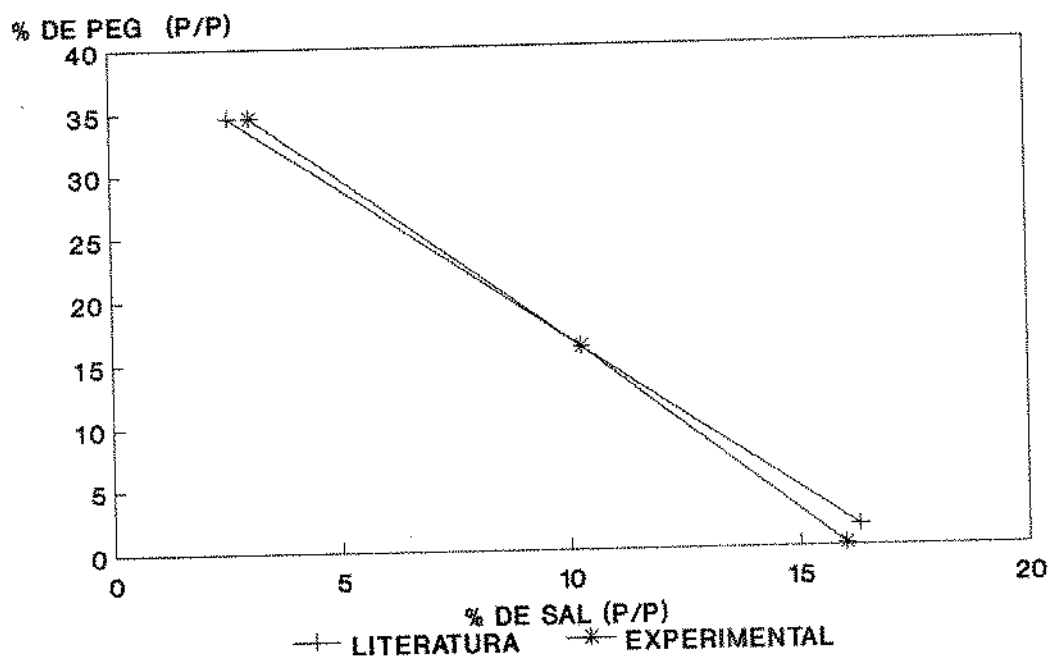


FIGURA 6. Gráfico comparativo do sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 25°C, pH 8.

### 3.3.Apresentação e Análise de Dados

Vários diagramas de equilíbrio foram determinados experimentalmente para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio e PEG 1000/fosfato de potássio a diferentes valores de pH e temperatura. Os sistemas foram preparados como citado anteriormente, quatro linhas de amarração foram medidas para o sistema PEG 8000 e três para o sistema PEG 1000. Os resultados obtidos serão apresentados de duas formas: diagramas de equilíbrio e comprimento das "tie lines" versus pH e temperatura.

Os diagramas de equilíbrio serão apresentados sob a forma de eixos cartesianos com suas respectivas tabelas contendo as concentrações globais e de cada componente nas duas fases, superior e inferior (em fração mássica). As linhas de amarração codificadas como F,G, H e J para o sistema PEG 8000/fosfato e B, C e D para o sistema PEG 1000/fosfato representam diferentes composições globais de cada experimento.

#### 3.3.1.Influência do pH

A discussão da influência do pH será feita baseada no sistema PEG 8000/fosfato de potássio. Determinamos um conjunto de oito diagramas de fases para este sistema combinando três valores de temperatura e três valores de pH. A nomenclatura utilizada foi padronizada de acordo com a composição do sistema. Isto significa que todos os experimentos com mesma nomenclatura possuem a mesma composição global.

Na literatura a influência do pH é pouco conhecida, os poucos dados apresentados relacionam a influência desta variável somente com o coeficiente de partição de biomoléculas e não com o sistema propriamente dito. Nós faremos uso então de nossos resultados experimentais, para discutirmos esse comportamento nos sistemas e quando tratarmos da partição de proteínas discutiremos com maior ênfase a influência desta variável.

Nas figuras 7,8 e 9, e tabelas 4, 5 e 6, encontram-se representados os dados de equilíbrio para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio em combinações de pH e temperatura utilizados e suas composições respectivamente. Nota-se em geral um bom alinhamento dos pontos que representam a concentração global e a concentração das fases, e uma dispersão um pouco maior para aqueles casos cuja concentração global está mais distante do "PLAIT POINT".

Foi justamente nestes casos que o erro experimental apresentou valores maiores que 7%. Os dados de equilíbrio na forma de tabelas e gráficos para as outras combinações de pH e temperatura, encontram-se no apêndice 1 e as observações a seguir são extensivas aos mesmos

TABELA 4. Composição das fases do sistema PEG 8000/ fosfato de potássio/água à 4°C, pH 9.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                   | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|-------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | %H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 7.70                            | 13.90 | 78.48              | 3.71                         | 20.92 | 75.37             | 12.61                        | 2.74  | 84.65              |
| 9.99                            | 16.10 | 73.91              | 2.45                         | 31.06 | 66.49             | 16.45                        | 2.23  | 81.32              |
| 10.78                           | 17.87 | 71.35              | 2.02                         | 33.58 | 64.40             | 18.35                        | 2.48  | 79.17              |
| 12.30                           | 21.89 | 65.81              | 1.50                         | 41.22 | 57.28             | 23.77                        | 3.49  | 72.74              |

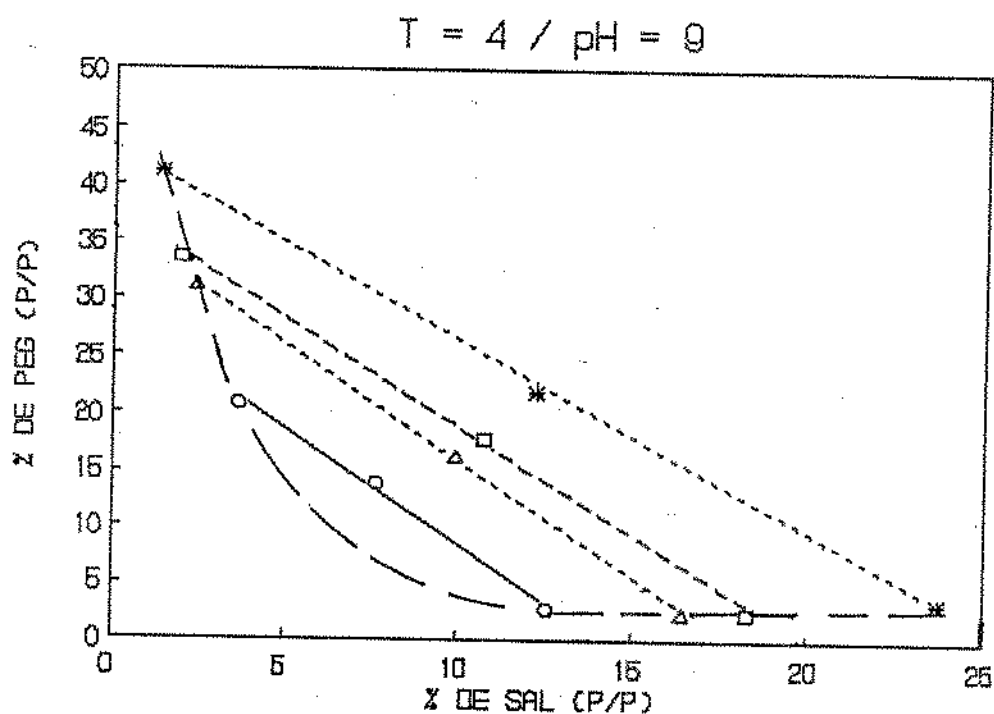
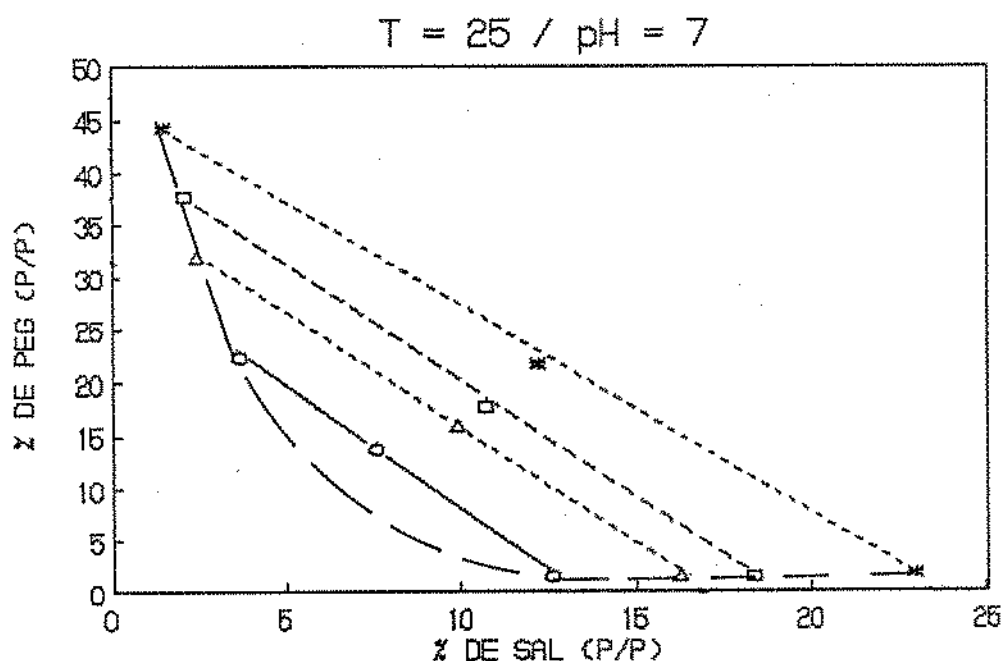


FIGURA 7. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 4°C , pH 9.

**TABELA 5.** Composição das fases para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 25°C, pH 7.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 7.69                            | 13.87 | 78.42              | 3.77                         | 22.45 | 73.78              | 12.67                        | 1.61  | 85.82              |
| 9.99                            | 16.10 | 73.91              | 2.49                         | 32.04 | 65.47              | 16.30                        | 1.58  | 82.12              |
| 10.79                           | 17.89 | 71.32              | 2.19                         | 37.76 | 60.05              | 18.43                        | 1.62  | 79.95              |
| 12.30                           | 21.89 | 65.81              | 1.60                         | 44.46 | 53.94              | 23.00                        | 2.12  | 74.88              |



**FIGURA 8.** Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 25°C , pH 7.

TABELA 6. Composição das fases do sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 40°C , pH 6.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 9.99                            | 16.09 | 73.92              | 3.42                         | 29.89 | 66.69              | 16.50                        | 2.56  | 80.94              |
| 10.81                           | 17.89 | 71.30              | 2.92                         | 34.75 | 62.33              | 18.83                        | 2.96  | 79.21              |
| 11.60                           | 20.00 | 68.41              | 3.02                         | 37.92 | 59.06              | 19.87                        | 3.62  | 77.51              |

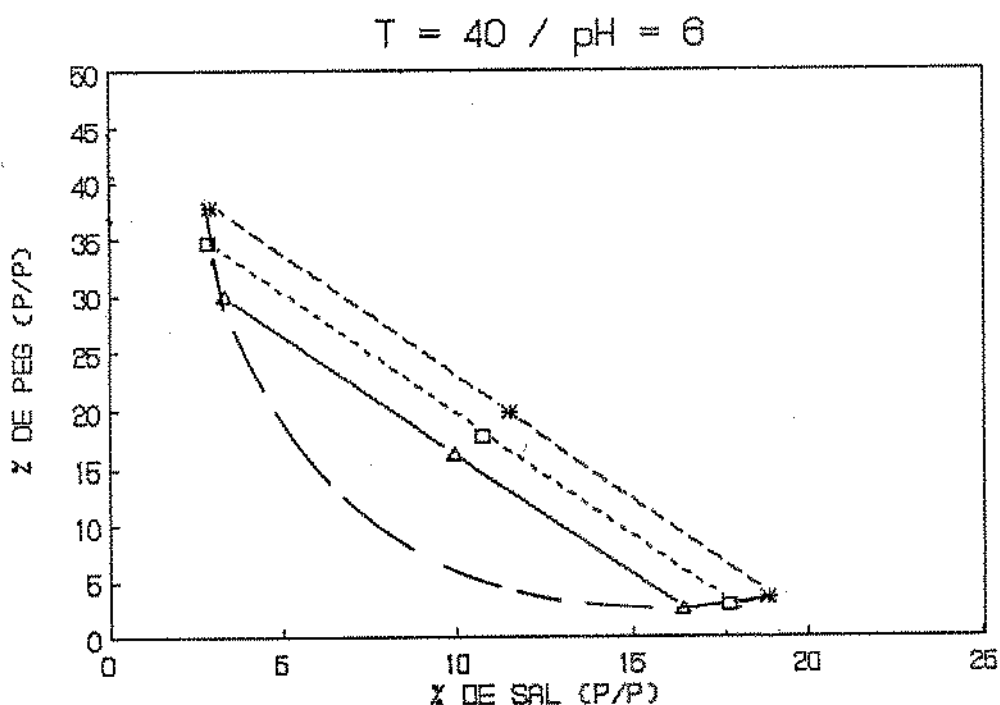


FIGURA 9. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 40°C , pH 6.

A discussão sobre a influência do pH será mais elucidativa se nos basearmos nos gráficos apresentados na figura 10. As curvas apresentadas indicam que a medida que o pH aumenta a curva binodal se desloca para concentrações menores do polímero e do sal, isto é, aumenta a região de separação de fases para o sistema

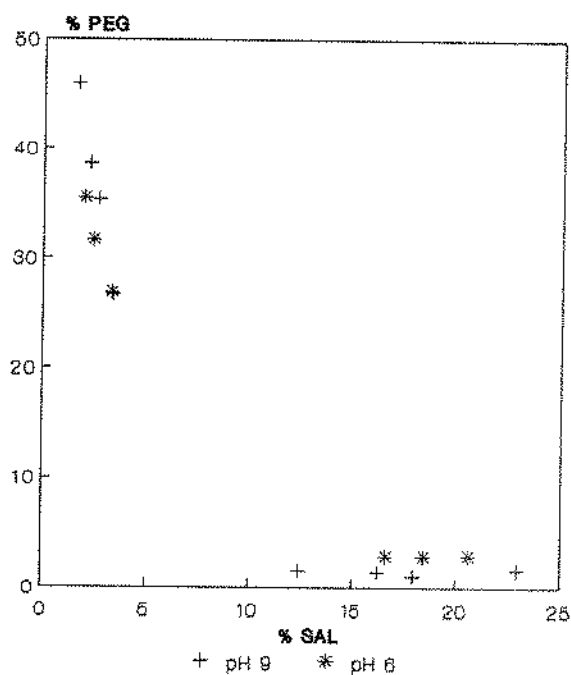


FIGURA .10. Influência do pH no comportamento da linha binodal

Os diagramas anteriores (7, 8 e 9) apresentam uma fronteira superior na qual há início da formação de uma terceira fase sólida composta pelo sal. O efeito da diminuição do pH sobre a curva binodal é reduzir a região de interesse composta somente por duas fases aquosas. Tendo constatado a freqüente ocorrência de uma fase sólida para pH 6 e temperatura de 4°C, os experimentos a esta temperatura se limitaram à apenas dois valores de pH.

A influência do pH se verifica não só sobre a curva binodal mas também sobre as linhas de amarração podendo alterar sua inclinação e seu comprimento. É o que se nota nas figuras 11, 12 e 13. O aumento do pH diminui a inclinação das linhas de amarração e aumenta o comprimento das "Tie Lines", indicando uma diferença maior de concentração entre os componentes, bastante interessante para o caso de separação de proteínas. Este comportamento foi observado em geral nas figuras 12 e 13 onde o efeito é mais acentuado na região entre pH 6 e 7. Para a temperatura de 4°C, como dito anteriormente, somente dois valores de pH foram determinados o que não nos permite fazer tal afirmação.

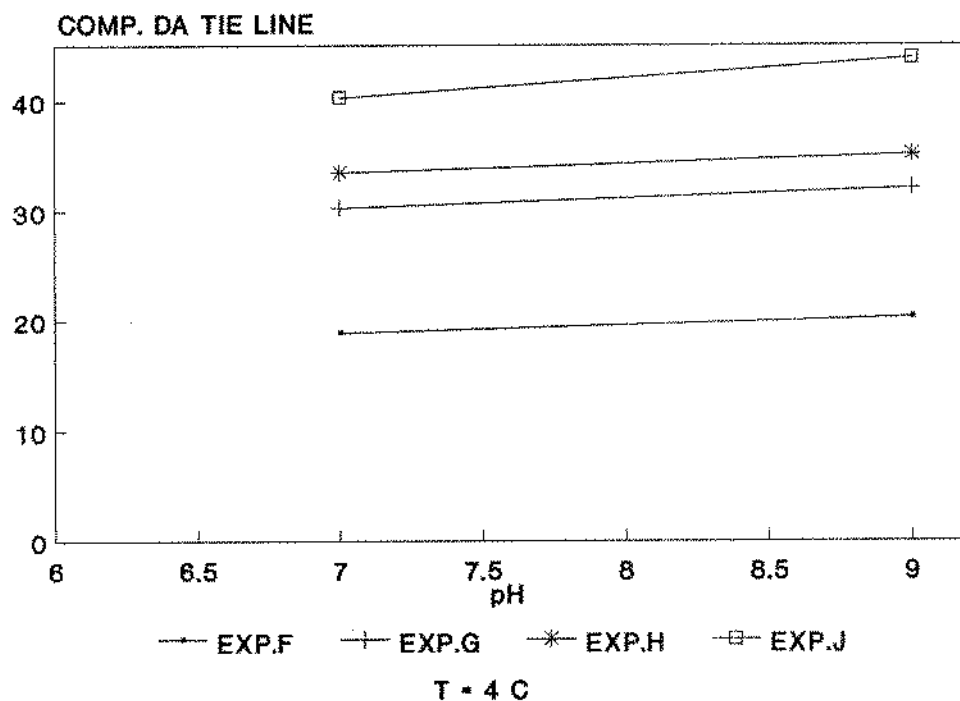


FIGURA.11. Influência do pH no sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 4°C

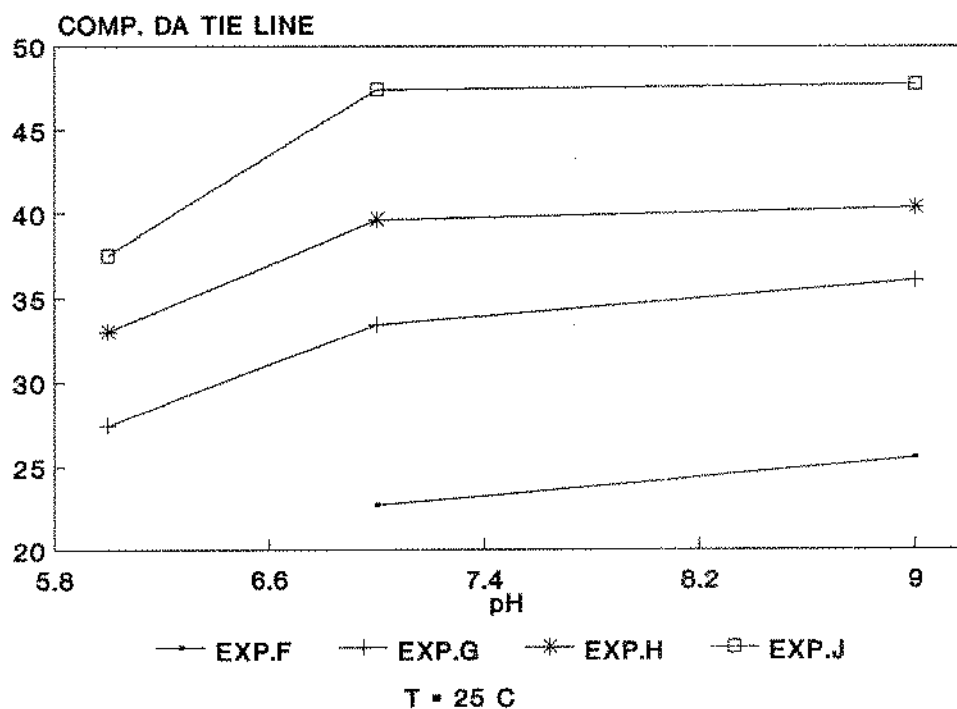


FIGURA .12. Influência do pH no sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 25°C.

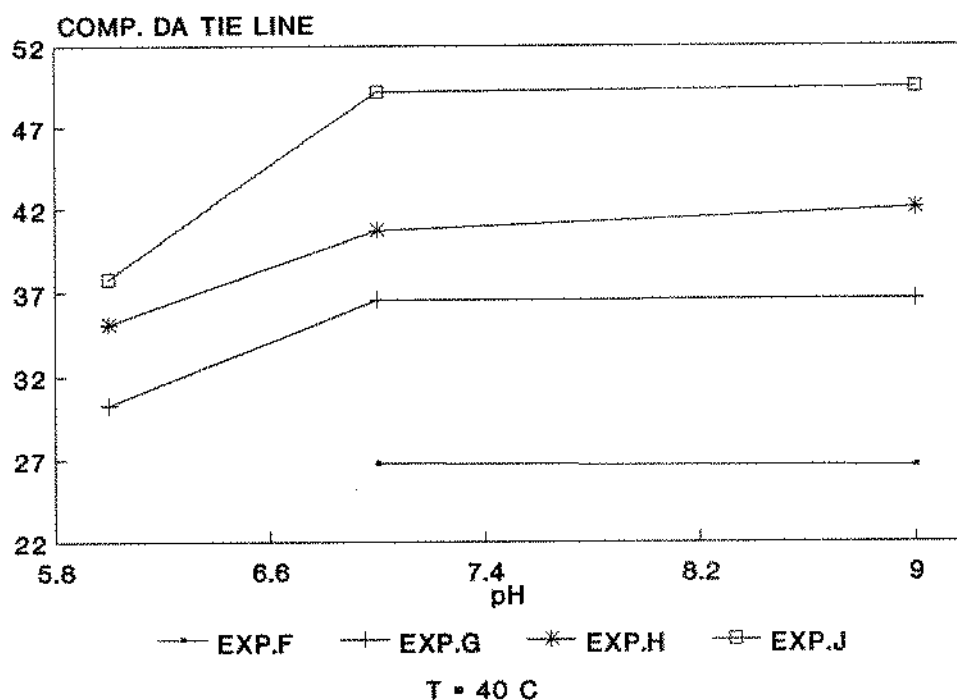


FIGURA.13. Influência do pH no sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 40°C.

### 3.3.2. Influência da Temperatura

A discussão da influência da temperatura será feita com base nos dados obtidos para PEG 1000/fosfato de potássio. Seis diagramas de equilíbrio foram determinados para este sistema. Nas figuras 14, 15 e 16 e tabelas 7, 8 e 9 estão representados os dados obtidos para algumas combinações de pH e temperatura e suas respectivas composições. A nomenclatura das linhas de amarração também foi padronizada para efeito de comparação dos sistemas estudados. As observações anteriores, para PEG 8000/fosfato de potássio quanto ao erro experimental, são extensivas aos dados apresentados para o sistema PEG 1000/fosfato de potássio. Os outros dados de equilíbrio para este sistema encontram-se no apêndice 1, juntamente com os dados para os sistemas com PEG 8000

**TABELA 7.** Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 4°C , pH 9.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 10.49                           | 17.89 | 71.62              | 4.84                         | 26.86 | 68.30              | 19.49                        | 5.19  | 75.32              |
| 11.40                           | 20.00 | 68.60              | 3.30                         | 32.73 | 63.97              | 22.28                        | 3.76  | 73.96              |
| 12.30                           | 22.00 | 65.70              | 2.90                         | 37.10 | 59.91              | 24.65                        | 2.91  | 72.44              |

**TABELA 8.** Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 25°C , pH 9.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 10.50                           | 17.89 | 71.61              | 5.02                         | 29.19 | 65.79              | 18.29                        | 3.62  | 78.09              |
| 11.40                           | 20.00 | 68.60              | 3.47                         | 35.68 | 60.85              | 21.67                        | 2.27  | 76.06              |
| 12.30                           | 22.00 | 65.70              | 3.13                         | 39.70 | 57.17              | 22.92                        | 2.33  | 75.75              |

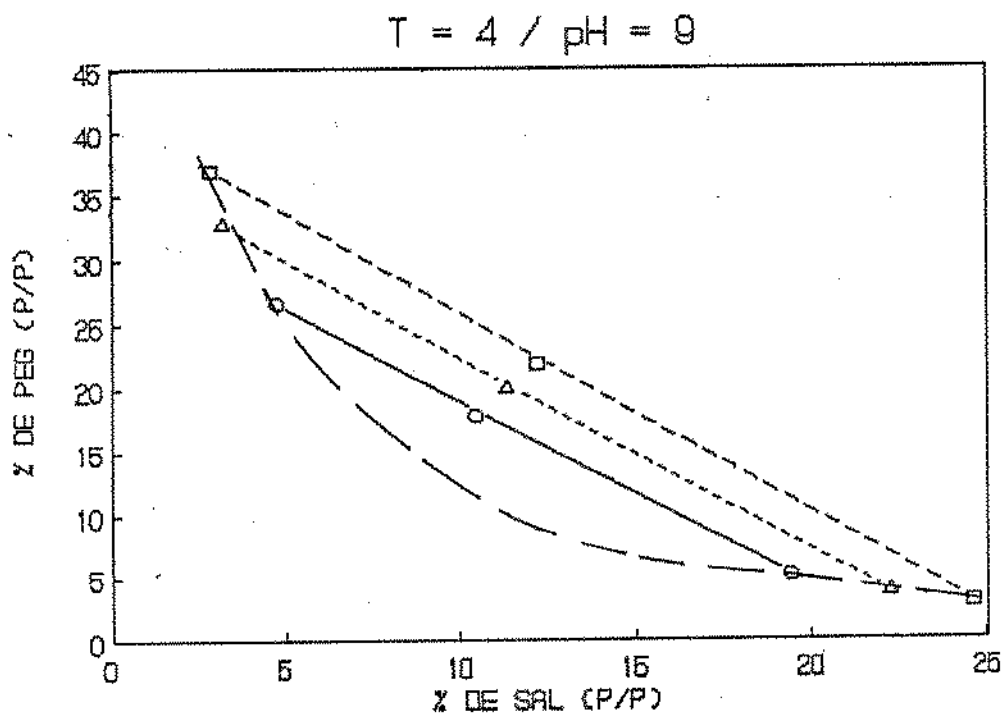


FIGURA 14. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfatode potássio à 4°C , pH 9.

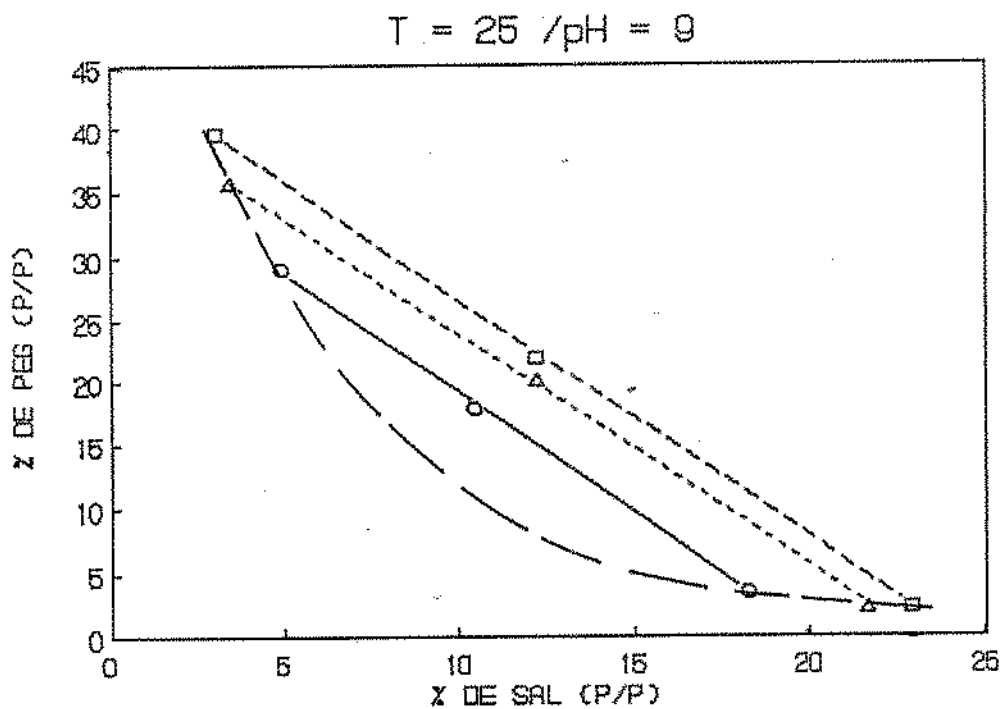
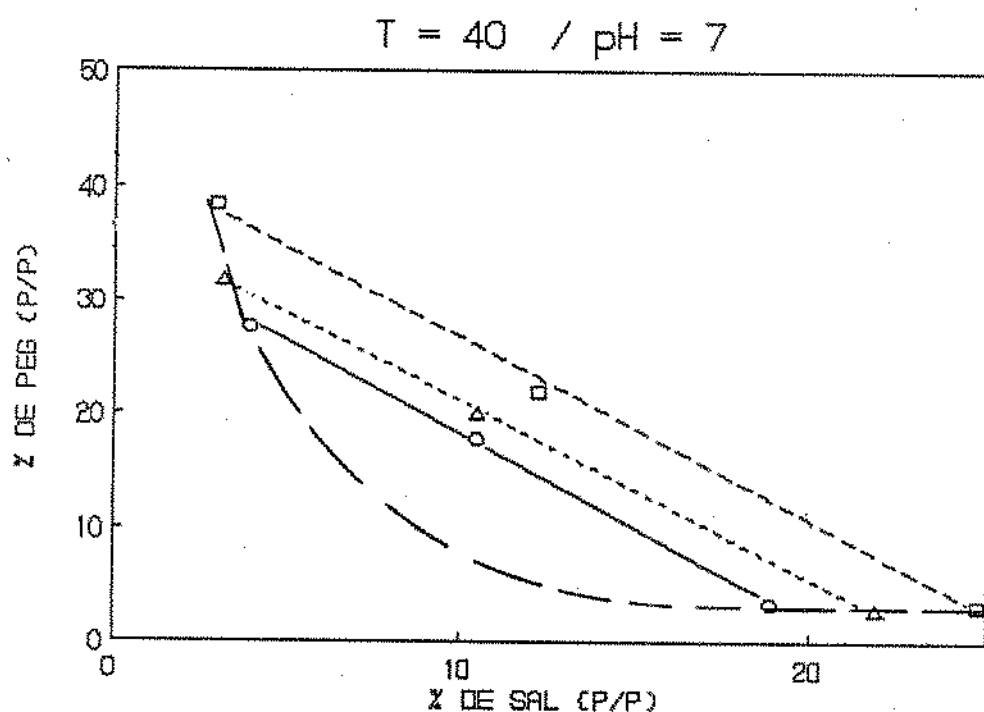


FIGURA 15. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfato de potássio à 25°C , pH 9.

**TABELA 9.** Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 40°C , pH 7.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 7.70                            | 13.90 | 78.40              | 3.38                         | 26.70 | 69.92              | 12.41                        | 1.50  | 86.09              |
| 9.99                            | 16.10 | 73.91              | 2.64                         | 35.34 | 62.02              | 16.25                        | 1.42  | 82.33              |
| 10.74                           | 17.80 | 71.46              | 2.22                         | 38.62 | 59.16              | 17.93                        | 1.08  | 80.99              |
| 12.30                           | 21.89 | 65.81              | 1.64                         | 45.93 | 52.43              | 22.93                        | 1.62  | 75.45              |



**FIGURA 16.** Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfatode potássio à 40°C , pH 7.

Nestes sistemas a determinação a pH 6 não foi possível, devido a freqüente formação de duas fases líquidas e uma terceira sólida, composta pelo sal, em todos os valores de temperatura.

Da mesma forma que representamos a influência do pH nas curvas binodais faremos aqui. A figura 17 apresenta as curvas binodais obtidas para os sistemas citados nas figuras anteriores onde percebe-se um comportamento semelhante ao observado para o pH, em valores maiores de temperatura a curva binodal é deslocada para concentrações menores dos componentes, aumentando a região de separação. Um comportamento oposto ao normalmente encontrado nos sistemas líquido-líquido tradicionais. O aumento da temperatura também facilita a dispersão das fases formadas e acelera sua coalescência com a interrupção da agitação, duas características importantes para o bom desempenho da extração líquido-líquido.

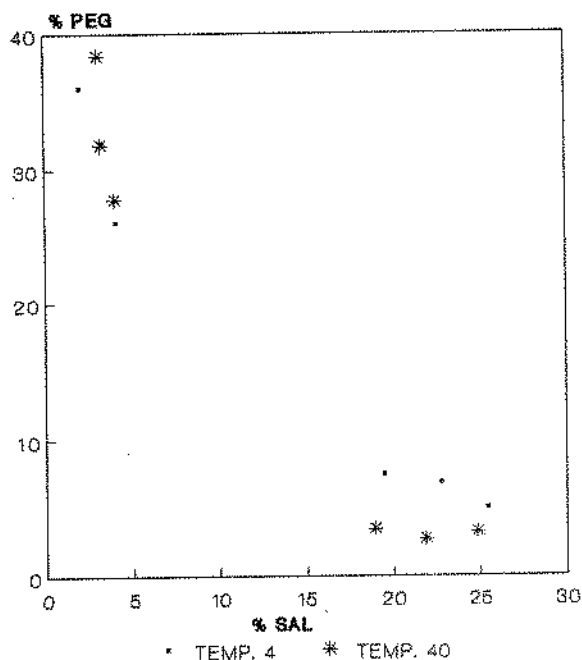


FIGURA 17. Influência da temperatura no comportamento da linha binodal

Este comportamento também é observado em sistemas PEG/dextrana por vários autores, o aumento de temperatura aumenta a região de separação, um fator interessante no caso de sistemas aquosos bifásicos (FORCINITI et alii,1991).

Relacionando agora, o comprimento das linhas de amarração com a temperatura podemos observar qual a região mais afetada por esta variável. As figuras 18 e 19 apresentam este comportamento.

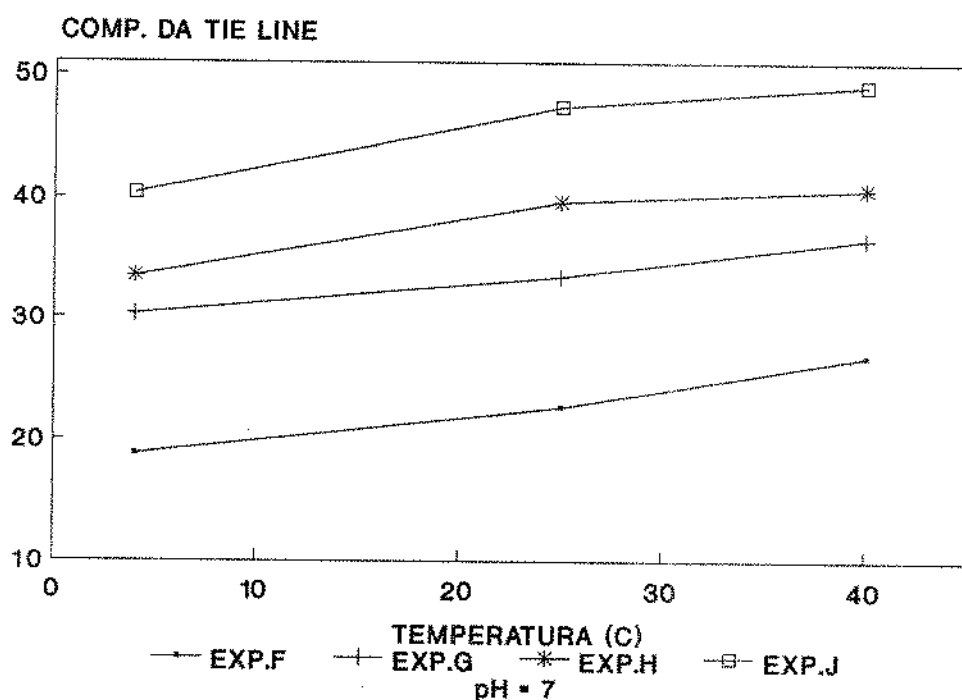


FIGURA 18 Influência da temperatura no sistema PEG 1000/fosfato de potássio a pH 7

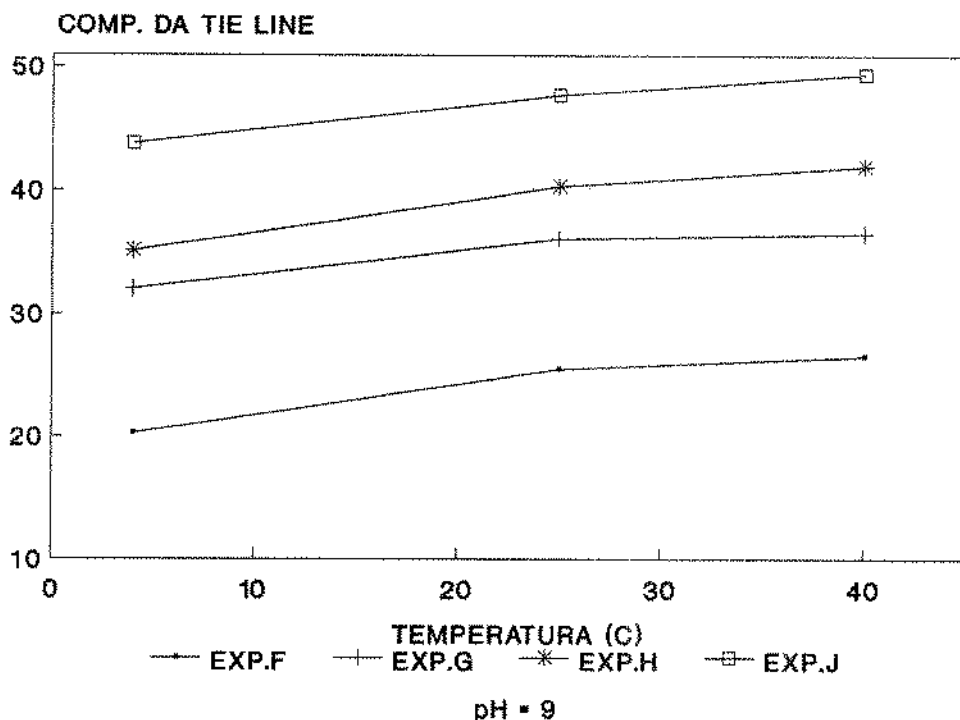


FIGURA 19. Influência da temperatura no sistema PEG 1000/fosfato de potássio a pH 9

Nota-se de acordo com as figuras acima que a temperatura tem uma influência importante no comprimento da "Tie Line", aumentando seu valor e portanto a diferença nas concentrações de polímero e sal entre as fases. Esta influência é mais pronunciada na região entre 4°C e 25 °C.

A influência da temperatura em sistemas aquosos bifásicos é pouco conhecida do ponto de vista experimental. A maioria dos autores estuda o equilíbrio nestes sistemas a temperatura ambiente

Os resultados obtidos experimentalmente confirmam as expectativas do ponto de vista da influência das variáveis sobre o sistema. O efeito do aumento do pH e da temperatura

nos sistemas PEG/dextrana apresentados na literatura, são reproduzidos aqui. Tanto para os sistemas PEG./dextrana como para PEG/sal a influência destas variáveis atua positivamente no deslocamento da região de separação.

### 3.3.3. Influência do peso molecular do polímero

A influência desta variável nos sistemas PEG/sal já é um pouco mais estudada e os resultados apresentados na literatura (ALBERTSSON, 1960 ; LEE et alii, 1990) concordam com nossas observações.

Em nosso trabalho utilizamos dois pesos moleculares do polímero, 1000 e 8000. Se compararmos dois sistemas, um PEG 8000 e outro PEG 1000 num mesmo valor de pH e temperatura, observaremos que a linha binodal mais próxima aos eixos cartesianos pertence ao polímero com peso molecular maior. Isto quer dizer que o aumento do peso molecular do polímero aumenta a região de separação do sistema. A figura 20 indica este efeito.

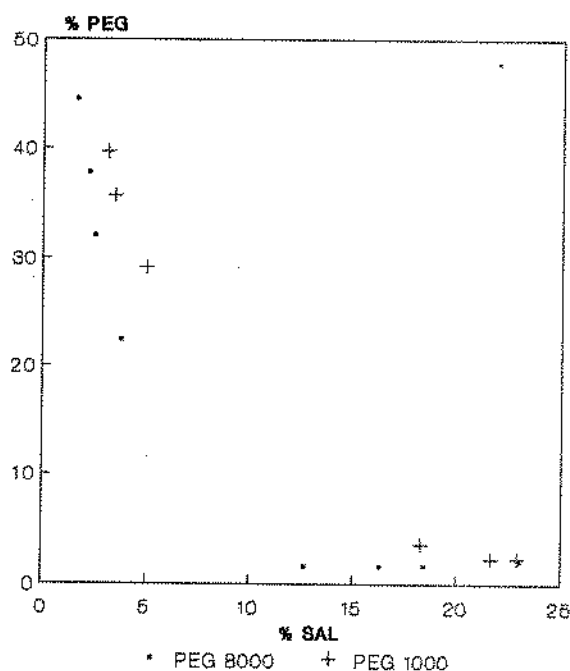


FIGURA 20. Influência do peso molecular do polímero na curva binodal.

### 3.3.4. Correlação empírica para as linhas de amarração

Existem diferentes métodos empíricos para interpolar e extrapolar linhas de amarração a partir de um conjunto limitado de dados experimentais. Na ausência de modelos termodinâmicos apropriados tais métodos podem representar um recurso útil para a simulação de processos de extração. Os principais métodos empíricos para correlacionar dados de equilíbrio foram sugeridos por Hand, Othmer & Tobias e Bachman e foram obtidos com base em dados de equilíbrio líquido-líquido para sistemas tradicionais

Estes métodos serão apresentados a seguir, para isto utilizaremos a seguinte nomenclatura adaptada ao nosso sistema:

A: PEG

S: Sal

C: Água

onde:

$X_{AA}$  = concentração de PEG na fase polimérica

$X_{SS}$  = concentração de sal na fase salina

$X_{CA}$  = concentração de água na fase polimérica

$X_{CS}$  = concentração de água na fase salina

As equações utilizadas para testar cada método estão apresentadas abaixo:

Método de HAND (1930)

$$\left( \frac{X_{CS}}{X_{SS}} \right) = K \left( \frac{X_{CA}}{X_{AA}} \right)^a \quad (18)$$

Método de Othmer e Tobias (1942)

$$\log\left(\frac{1-X_s}{X_{ss}}\right) = n \log\left(\frac{1-X_{AA}}{X_{AA}}\right) \quad (19)$$

Método de Bachman (1940)

$$X_{AA} = a + b \left( \frac{X_{AA}}{X_{ss}} \right) \quad (20)$$

A seguir apresentamos nas figuras 21, 22 e 23 os resultados obtidos para os testes de escolha de cada método.

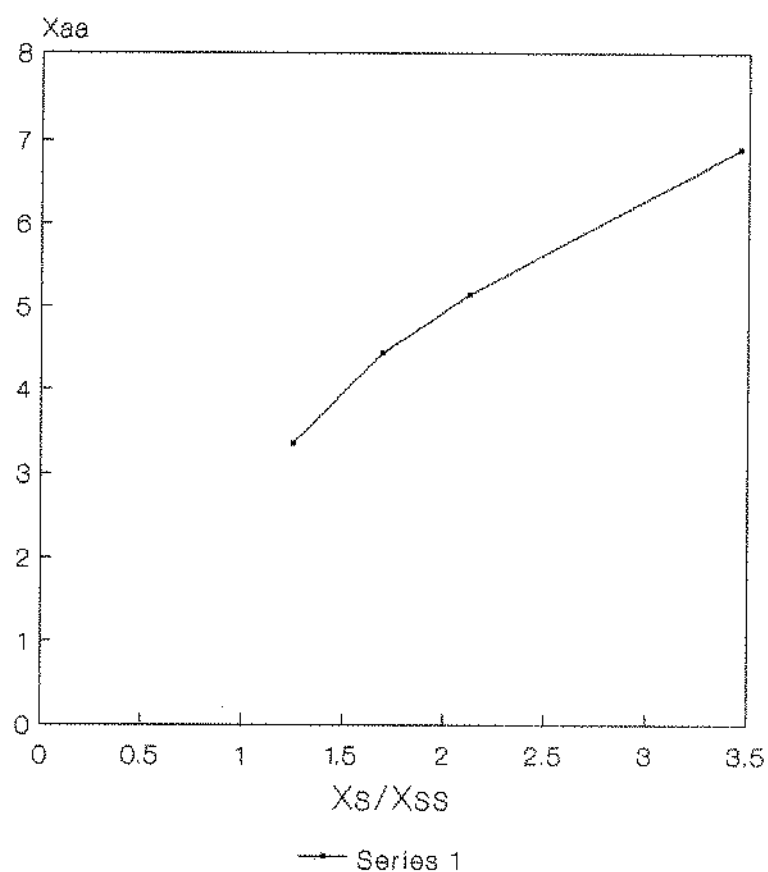


FIGURA 21 Teste do método de Othmer e Tobias para os sistemas PEG 8000/fosfato de potássio a pHs 7, 7 e 9 e temperaturas 25, 40 e 25°C respectivamente.

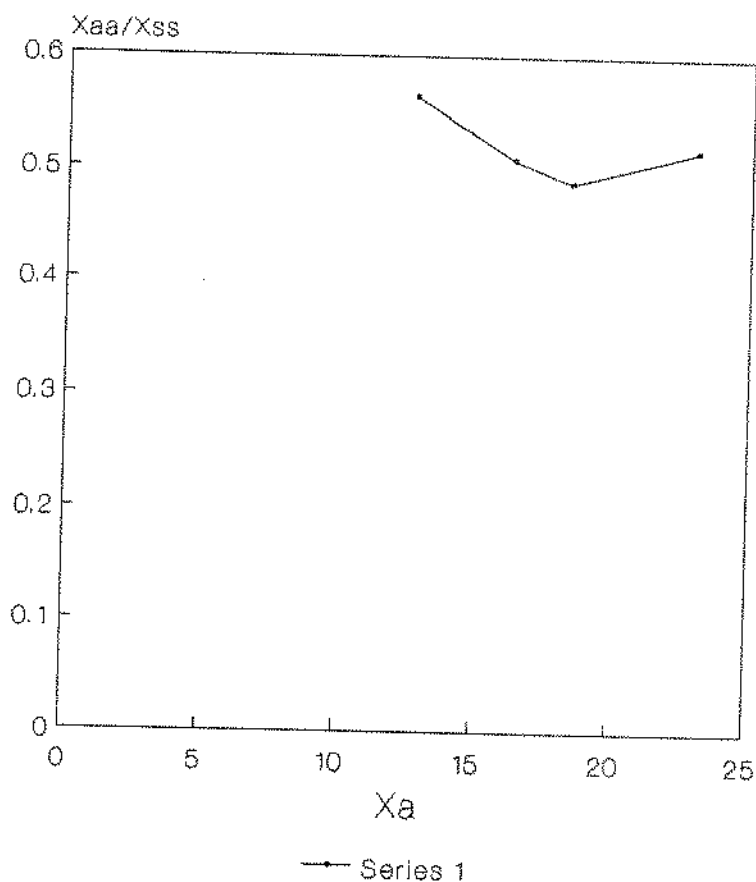


FIGURA 22 Teste do método de Bachman para para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio a pH 7, temperatura 25°C.

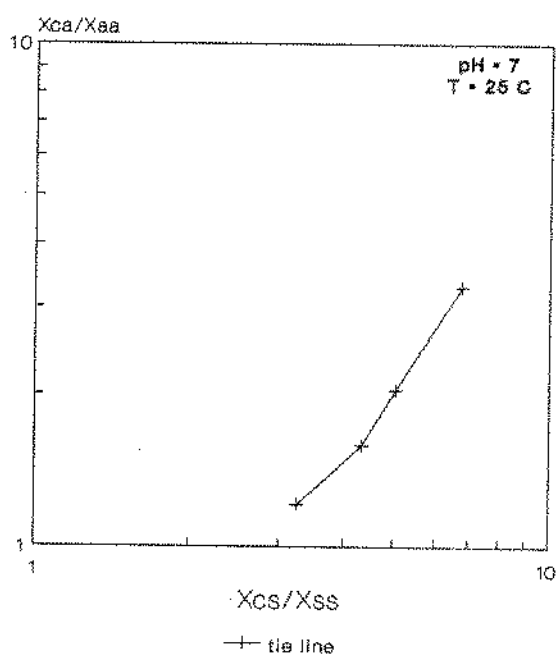


FIGURA 23 Teste do método de Hand para para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio a pH 7, temperatura 25°C.

Dos métodos empíricos analisados observamos que o que mais se adequou aos sistemas PEG/sal foi o de HAND (1930), que apresentou para o conjunto dos dados experimentais coeficientes de correlação bastante elevados. O restante dos gráficos obtidos por este método se encontram no apêndice 2.

Na tabela 10 são apresentados os parâmetros e os coeficientes de correlação obtidos para cada sistema de acordo com o método de Hand.

**TABELA 10.** Constantes obtidas pelo método de HAND para os sistemas PEG/sal

| SISTEMA  | TEMP/pH | A       | B       | CORRELAÇÃO |
|----------|---------|---------|---------|------------|
| PEG 8000 | 25/6    | 0.67372 | 2.56528 | 0.9944     |
| PEG 8000 | 25/7    | 0.7107  | 2.9719  | 0.9899     |
| PEG 8000 | 25/9    | 0.8673  | 2.9738  | 0.99060    |
| PEG 8000 | 40/6    | 0.4942  | 3.30579 | 0.99799    |
| PEG 8000 | 40/7    | 0.8881  | 3.0144  | 0.9955     |
| PEG 8000 | 40/9    | 0.8881  | 3.0144  | 0.9955     |
| PEG 8000 | 4/7     | 0.91017 | 2.09489 | 0.97193    |
| PEG 8000 | 4/9     | 0.8096  | 2.4797  | 0.9827     |
| PEG 1000 | 4/7     | 0.72642 | 1.81938 | 0.9996     |
| PEG 1000 | 4/9     | 0.5955  | 2.2201  | 0.99955    |
| PEG 1000 | 25/7    | 0.52104 | 2.32692 | 0.9915     |
| PEG 1000 | 25/9    | 0.59020 | 2.62405 | 0.9894     |
| PEG 1000 | 40/7    | 0.75794 | 2.07074 | 0.98239    |
| PEG 1000 | 40/9    | 0.72207 | 2.35246 | 0.92135    |

### 3.3.5. Coeficiente de partição

O estudo da partição de proteínas teve origem na década de 50. Albertsson fez a primeira publicação em 1958 da partição de 17 proteínas com diferentes pesos moleculares no sistema PEG/metilcelulose.

Quando a concentração de polímeros é diminuída o valor do coeficiente de partição da proteína se aproxima de 1. Em sistemas PEG/dextrana a partição é fortemente influenciada pelo peso molecular dos polímeros. O valor de  $K_p$  depende da composição iônica, do sistema de fase empregado, do pH, da concentração de polímeros e da temperatura. Em geral,  $K_p$  desvia mais da unidade em concentrações maiores de polímeros e valores de carga maior. Seu valor aumenta quanto mais distante ele estiver do ponto crítico.

A hidrofobicidade da proteína é um fator importante no caso da partição, pois as superfícies que interagem com as soluções (sistemas) diferem consideravelmente umas das outras. Por exemplo, proteínas globulares são compostas por aminoácidos polares e apolares in natura, nas conformações nativas a maioria dos grupos polares reside no interior da molécula, não tendo contato com a solução.

#### 3.3.5.1.1. Influência do pH

A partição da proteína geralmente depende do pH do sistema. A variação do valor de  $K_p$  num sistema específico e sob um dado valor de pH, é influenciado pelo comprimento iônico da proteína. A mudança de pH, muda a carga da proteína, em pHs maiores a carga é negativa e em pHs menores a carga é positiva. Quando o pH torna as cargas positivas iguais as

negativas, encontra-se o chamado ponto isoelétrico. O pH afeta a partição de diferentes formas, dependendo da proteína.

### 3.3.5.1.2. Influência da temperatura

Há em geral uma tendência no valor de  $K_p$  de proteínas em sistemas PEG/dextrana, quando menor que 1 aumenta com a temperatura. Isto pode ocorrer devido a mudança na composição das fases e a relativa solvatação das proteínas. As proteínas são bem mais resistentes a desnaturação na presença de polímeros. Isto faz com que a partição de proteínas em altas temperaturas seja possível. O efeito da temperatura ainda não foi estudado sistematicamente e a partição de proteínas abaixo de 0°C ainda é desconhecida.

Determinamos um conjunto de nove experimentos para a proteína Albumina (BSA) à diferentes valores de pH e temperatura, apresentados na tabela 11. A seguir apresentaremos nas figuras 24, 25, 26 e 27 os dados obtidos para o coeficiente de partição da proteína, comparando nossos resultados com os apresentados na literatura.

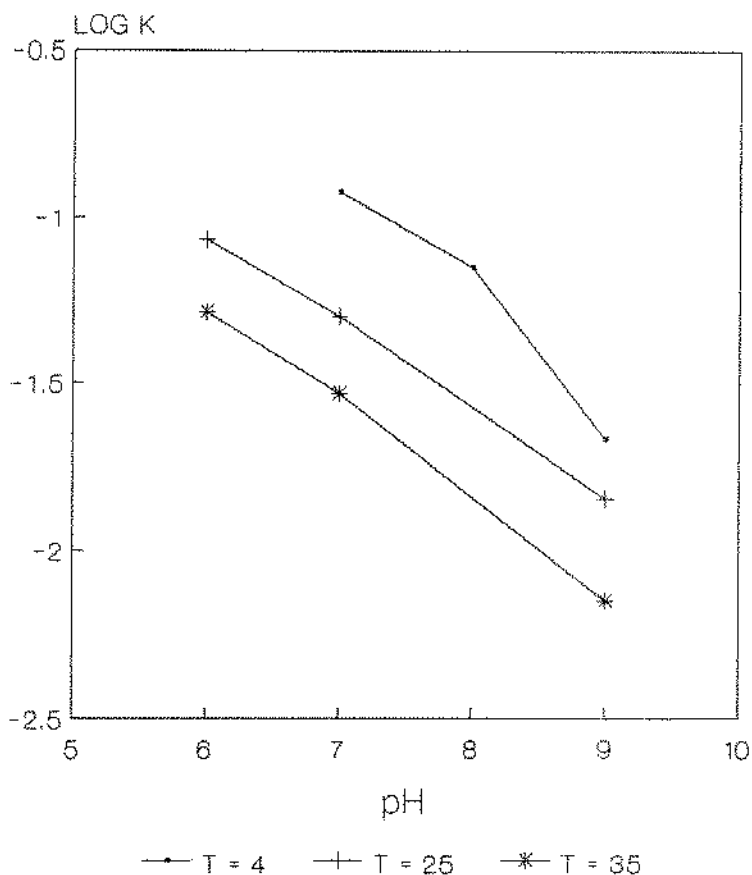
Deve-se, em primeiro lugar, destacar que os valores de  $K_p$  obtidos indicam que a BSA se concentra na fase salina. CHEN (1992) observou o mesmo comportamento para a beta lactoglobulina em sistemas PEG/fosfato, e o comportamento exatamente oposto para alfa lactoalbumina. Neste último caso o autor sugere que o efeito de "salting out" predomina na determinação do coeficiente de partição da proteína. Já para beta lactoglobulina o efeito de exclusão de volume causado pelo polímero predomina, tendendo a concentrar a proteína na fase salina. É o que se observa também em nosso caso para a BSA.

**TABELA 11.** Coeficientes de partição obtidos experimentalmente para a proteína albumina (BSA) no sistema PEG 8000/fosfato.

| Temperatura | pH | Coef. de Partição ( $10^{-2}$ ) |
|-------------|----|---------------------------------|
| 4           | 7  | 11.97                           |
| 4           | 8  | 7.06                            |
| 4           | 9  | 2.15                            |
| 25          | 6  | 8.57                            |
| 25          | 7  | 5.00                            |
| 25          | 9  | 1.43                            |
| 35          | 6  | 5.17                            |
| 35          | 7  | 2.94                            |
| 35          | 9  | 0.71                            |

Na figura 24 pode-se visualizar a influência do pH no comportamento de partição da albumina. Nota-se que a medida que a pH é aumentado, diminui o valor do coeficiente de partição. Esta influência é mais pronunciada na região de pH entre 7 e 9. . À 4°C, como já citado anteriormente, não ocorre formação de duas fases a pH 6. Por isso utilizamos valores de pH 7, 8 e 9.

Deve-se ressaltar que observamos nos vários dados de equilíbrio determinados experimentalmente na parte anterior deste trabalho, um efeito do aumento do pH que conduz ao aumento da região de separação e à diminuição da inclinação das linhas de amarração.



**FIGURA 24** Influência do pH no coeficiente de partição da proteína

Em consequência deste efeito, a diferença de concentração dos componentes nas duas fases aumenta, em particular a diferença da concentração de sal. Este efeito é bem representado através do comprimento das linhas de amarração, que aumenta com o pH.

Neste caso pode-se concluir que um dos efeitos do pH sobre a partição de proteínas se efetiva através do seu efeito sobre a concentração dos demais componentes no sistema. É o que se pode observar na figura 24, que indica que o  $K_p$  apresenta uma dependência em relação ao comprimento da linha de amarração similar a observada com relação ao pH.

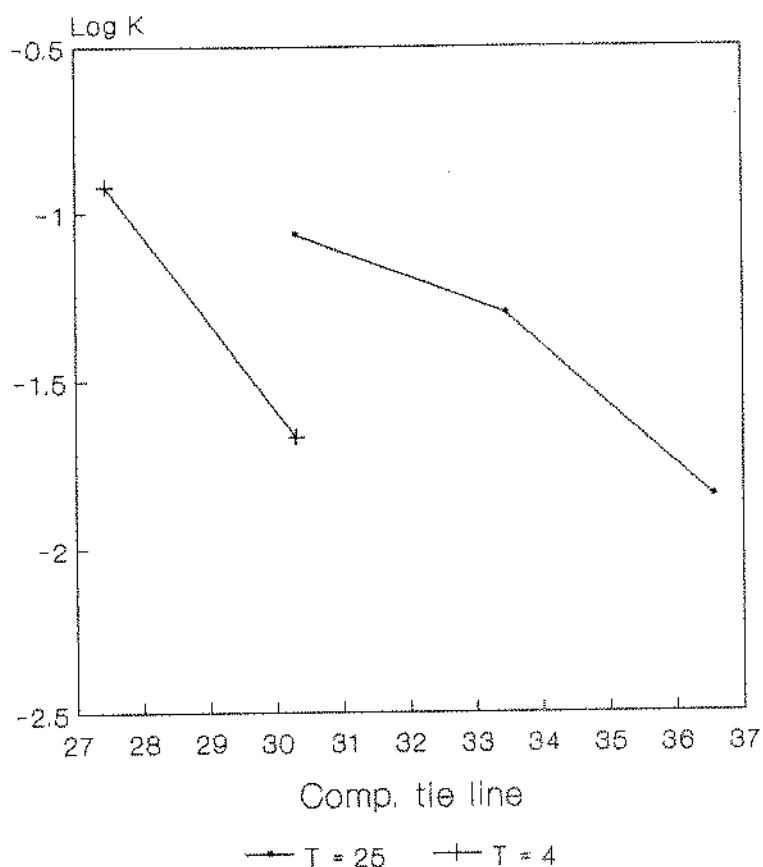


FIGURA 25. Influência do coeficiente de partição da proteína com o comprimento da "tie-line".

A temperatura é um fator importante no coeficiente de partição pois influencia diretamente seu comportamento ; sua variação altera a estrutura conformacional da proteína, modificando os valores de  $K_p$ . Em sistemas PEG/dextrana, quando o coeficiente de partição é menor que 1, ele aumenta com a temperatura (FORCINITI et alii, 1991). Em nosso sistema ocorreu justamente o contrário. O aumento da temperatura diminuiu o coeficiente de partição da proteína, indicando que

a mesma tende a se concentrar com maior intensidade na fase salina. A figura 26 representa estas informações.

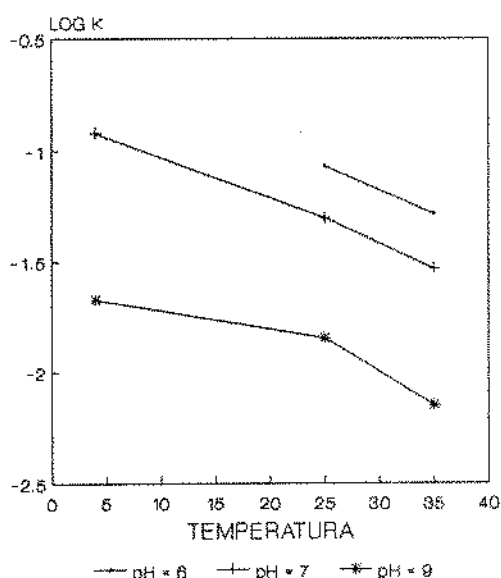
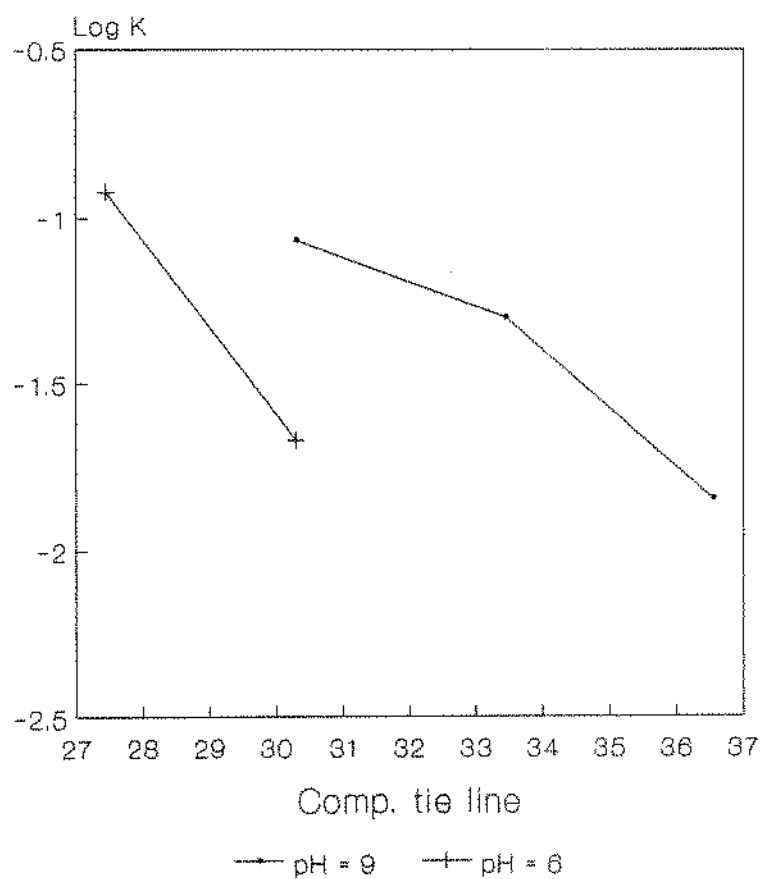


FIGURA 26. Influência da temperatura no coeficiente de partição da proteína

O efeito da temperatura pode também ser analisado por meio de sua influência na composição das fases em equilíbrio. Como visto anteriormente, a elevação da temperatura aumenta o comprimento das "tie-lines", elevando principalmente a diferença de concentração de sal entre as fases.

neste caso, a variação do coeficiente de partição da proteína deve ser bem explicado pelas alterações do comprimento das "tie lines". A figura 27 indica que este comportamento foi observado. De forma análoga ao pH, o aumento da temperatura aumenta o comprimento das "tie-lines" e reduz o  $K_p$ . Por fim, deve-se destacar que tanto o aumento da temperatura quanto o do pH facilitam a recuperação de BSA na fase salina, com concentrações cada vez maior da proteína nesta fase.



**FIGURA 27.** Influência do coeficiente de partição da proteína com o comprimento da "tie-line".

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem formalizar as seguintes conclusões:

A metodologia analítica empregada mostrou ser adequada e de fácil realização, com uma boa reprodutibilidade de resultados. A determinação da concentração de sal, por titulação e de água (ou polímero) por umidade em estufa à vácuo são técnicas simples e disponíveis em qualquer laboratório. Deste modo é uma boa alternativa às técnicas analíticas sugeridas na literatura que envolvem HPLC, liofilização, etc.

Os resultados preliminares obtidos são próximos aos apresentados na literatura para PEG 8000/fosfato de potássio a pH 8 e temperatura de 25°C. Os erros experimentais determinados de acordo com o procedimento utilizado (2.3.5) se encontram numa faixa de valores aos observados para outros sistemas PEG/sal apresentados na literatura.

O pH influencia a curva binodal, deslocando-a para concentrações menores de polímero e sal, aumentando a região de separação. Atua também no comprimento das "tie lines" mudando sua inclinação e conseqüentemente aumentando seu comprimento.

A temperatura tem uma influência maior no deslocamento da curva binodal, a medida que ela aumenta, aumenta também a região de separação. Além disso seu aumento favorece a dispersão e coalescência do sistema quando preparado.

Quanto ao coeficiente de partição, observamos que seu valor em todos os experimentos foi menor que 1, indicando

a preferência da partição pela fase salina. Apesar disto, ele diminuiu com o aumento da temperatura. Um comportamento oposto ao encontrado para sistemas PEG/dextrana

A influência do pH no coeficiente de partição da BSA é bastante forte, na região entre pH 7 e 9 esta influência é mais pronunciada.

A temperatura afeta não só a partição como também a estrutura molecular da proteína, temperaturas elevadas podem causar sua desnaturação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P.A. Partition of cell particles and macromolecules. Wiley-Interscience, New York, 1960.
- BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S. & BARONE, J.S. Química Analítica Quantitativa Elementar. Editora Edgard Blücher-UNICAMP, Campinas, 1979.
- BACHMAN, I.; Industrial Engineering Chemistry Analise, 38: Ed.12, 1940.
- BASKIR, J.N.; HATTON, T.A. & SUTER, V.W. Protein partitioning in two-phase polymer system. Biotechnology and Bioengineering, 34: 541-558, 1988.
- BAMBERGER, S.; SEAMAN, G.V.F.; BROWN, J.A. & BROOKS, D.E. The partition of sodium phosphate and sodium chloride in aqueous dextran poly (ethylene glycol) two-phase systems. Journal of Colloid and Interface Science, 99(1): 187-193, 1984.
- BUENO, S.M.A. Equilíbrio líquido-líquido de misturas ternárias água-etanol-solvente, Tese de Mestrado, FEQ-UNICAMP, 1990.
- CHELUGET, E.L.; GELINAS, S.; VERA, J.H. & WEBER, M.E. Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly (propylene glycol) with NaCl. Journal of Chemical Engineering Data, 39: 127-130, 1994.
- CHEN, J.P. Partitioning and separation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in PEG/potassium phosphate aqueous two-phase system. Journal of Fermentation and Bioengineering, 73(2): 140-147, 1992.
- COIMBRA, J.R.; THÖMMIS, J. & KULA, M.R. Continuous separation of whey proteins using aqueous two-phase systems in a graesser

contactor, 8th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Leipzig, Germany, 1993.

DIAMOND, A.D. & HSU, J. Fundamentals studies of biomolecule partitioning in aqueous two-phase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 34: 1000-1014, 1988.

FARFAN, J.A. Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia dos alimentos. Editora da UNICAMP, Campinas, 1990.

FORCINITI, D.; KULA, M.R. & HALL, C.K. Eletrostatic effects on protein partitioning: simultaneous effects of pH and polymer molecular weight. *Chemical Engineering Science*, 47: 165-175, 1992.

FORCINITI, D.; KULA, M.R. & HALL, C.K. Influence of polymer weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 61: 243-262, 1991.

FRANCO, T.T. Use of modified proteins in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity and charge, PhD Thesis - University of Reading - Inglaterra, 1992.

GREVE, A. Salz-Rezyklierung der ersten unterphase bei der proteinextraktion, Doktor-Ingenieurs Dissertation - RWTH-Aachen - Germany, 1989.

GREVE, A. & KULA, M.R. Recycling of salts in partition protein extraction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 50: 27-42, 1991.

HAND, D.B. Dimeric Distribution, *Journal Physical Chemical*, 34: 1961-2000, 1930.

HUSTEDT, H.; KRONER, K.H.; STACH, W. & KULA, M.R. Procedure for the simultaneous large-scale isolation of pullulanase and 1,4- $\alpha$

-glucan phosphorylase from *Klebsiella pneumoniae* involving liquid-liquid separations. **Biotechnology and Bioengineering**, 20: 1989-2005, 1978.

KING, R.S.; BLANCH, H.W. & PRAUSNITZ, J.M. Molecular thermodynamics of aqueous two-phase systems for bioseparations. **AIChE Journal**, 34(10): 1585-1594, 1988.

KULA, M.R.; KRONER, K.H. & HUSTED, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Advances in Biochemical Engineering**, 24: 73, 1982.

KANG, C.H. & SANDLER, S.I. A thermodynamic model for two-phase aqueous polymer systems. **Biotechnology and Bioengineering**, 32: 1158-1164, 1988.

KULA, M.R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. **Bioseparation 1**: 181-189, 1990.

LEE, X. DIAMOND, A.D. & HSU, J.T. Equilibrium phase behavior of poly ethylene glycol/potassium phosphate/water two-phase system at 4°C. **Journal of Chemical Engineering Data**, 35: 420-423, 1990.

OTHMER, D.E. & TOBIAS, P.E. **Industry Engineering Chemical**, 34: 690-693, 1942.

PEREIRA, A.J.G. **Purificação de Ácido Lático através de extração líquido-líquido**, Tese de Doutorado, FEA-UNICAMP, 1991.

SNYDER, S.M.; COLE, K.D. & SZLAG, D.C. Phase Compositions viscosities and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25°C. **Journal of Chemical Engineering Data**, 37: 266-274, 1992.

STRANGEVITCH, L. **Equilíbrio líquido-líquido em extração de aromáticos**, Tese de Mestrado, FEQ-UNICAMP, 1992.

VERNAU, J. & KULA, M.R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol - citrate phase systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 12: 397-404, 1990.

WANG, W.H., KUBOI, W.R. & KOWASAWA, I. Aqueous two-phase extraction of dehydrogenases using triazine dyes in PEG/phosphate systems. **Chemical Engineering Science**, 47(1): 113-121, 1992.

## APÊNDICE 1

TABELA 1. Composição das fases do sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 4°C, pH 7.

| Composição total do sistema (%) |       |                   | Composição fase superior (%) |       |                   | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|-------------------|------------------------------|-------|-------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | %H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | %H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 7.70                            | 13.89 | 78.41             | 3.68                         | 20.87 | 75.45             | 12.89                        | 4.43  | 82.68              |
| 9.99                            | 16.09 | 73.92             | 2.22                         | 29.57 | 68.21             | 16.63                        | 2.92  | 80.45              |
| 10.79                           | 17.88 | 71.33             | 2.01                         | 33.06 | 64.93             | 18.84                        | 4.10  | 77.06              |
| 12.29                           | 21.89 | 65.82             | 1.78                         | 38.28 | 59.94             | 24.36                        | 4.83  | 70.81              |

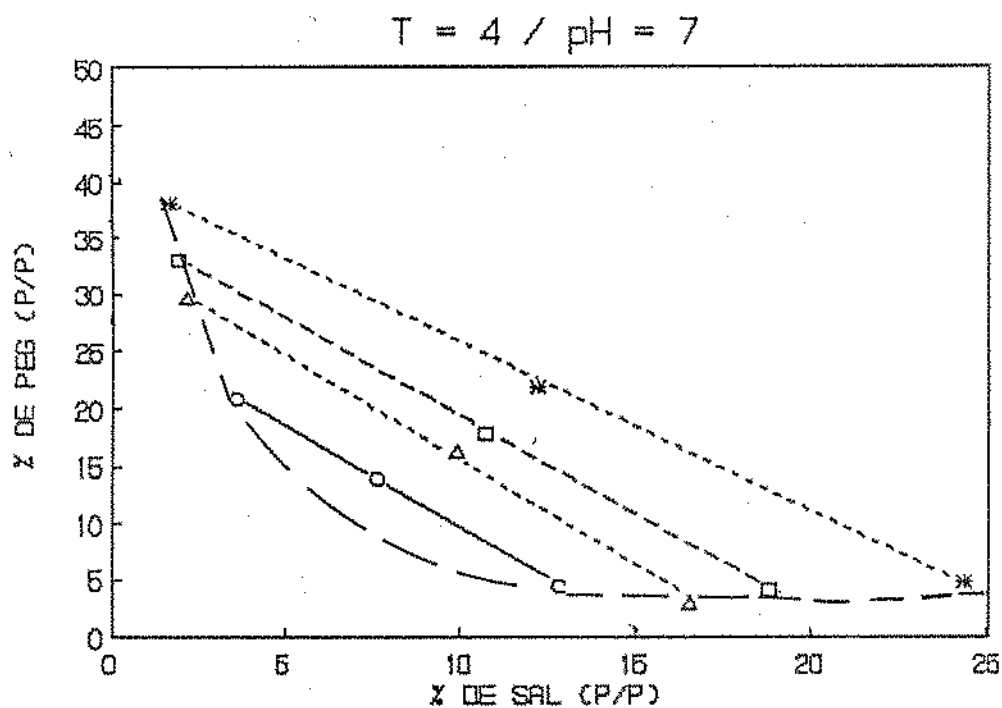


FIGURA 1. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 4°C, pH 7.

TABELA 2. Composição das fases do sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 25°C, pH 6.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 9.39                            | 16.03 | 74.58              | 3.31                         | 26.84 | 69.85              | 16.60                        | 2.82  | 80.58              |
| 10.52                           | 17.92 | 71.56              | 2.42                         | 31.66 | 65.92              | 18.43                        | 2.83  | 78.74              |
| 11.60                           | 20.00 | 68.40              | 1.97                         | 35.47 | 62.56              | 20.56                        | 2.88  | 76.56              |

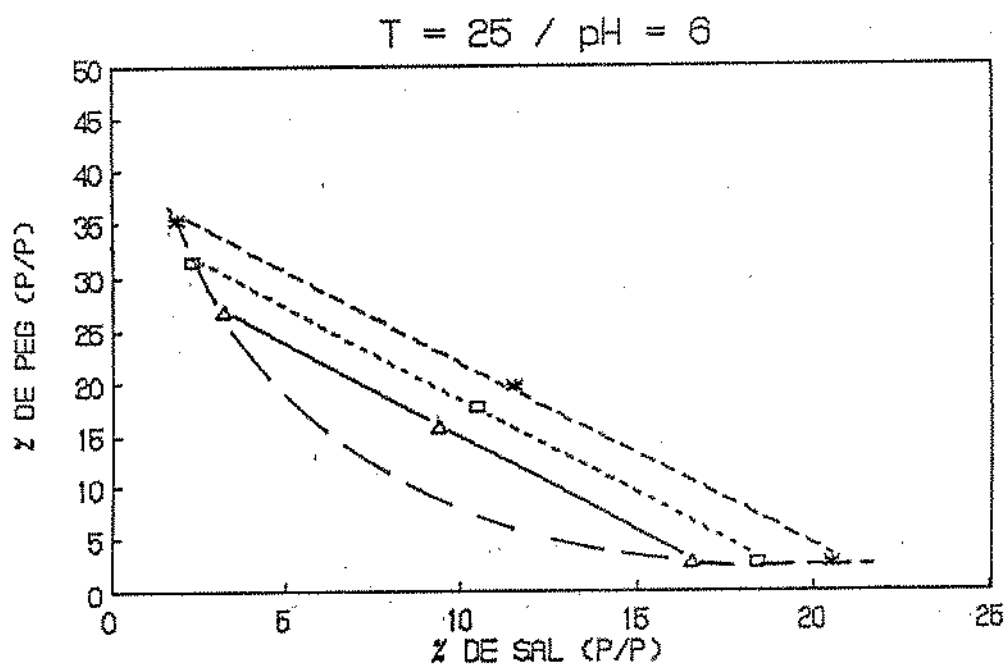


FIGURA 2. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 25°C, pH 6.

TABELA 3. Composição das fases para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 25°C, pH 9.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 7.68                            | 13.87 | 78.45              | 3.98                         | 25.97 | 70.05              | 12.45                        | 1.88  | 85.67              |
| 10.13                           | 16.07 | 73.80              | 2.65                         | 35.68 | 61.67              | 16.47                        | 2.31  | 81.22              |
| 10.79                           | 17.88 | 71.33              | 2.22                         | 38.59 | 59.19              | 18.04                        | 1.44  | 80.52              |
| 12.27                           | 21.85 | 65.88              | 1.59                         | 44.02 | 54.39              | 22.35                        | 0.98  | 76.67              |

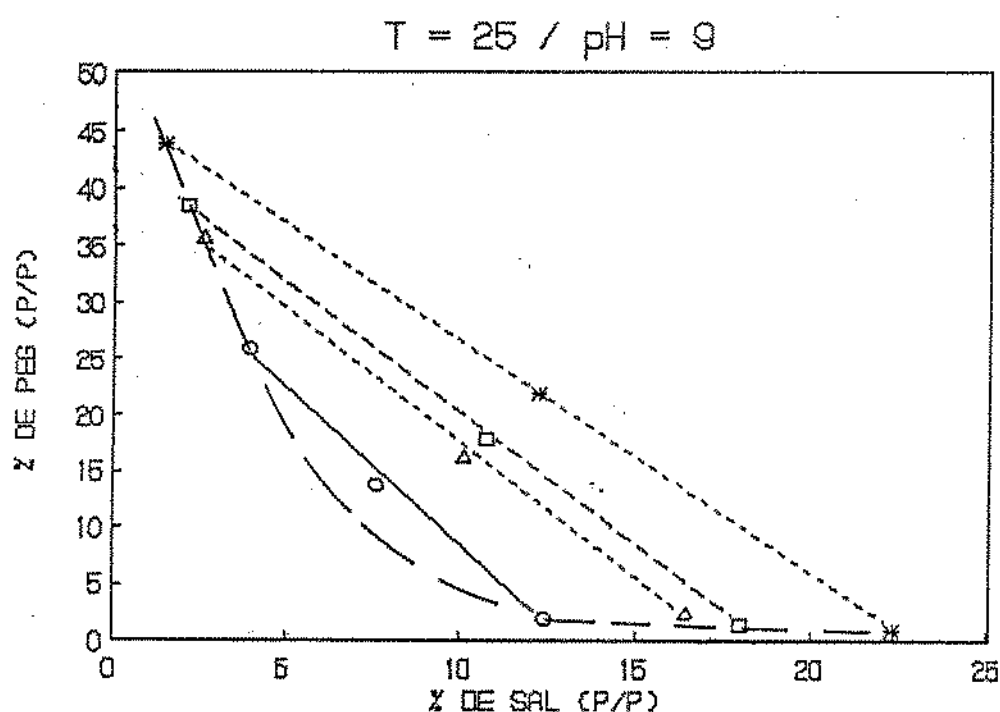


FIGURA 3. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 25°C , pH 9.

TABELA 4. Composição das fases para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 40°C, pH 7.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                   |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|-------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | %H <sub>2</sub> O |
| 7.70                            | 13.90 | 78.40              | 3.38                         | 26.70 | 69.92              | 12.41                        | 1.50  | 86.09             |
| 9.99                            | 16.10 | 73.91              | 2.64                         | 35.34 | 62.02              | 16.25                        | 1.42  | 82.33             |
| 10.74                           | 17.80 | 71.46              | 2.22                         | 38.62 | 59.16              | 17.93                        | 1.08  | 80.99             |
| 12.30                           | 21.89 | 65.81              | 1.64                         | 45.93 | 52.43              | 22.93                        | 1.62  | 75.45             |

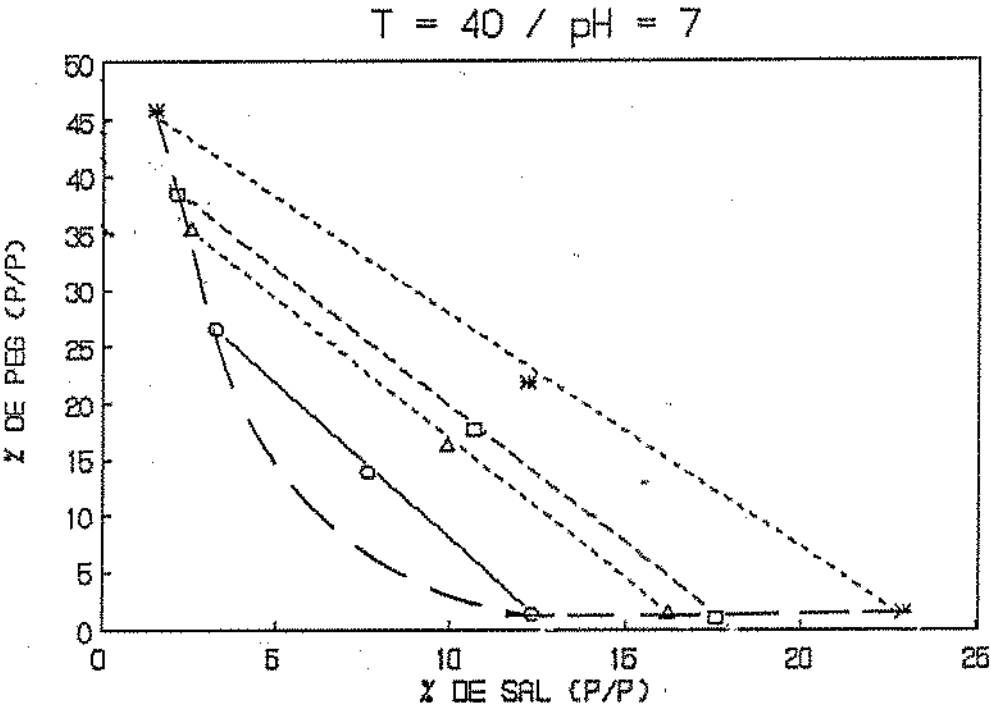


FIGURA 4. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 40°C , pH 7.

TABELA 5. Composição das fases para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio/água à 40°C , pH 9.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 8.38                            | 15.12 | 76.50              | 3.43                         | 28.65 | 67.92              | 13.13                        | 3.87  | 83.00              |
| 10.00                           | 16.10 | 73.90              | 2.42                         | 37.07 | 60.51              | 16.19                        | 3.17  | 83.81              |
| 10.79                           | 17.89 | 71.31              | 2.02                         | 41.92 | 56.06              | 18.61                        | 3.34  | 78.05              |
| 12.30                           | 21.89 | 65.81              | 1.50                         | 46.79 | 51.71              | 22.56                        | 2.05  | 75.39              |

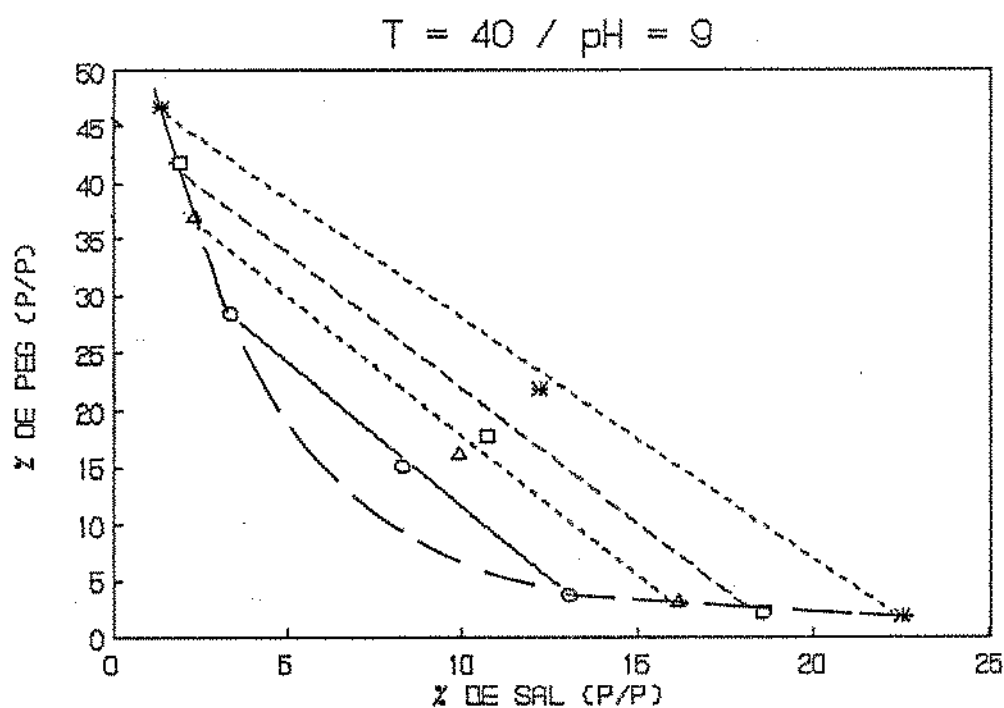


FIGURA 5. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 8000/fosfato de potássio à 40°C , pH 9.

TABELA 6. Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 4°C , pH 7.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 10.50                           | 17.90 | 71.60              | 4.08                         | 26.09 | 69.83              | 19.47                        | 7.46  | 73.07              |
| 11.39                           | 19.99 | 68.62              | 3.25                         | 32.00 | 64.75              | 22.74                        | 6.86  | 70.38              |
| 12.29                           | 21.99 | 65.72              | 2.03                         | 36.01 | 61.96              | 25.42                        | 4.99  | 69.59              |

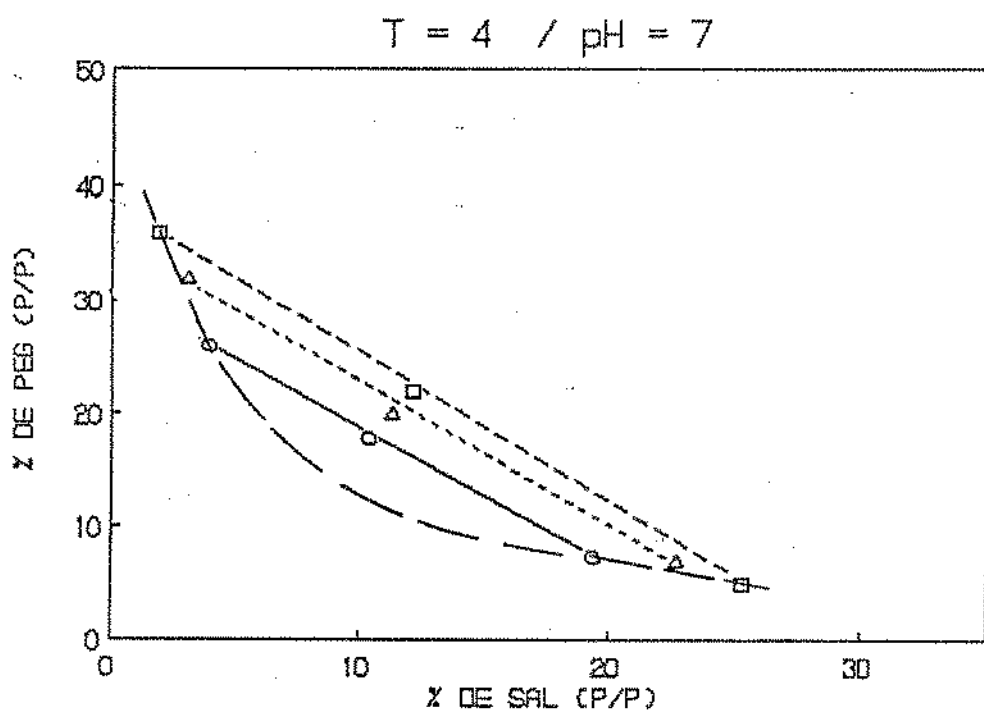


FIGURA 6. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfato de potássio à 4°C , pH 7.

TABELA 7. Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 25°C , pH 7.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 10.19                           | 17.38 | 72.43              | 4.71                         | 25.14 | 70.15              | 19.30                        | 4.65  | 76.06              |
| 11.38                           | 19.97 | 68.64              | 3.31                         | 32.78 | 63.91              | 22.10                        | 3.32  | 74.58              |
| 12.30                           | 22.00 | 65.70              | 3.00                         | 37.37 | 59.63              | 24.18                        | 4.91  | 70.91              |

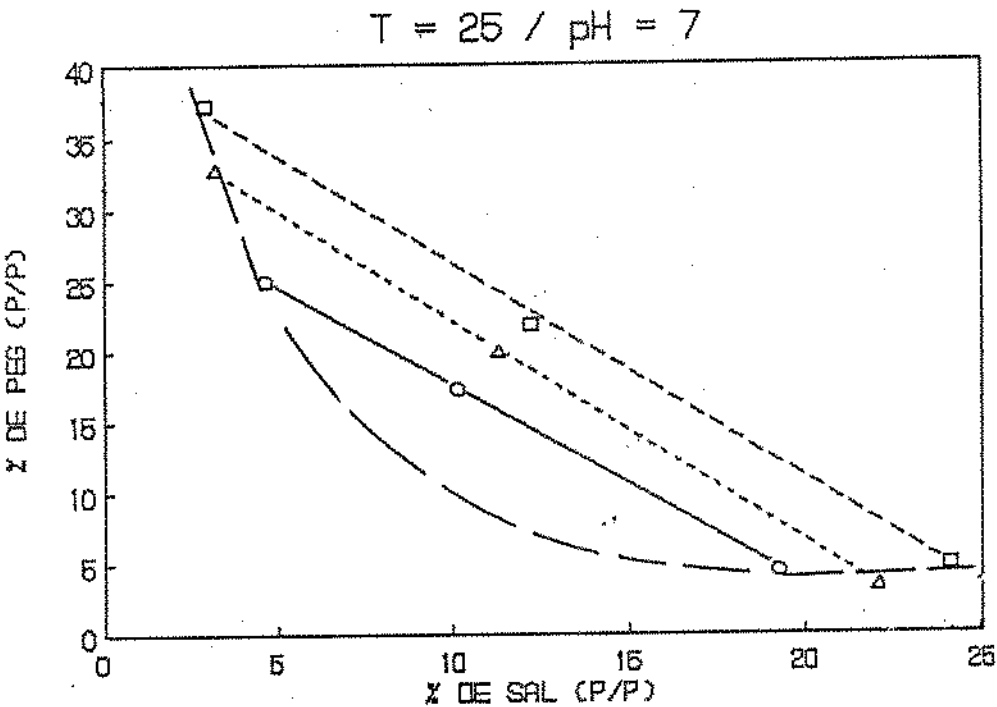


FIGURA 7. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfato de potássio à 25°C , pH 7.

TABELA 8. Composição das fases do sistema PEG 1000/fosfato de potássio/água à 40°C, pH 9.

| Composição total do sistema (%) |       |                    | Composição fase superior (%) |       |                    | Composição fase inferior (%) |       |                    |
|---------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|------------------------------|-------|--------------------|
| % SAL                           | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O | % SAL                        | % PEG | % H <sub>2</sub> O |
| 10.50                           | 17.89 | 71.61              | 5.16                         | 30.86 | 63.98              | 18.75                        | 2.96  | 78.29              |
| 11.40                           | 19.99 | 68.61              | 3.54                         | 36.73 | 59.73              | 23.55                        | 6.47  | 69.97              |
| 12.29                           | 21.99 | 65.72              | 23.67                        | 40.66 | 56.15              | 23.67                        | 0.91  | 75.42              |

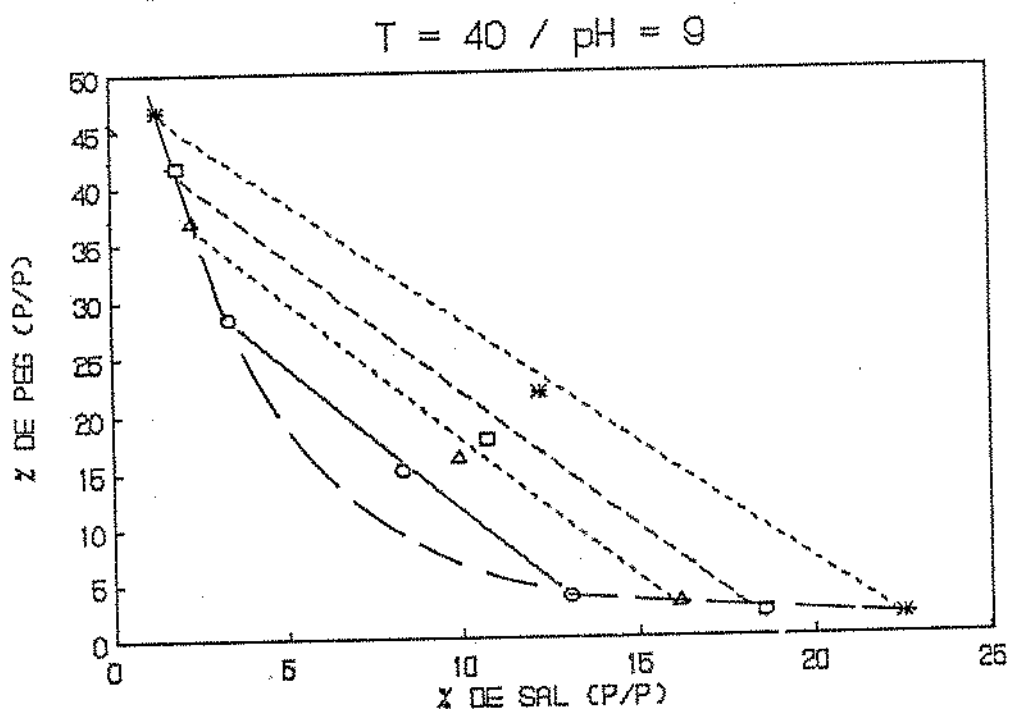


FIGURA 8. Diagrama de equilíbrio do sistema PEG 1000/fosfato de potássio à 40°C, pH 9.

APÊNDICE 2

Gráficos obtidos para os dados experimentais utilizando o método de Hand.

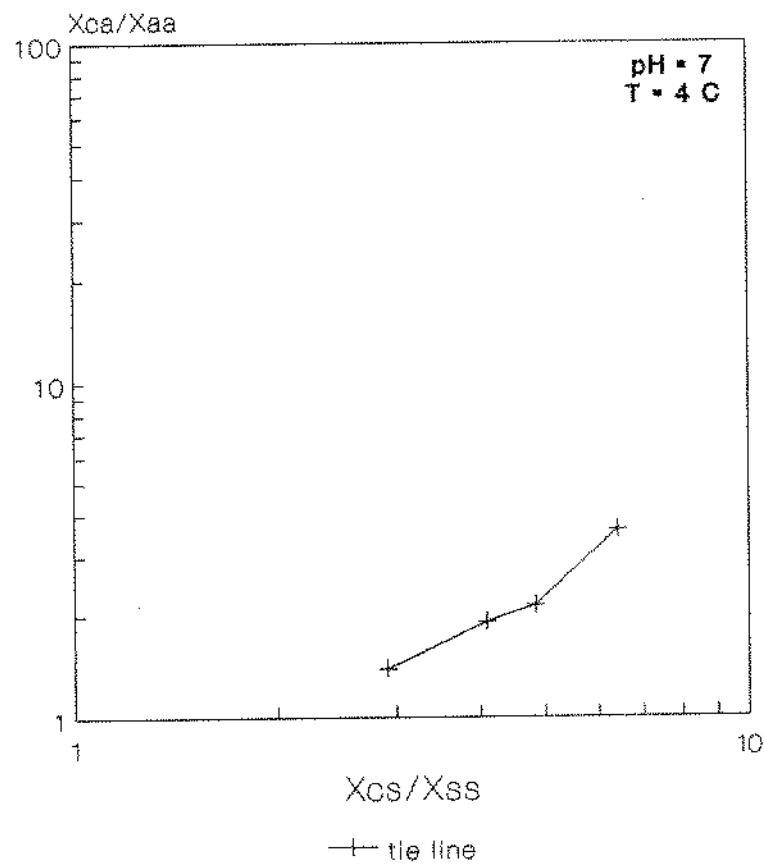


FIGURA 1. Sistema PEG 8000/fosfato de potássio pH 7, temperatura 4°C.

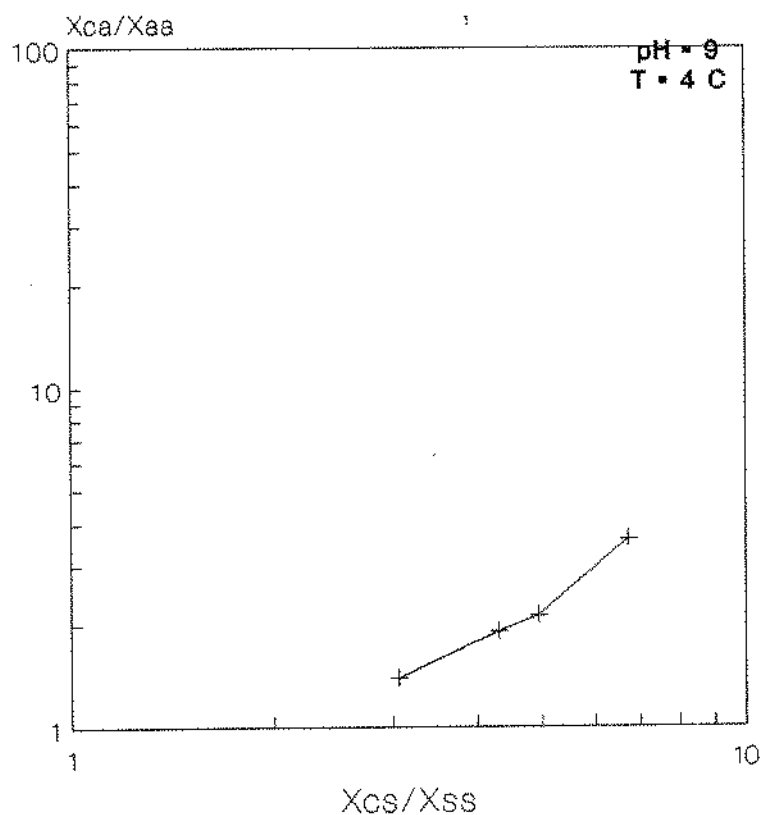


FIGURA 2. Sistema PEG 8000/fosfato de potássio pH 9, temperatura  $4^\circ\text{C}$ .

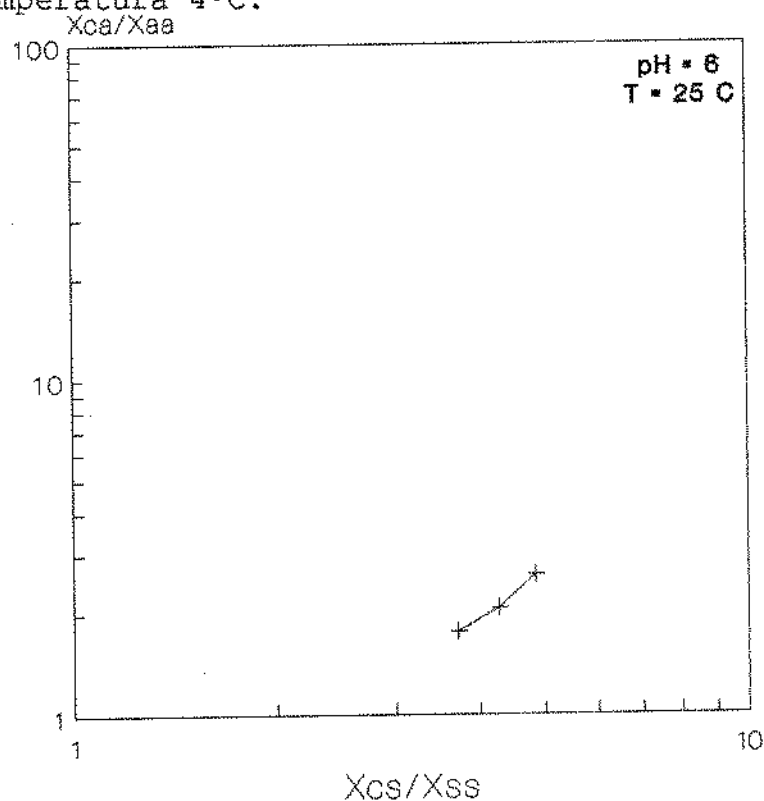


FIGURA 3. Sistema PEG 8000/fosfato de potássio pH 6, temperatura  $25^\circ\text{C}$ .

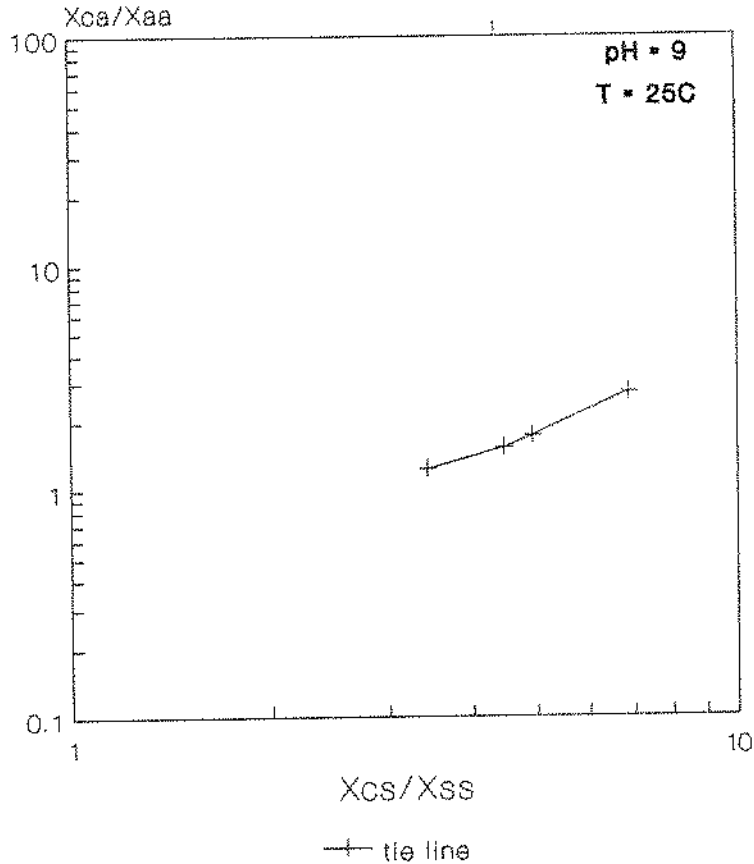


FIGURA 4. Sistema PEG 8000/fosfato de potássio pH 9, temperatura 25°C.

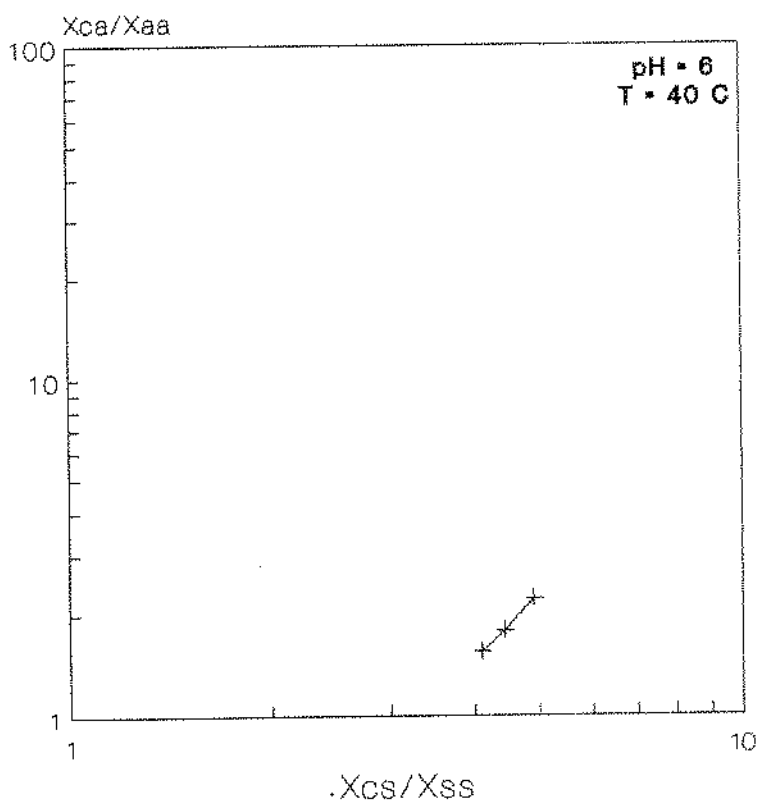


FIGURA 5. Sistema PEG 8000/fosfato de potássio pH 6, temperatura 40°C.

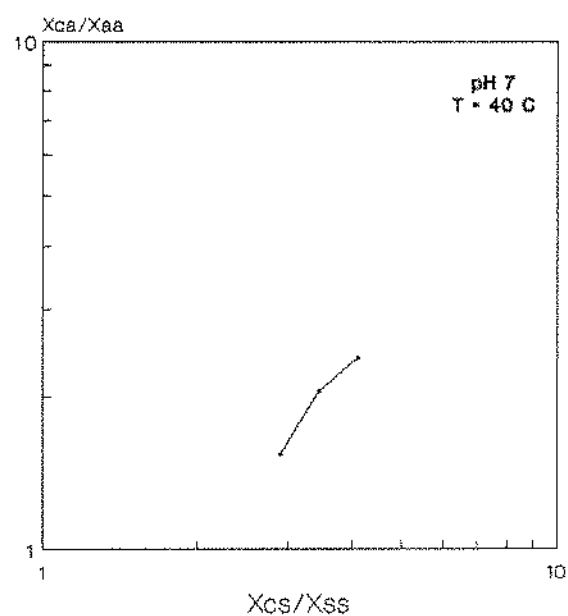


FIGURA 6 .Sistema PEG 8000/fosfato de potássio pH 7, temperatura 40°C.

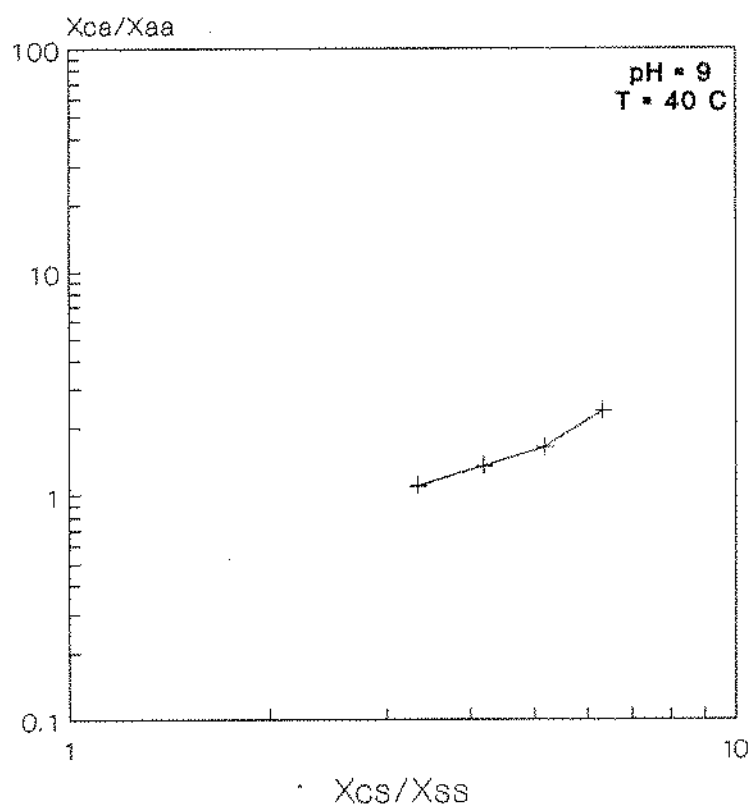


FIGURA 7 .Sistema PEG 8000/fosfato de potássio pH 9, temperatura 40°C.

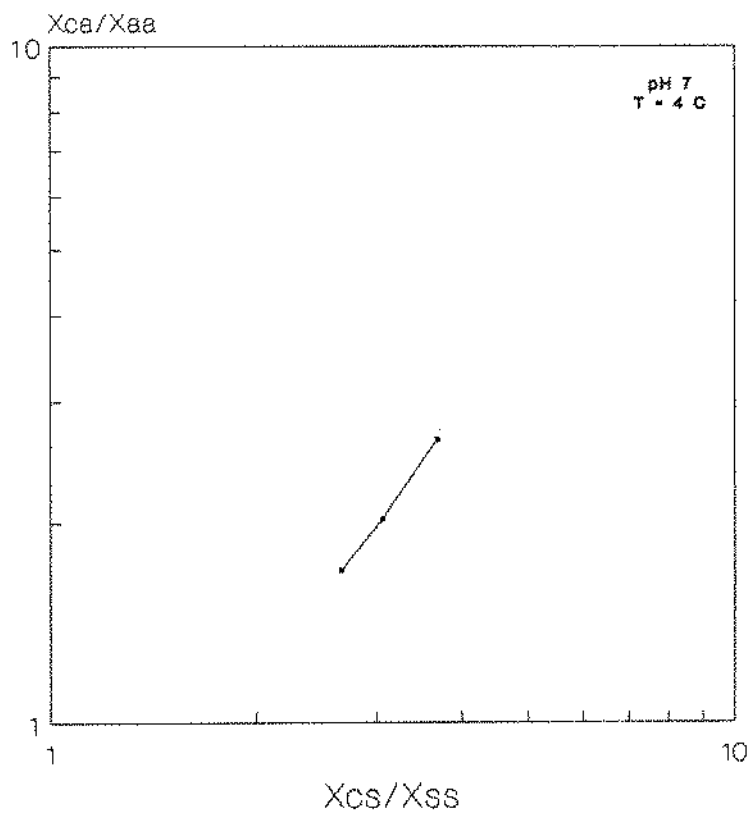


FIGURA 8 .Sistema PEG 1000/fosfato de potássio pH 7, temperatura 4°C.

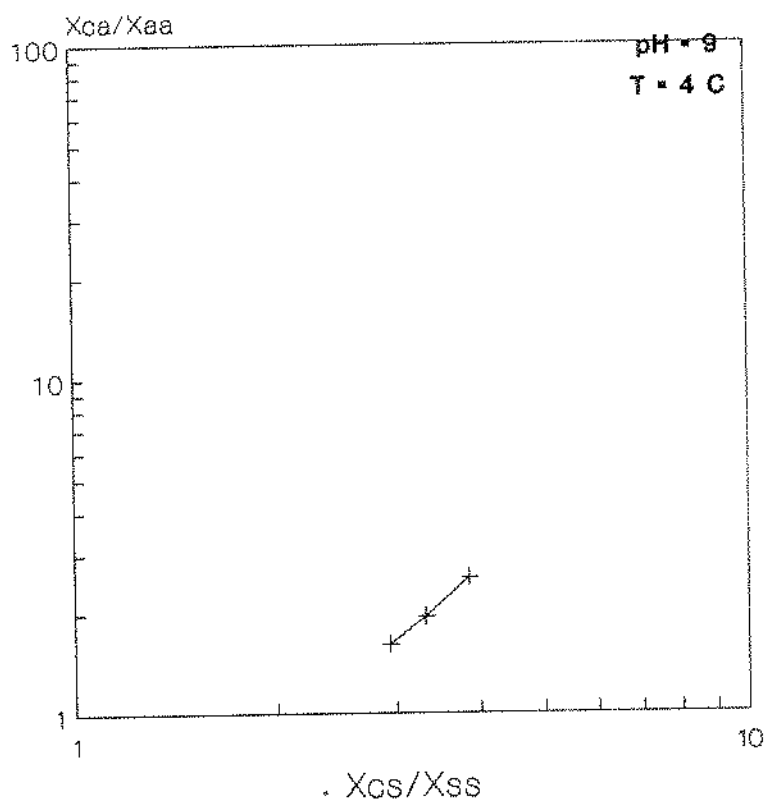


FIGURA 9 .Sistema PEG 1000/fosfato de potássio pH 9, temperatura 4°C.

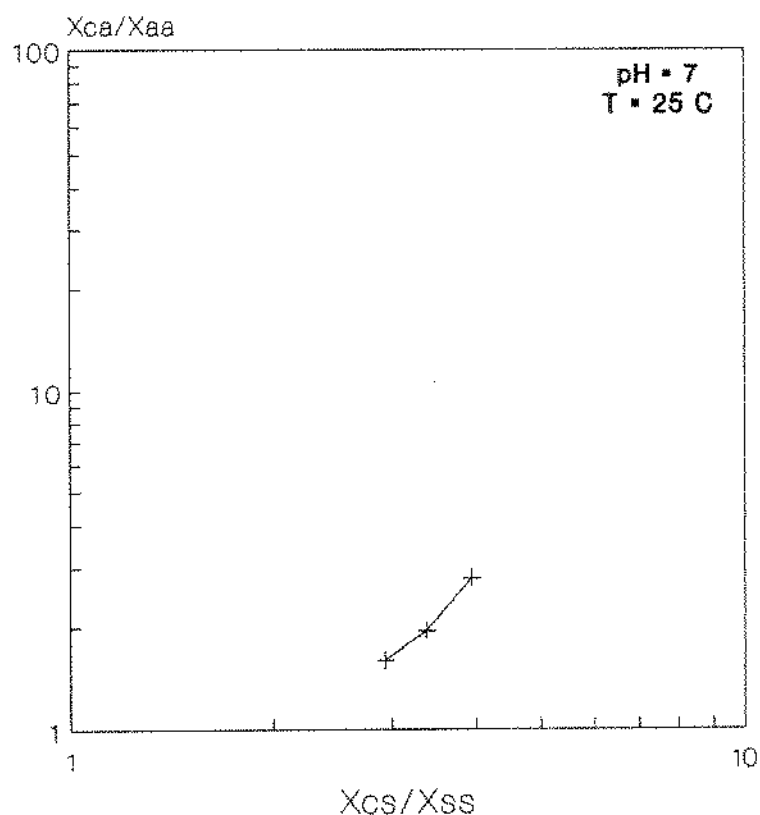


FIGURA 10 .Sistema PEG 1000/fosfato de potássio pH 7, temperatura 25°C.

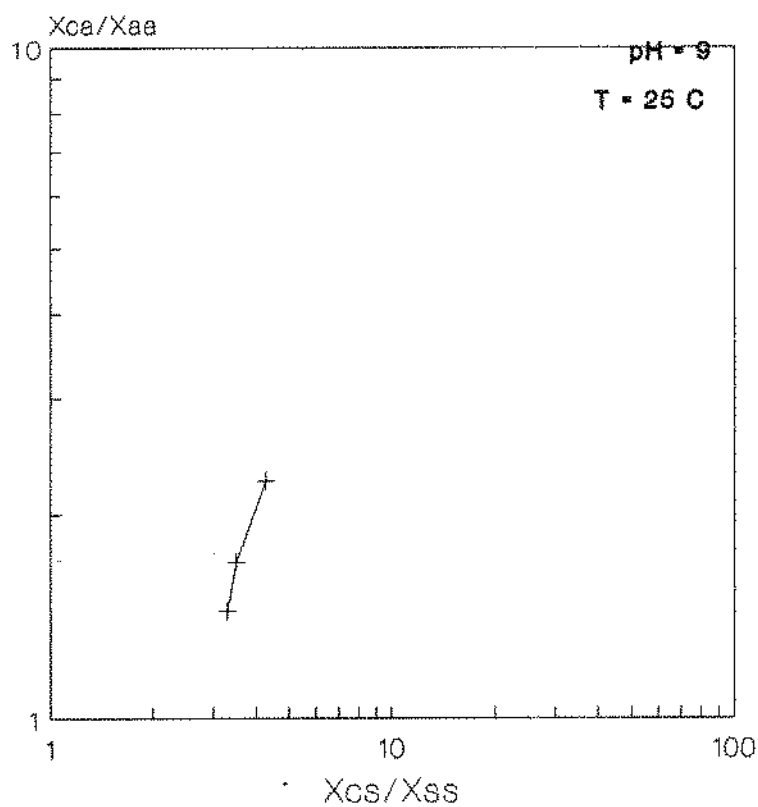


FIGURA 11 .Sistema PEG 1000/fosfato de potássio pH 9, temperatura 25°C.

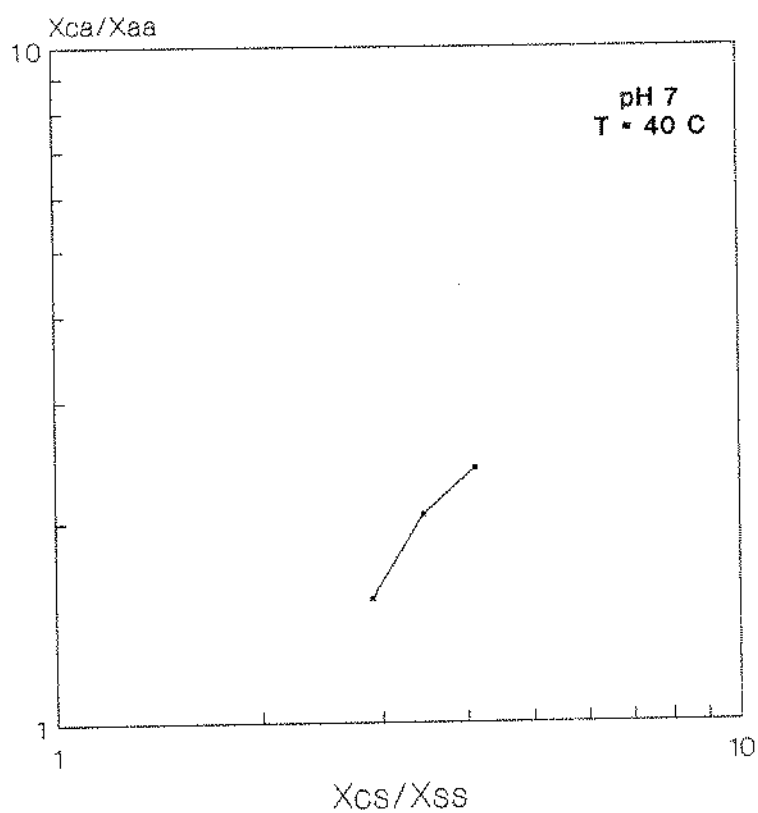


FIGURA 12. Sistema PEG 1000/fosfato de potássio pH 7, temperatura  $40^\circ\text{C}$ .

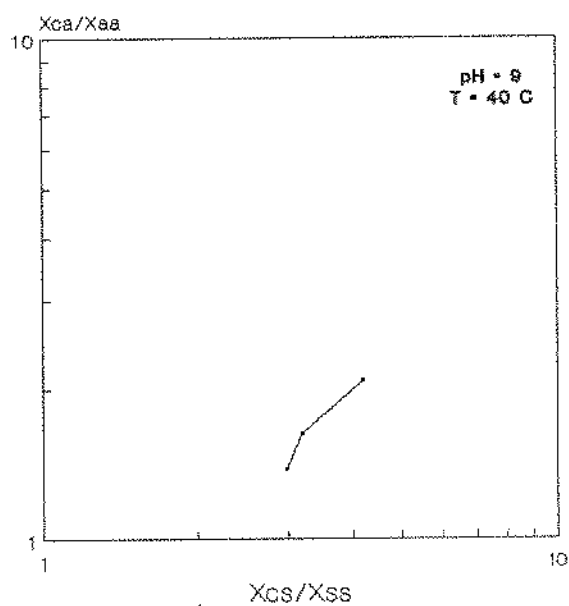


FIGURA 13. Sistema PEG 1000/fosfato de potássio pH 9, temperatura  $40^\circ\text{C}$ .