



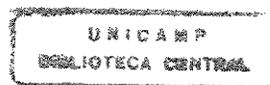
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO POLIETILENOGLICOL – GOMA DO CAJUEIRO

LUCIANA ALVES DE OLIVEIRA

Orientador : Prof Dr Elias Basile Tambourgi

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química



IDADE	BC
CHAMADA:	
Ex.	
UNGO BC/	39651
DOC.	22 9/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
RECO	R\$ 11,00
ATA	03-12-99
CPD	

CM-00137469-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

OL4c Oliveira, Luciana Alves de
Caracterização do sistema bifásico aquoso polietilenoglicol - goma do cajueiro. / Luciana Alves de Oliveira.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

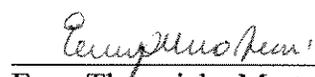
Orientador: Elias Basile Tambourgi
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Separação (Tecnologia). 2. Sistemas químicos. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Mestrado , defendida por Luciana Alves de Oliveira , em 13 de outubro de 1999 e aprovada pela comissão julgadora composta pelos Profs Drs:



Maria Alice Zarur Coelho- EQ-UFRJ



Enny Therezinha Martucci- FEA-UNICAMP



Elias Basile Tambourgi- FEQ-UNICAMP
orientador

Esta versão corresponde a redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Enga Luciana Alves de Oliveira e aprovada pela Comissão Julgadora em 13 de outubro de 1999.



Prof Dr Elias Basile Tambourgi-orientador

Dedico:

As pessoas mais importantes da minha vida

**Antônio, meu avô,
Helena, minha irmã
e Marcelo, meu irmão.**

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	06
LISTA DE ABREVIATURAS	08
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1- INTRODUÇÃO	17
2- OBJETIVOS	19
2.1- GERAL	19
2.1- ESPECÍFICOS	19
3- REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1-EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	20
3.2- SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS	20
3.2.1- Diagramas de Fases	22
3.2.2- Diagrama Termodinâmico das Fases	23
3.2.3- Fatores que Influenciam o Comportamento das Fases	24
3.2.3.1- <i>Peso Molecular dos Polímeros</i>	24
3.2.3.2- <i>Hidrofobicidade do Polímero</i>	25
3.2.3.3- <i>Temperatura</i>	26

3.2.3.4- <i>Adição de Sais</i>	26
3.2.3.4.1- Sistema Polímero/Polímero.....	26
3.2.3.4.2- Sistema Polímero/Sal.....	27
3.2.3.5- <i>Tempo de Separação das Fases</i>	28
3.2.4- Propriedades Físico-Químicas das Fases	29
3.2.4.1- <i>Viscosidade</i>	29
3.2.4.2- <i>Densidade das Fases</i>	29
3.2.4.3- <i>Tensão Interfacial</i>	29
3.2.4.4- <i>Pressão Osmótica</i>	30
3.3- PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS.	30
3.3.1- Fatores que Afetam a Partição de Biomoléculas	32
3.3.1.1- <i>Concentração dos Polímeros</i>	32
3.3.1.2- <i>Peso Molecular do Polímero</i>	33
3.3.1.3- <i>Peso Molecular da Substância Particionada</i>	33
3.3.1.4- <i>Efeitos Eletroquímicos</i>	34
3.3.1.4.1- Sistemas Polímero/Polímero.....	34
3.3.1.4.1.1- Concentrações Baixas de Sal.....	34
3.3.1.4.1.2- Concentrações Altas de Sal.....	36
3.3.1.4.2- Sistemas Polímero/Sal.....	37
3.3.1.5- <i>Interações Hidrofóbicas</i>	37
3.3.1.6- <i>Afinidade Bioespecífica</i>	38
3.3.1.7- <i>Conformação da Biomolécula</i>	38
3.3.1.8- <i>Quiralidade da Biomolécula</i>	39

3.3.1.9- <i>Temperatura</i>	39
3.4- APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	39
3.4.1- Concentração	40
3.4.2- Purificação de Biomoléculas em Larga Escala	40
3.4.3- Bioconversão	41
3.5- SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS	42
3.6- UTILIZAÇÃO DE GOMAS COMO POLÍMERO PARA SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS	45
3.7.1- Goma do Cajueiro	46
4- MATERIAS E MÉTODOS	48
4.1- MATERIAIS	48
4.1.1- Reagentes	48
4.1.2- Equipamentos	49
4.2- MÉTODOS	49
4.2.1 Purificação da goma de cajueiro	49
4.2.2- Preparo das soluções tampão	49
4.2.3- Preparo das soluções de polímeros	50
4.2.4- Preparo da solução de Tripsina	50
4.2.5- Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos	51
4.2.6- Determinação do diagrama de fases	52
4.2.7- Hidrólise do polissacarídeo	52
4.2.8- Determinação de açúcares redutores pelo método de Miller (DNSA)	52
4.2.8.1- <i>Preparo do reagente DNSA</i>	53

4.2.9- Determinação do polietileno glicol.....	53
4.2.10- Determinação do conteúdo protéico.....	53
4.2.10.1- <i>Preparação do reagente de Bradford</i>	54
4.2.11- Cálculo do coeficiente de partição.....	54
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1- DETERMINAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES.....	55
5.2- EFEITO DO PESO MOLECULAR DO PEG NO DIAGRAMA DE FASES.....	57
5.3- EFEITO DA TEMPERATURA NO DIAGRAMA DE FASES.....	59
5.4- EFEITO DO pH NO DIAGRAMA DE FASES.....	61
5.5- ESTUDOS DE PARTIÇÃO.....	63
5.6- INFLUÊNCIA DO PESO MOLECULAR DO PEG NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA.....	68
5.7- INFLUÊNCIA DO COMPRIMENTO DA "TIE-LINE" NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA.....	71
5.8- INFLUÊNCIA DO pH NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA.....	73
5.9- INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NaCl NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA.....	73
5.10- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA.....	77
5.11- ANÁLISE ECONÔMICA DO SISTEMA.....	79
6- CONCLUSÕES.....	81
7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
9- ADENDO.....	95

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido concluir esta etapa inicial em minha carreira.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, orientador científico, pelo incentivo, carinho e conhecimentos transmitidos.

A Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto da Universidade Federal Rural de Pernambuco, co-orientadora exemplar, amiga e incentivadora, a quem tanto devo pelos caminhos seguidos até hoje.

A Leonie Asfora Sarubbo, pessoa incrível, a quem muito estimo, pela grande ajuda em todas as etapas deste trabalho, pelo carinho, incentivo e paciência, minha eterna admiração.

Aos Profs. Drs. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Diretor do Laboratório de imunopatologia Keizo Asami (LIKA/Universidade Federal de Pernambuco), e José Luiz de Lima Filho, chefe do setor de Biotecnologia, pelo acesso aos laboratórios desta instituição na realização dos experimentos, pelo carinho e atenção.

As Profas. Dras. Galba Maria de Campos Takaki, Assessora de Pesquisa e Iniciação Científica da Universidade Católica de Pernambuco, e Helena Simões Duarte, Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo carinho e acesso aos laboratórios destas instituições.

A Coordenadora do Mestrado em Processos de Sistemas Químicos e Informática, Profa. Dra. Ana Frattini, pela atenção no decorrer do curso.

Ao meu amor, Givanildo Bezerra de Oliveira, pelo apoio, carinho e atenção.

A Profa. Dra. Maria Alice Zaur Coelho, pela ajuda e carinho, o meu muito obrigada.

Aos amigos e professores do LIKA Vânia, Raquel, Daniela, Artur, Claudio, Ana Idali Rita, Luciana, Daiane, Ana Paula, Paulo, Carla, Felipe, Keila, Profas. Dras. Norma Buarque Gusmão, Maria do Carmo de Barros Pimentel, e estagiários de Iniciação Científica pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos técnicos Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana, Ferreira e amigo Lucas Ferreira da Rocha pela ajuda na parte experimental deste trabalho.

Ao Ricardo Kenji Shiosaki por ter escaneado as figuras e pela paciência.

A Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos e a Juliana Nogueira Delfino Cunha Rebouças pelo fornecimento de Goma do Cajueiro.

As secretárias do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, Luciana Cosentino Acioly Rodríguez e Sônia Maria de Souza, pela paciência e atenção.

A CAPES pelo apoio financeiro no decorrer deste curso.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

PEG, P: Polietileno glicol

POLICAJU, G: Polissacarídeo da goma do cajueiro

SBA: Sistema bifásico aquoso

K : Ponto crítico

V_s : Volume da fase superior

V_i : Volume da fase inferior

d_s : Densidade da fase superior

d_i : Densidade da fase inferior

ΔG_m : Energia livre de Gibbs de mistura

ΔH_m : Entalpia de mistura

ΔS_m : Entropia de mistura

T : Temperatura

PM: Peso molecular

K : Coeficiente de partição

C_s : Concentração de equilíbrio dos compostos particionados na fase superior

C_i : Concentração de equilíbrio dos compostos particionados na fase inferior

K_{el} : Fator eletroquímico do coeficiente de partição

K_{hfob} : Fator hidrofóbico do coeficiente de partição

K_{biosp} : Fator bioespecífico do coeficiente de partição

$K_{tamanho}$: Fator do tamanho do coeficiente de partição

K_{conf} : Fator conformacional do coeficiente de partição

K° : Outros fatores do coeficiente de partição, os quais não são os fatores eletroquímico, hidrofóbico, bioespecífico, do tamanho e conformacional

$K_{ambiente}$: Fator ambiental do coeficiente de partição

$K_{estrutura}$: Fator estrutural do coeficiente de partição

λ : Parâmetro que caracteriza as fases do sistema e as interações com o composto de interesse

M : Massa molecular

K : Constantes de Boltzmann

ψ : Potencial interfacial

R: Constante dos gases

Z^+ : cargas dos cátions do sal

Z^- : cargas dos ânions do sal

F: Constante de Faraday

K_- : Coeficiente de partição dos ânion, hipoteticamente na ausência da diferença de potencial

K_+ : Coeficiente de partição dos cátion, hipoteticamente na ausência da diferença de potencial

K_0 : Coeficiente de partição da biomolécula quando $\Delta\psi=0$ ou $Z=0$

AG-UF: Arabinogalactana em grau ultra-filtrado

AG-FG: Arabinogalactana em grau alimentar

BSA: Albumina de soro bovina

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 01- Diagrama de fases Polímero Q/Polímero P.....	22
FIGURA 02- Efeito do peso molecular do Dextran no diagrama de fases PEG 6000/Dextran.....	25
FIGURA 03- Coeficiente de partição da ficoeritrina no sistema PEG 6000 4,4%/ Dextran 500 7% com 0,005M de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 a 20°C e com diferentes eletrólitos.....	35
FIGURA 04- Etapas de purificação da goma do cajueiro de acordo com o método de RINAUDO-MILLAS (1991) modificado.....	50
FIGURA 05- Diagrama de fases do sistema PEG 4000/POLICAJU (pH 7,0), para dois lotes de goma (1º lote e 2º lote) a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	55
FIGURA 06- Diagrama de fases do sistema PEG 8000/POLICAJU (pH7,0), para dois lotes de goma (1º lote e 2º lote) a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	56
FIGURA 07- Diagramas de fases dos sistemas PEG 4000/POLICAJU e PEG 4000/Dextran 500 (ZASLAVSKY, 1995). a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	57
FIGURA 08- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU e PEG 8000/Dextran T500 (ZASLAVSKY, 1995) a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	57
FIGURA 09- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 6,0 a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	58
FIGURA 10- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/ POLICAJU no pH 7,0 a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	58
FIGURA 11- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 8,0 a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$	59
FIGURA 12- Diagramas de fases do sistema PEG 8000/POLICAJU nas temperaturas $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (pH 7,0).....	60
FIGURA 13- Diagramas de fases do sistema PEG 4000/POLICAJU nas temperaturas $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (pH 7,0).....	60

FIGURA 14- Diagramas de fases do sistema PEG 1500/POLICAJU nas temperaturas $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (pH 7,0).....	61
FIGURA 15- Diagrama de fases do sistema PEG 1500/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	61
FIGURA 16- Diagrama de fases do sistema PEG 4000/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	62
FIGURA 17- Diagrama de fases do sistema PEG 8000/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	62
FIGURA 18- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/ POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	68
FIGURA 19- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	68
FIGURA 20- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	69
FIGURA 21- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/POLICAJU (pH 6,0).....	74
FIGURA 22- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/POLICAJU (pH 7,0).....	74
FIGURA 23- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/POLICAJU (pH 8,0).....	74
FIGURA 24- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU (pH 6,0).....	74
FIGURA 25- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU (pH 7,0).....	74
FIGURA 26- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU (pH 8,0).....	74
FIGURA 27- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU (pH 6,0).....	74
FIGURA 28- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU (pH 7,0).....	74

FIGURA 29- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU (pH 8,0).....	76
FIGURA 30- Influência da temperatura no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/ POLICAJU (pH 7,0).....	78
FIGURA 31- Influência da temperatura no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU (pH 7,0).....	78
FIGURA 32- Influência da temperatura no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU (pH 7,0).....	78

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 01- Sistemas bifásicos aquosos e seus componentes.....	21
TABELA 02- Bioconversão extrativa utilizando enzimas e microrganismos como catalisadores em sistemas bifásicos aquosos.....	42
TABELA 03- Classificação das gomas industriais quanto a fonte de onde são obtidas....	45
TABELA 04- Composição da goma de <i>Anacardium occidentale</i> de diferentes origens...	47
TABELA 05- Reagentes utilizados nas dosagens dos polímeros e proteína.....	48
TABELA 06- Equipamentos utilizados.....	49
TABELA 07- Soluções estoques de polímeros.....	51
TABELA 08- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 6,0.....	64
TABELA 09- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 6,0.....	64
TABELA 10- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 6,0.....	64
TABELA 11- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 7,0.....	65
TABELA 12- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 7,0.....	65
TABELA 13- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 7,0.....	65
TABELA 14- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 8,0.....	66
TABELA 15- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 8,0.....	66
TABELA 16- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/ POLICAJU a 27°C ± 2°C, pH 8,0.....	66

TABELA 17- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/ POLICAJU a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0.....	67
TABELA 18- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/ POLICAJU a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0.....	67
TABELA 19- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/ POLICAJU a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0.....	67
TABELA 20- Custo de 1 Kg de diferentes sistemas bifásicos aquosos.....	80

RESUMO

Os sistemas bifásicos aquosos têm sido largamente utilizados na pesquisa bioquímica para a separação e purificação de macromoléculas, células e partículas celulares. Nos últimos anos, os sistemas bifásicos também têm encontrado aplicações em diferentes áreas da biotecnologia, especialmente no que se refere a utilização de sistemas alternativos de baixo custo, como o sistema constituído por polissacarídeo da goma de cajueiro (POLICAJU) e polietileno glicol (PEG). O exsudato de *Anacardium occidentale* L. consiste em um polissacarídeo ácido largamente encontrado no Nordeste brasileiro, onde é empregado como substituto da goma arábica para uso farmacêutico. A goma bruta foi coletada como exsudato natural de árvores cultivadas no estado de Pernambuco. Nódulos livres de cascas foram selecionados para o processo de isolamento da goma via precipitação por etanol. Foram estabelecidos diagramas de fases para o sistema polissacarídeo da goma do cajueiro e polietileno glicol 1500, 4000 e 8000 nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 para temperaturas de 25°C e 40°C. Observou-se um deslocamento da binodal no sentido de maiores concentrações de polímeros com a diminuição do peso molecular do polietileno glicol. A faixa de pH estudada, assim como as temperaturas, não acarretaram alterações significativas na binodal. Diferentes "tie-lines" foram analisadas para a determinação do coeficiente de partição de uma proteína modelo, a tripsina. A proteína se particionou predominantemente na fase inferior rica em goma nas condições experimentais testadas. O aumento do comprimento da "tie-line" e do peso molecular do polietileno glicol provocou, de modo geral, a redução do coeficiente de partição da tripsina. O coeficiente de partição não apresentou um comportamento regular com a variação da faixa de pH estudada, temperaturas e adição de NaCl. O custo do sistema bifásico PEG/Goma do cajueiro estudado foi comparado com outros sistemas descritos na literatura. Observou-se que o sistema PEG/POLICAJU apresentou um baixo custo, o que o torna bastante atrativo para aplicações em larga escala.

ABSTRACT

Aqueous two-phase systems have found widespread use in biochemical research for separation and purification of macromolecules, cells and cell particles. In recent years the aqueous two-phase systems have also found applications in various areas of biotechnology, specially when utilising low-cost biphasic systems, as the new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum (POLICAJU) and poly(ethylene glycol) (PEG). The exsudate gum from *Anacardium occidentale* L. is a branched acidic heteropolysaccharide found in Brazilian north-western. It's employed locally as a substitute for arabic gum in pharmaceutical uses. Crude gum was collected as natural exsudate from cultivated trees in Pernambuco state. Clear nodules free of bark were selected to be isolated via ethanol precipitation. Phase diagrams were provided for cashew-nut tree gum and PEG molecular weight of 1500, 4000 and 8000 at pH 6,0, 7,0 and 8,0, for 25°C and 40°C. It was observed a displacement of the binodal for higher polymer concentrations when polyethylene glycol molecular weights decreased.. The pH range studied, as the temperatures did not promote significant alterations on the binodal. Different tie-lines were analysed for partition coefficient determination of a model protein, trypsin. The protein partitioned almost in the bottom gum-rich phase for the experimental conditions tested. The increase of the tie-line length promoted and PEG molecular weight variation, in general, a decreased of the protein partition coefficient. The partition coefficient did not show a regular tendency with the pH range studied, temperatures and NaCl addition. The cost of the PEG/Cashew nut tree gum system studied was compared to other systems described in the literature. It could be seen that the PEG/Cashew nut tree gum system showed a low cost which makes it highly attractive for large scale applications.

1- INTRODUÇÃO

No ímpeto do desenvolvimento da pesquisa no campo da bioseparação, processos alternativos têm sido estudados devido a dificuldade e complexidade no processo de "downstream" de produtos farmacêuticos e biológicos. De fato, 50% a 90% dos custos da produção para um produto biológico reside na estratégia de purificação. Existe uma necessidade de técnicas efetivas, econômicas e eficientes de bioseparação em grande escala que alcancem altos níveis de pureza e recuperação, mantendo a atividade biológica da molécula. Uma técnica de purificação que reúna estes critérios envolvidos na partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis, pode ser alcançado com a utilização de um sistema bifásico aquoso (DIAMOND & HSU, 1992).

O sistema aquoso multifásico tem sido um tópico de bastante interesse nos últimos anos e foi primeiro reportado na literatura por BEIJERINCK em 1896, observando o fenômeno que surgia quando soluções de gelatina e ágar ou gelatina e amido eram misturadas, havia a formação de uma mistura turbida que se separava em duas camadas líquidas, sendo a camada inferior rica em ágar (ou amido) e a superior rica em gelatina (BEIJERINCK, 1896, 1910).

Nesta investigação sistemática DOBRY & BOYER-KAWENOKI (1947) estudaram a miscibilidade de um grande número de pares de diferentes polímeros solúveis em solventes orgânicos. Experimentos com polímeros solúveis em água indicaram o mesmo fenômeno da separação de fases (DOBRY, 1948).

Nas décadas de 40 e 50, CRAIG & CRAIG (1956) foram os pioneiros no uso de um sistema bifásico aquoso/orgânico para purificação de proteína usando distribuição contra-corrente. Entretanto, foi em 1955 que Per-Åka Albertsson descobriu que polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água e PEG, dextran e água formavam duas fases (ALBERTSSON, 1985). Os sistemas PEG/Dextran e PEG/sal tem sido, desde então, os sistemas bifásicos aquosos mais frequentemente investigados e utilizados para purificação de biomoléculas.

Sistemas bifásicos aquosos oferecem diferentes ambientes, físico e quimicamente, que permitem a partição de solutos tais como proteínas, células, partículas celulares e ácidos nucléicos. As diferenças nas fases são pequenas, o que exclui o tratamento severo oferecido pelo sistema de extração tradicional. Por exemplo, as fases do sistema PEG/Dextran contém entre 80% a 99% de água por peso, possui tensão interfacial extremamente baixa (da ordem de 10^{-7} N/cm), e

tem mostrado que proporciona um ambiente favorável para materiais biológicos (ALBERTSSON, 1986). Estes sistemas são muito mais apropriados do que os sistemas primeiramente utilizados (solvente/água, etanol/água) por CRAIG & CRAIG (1956). Tais sistemas tem alta tensão interfacial (da ordem de 10^{-4} N/cm) e fases orgânicas contendo somente 40 a 50% de água. Essas condições acarretam sérios problemas, incluindo precipitação e desnaturação de proteínas e concentração de materiais biológicos exclusivamente na fase aquosa. Esses efeitos deletérios podem ser evitados através do uso de sistema bifásico aquoso polímero/polímero ou polímero/sal (DIAMOND & HSU, 1992).

Sistemas bifásicos aquosos com polímeros são extremamente úteis para a separação e análise de biomoléculas. Nas últimas décadas, muitos pesquisadores têm aplicado esses sistemas para separação em escala laboratorial de proteínas, células, organelas celulares, vírus, fragmentos de membrana celular e outros materiais biológicos. Vários pesquisadores têm utilizado esses sistemas como um meio para determinar as propriedades superficiais das biomoléculas, tais como carga e hidrofobicidade (ZASLAVSKY, 1995).

Com o objetivo de aplicar esses sistemas para purificação de biomoléculas em escala industrial, é necessário a caracterização e a seleção de sistemas bifásicos aquosos mais competitivos economicamente.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar um novo sistema bifásico aquoso PEG/Polissacarídeo da goma do cajueiro (POLICAJU), e estudar sua utilização na partição de uma proteína modelo, a tripsina. Estes estudos tiveram como finalidade o desenvolvimento de um novo sistema bifásico aquoso, utilizando um polímero de baixo custo, o qual reduz significativamente o custo total do processo de purificação. A goma do cajueiro se apresenta com grande potencial para este fim, uma vez que sendo um polissacarídeo abundante na região nordeste do Brasil, é de fácil processamento e não produz efluente que cause impacto ambiental por ser um produto biodegradável.

2- OBJETIVOS

2.1- GERAL

Caracterizar o sistema bifásico aquoso Polietileno glicol/Polissacarídeo da goma do cajueiro.

2.1- ESPECÍFICOS

Determinar os diagramas de fases do sistema bifásico aquoso Polietileno glicol/Polissacarídeo da goma do cajueiro:

- utilizando polietileno glicol de diferentes massas moleculares (1500, 4000 e 8000);
- em diferentes pH's (6,0, 7,0 e 8,0);
- em diferentes temperaturas (27 e 40°C).

Estudar a partição de uma proteína modelo, tripsina, no sistema bifásico aquoso Polietileno glicol/Polissacarídeo da goma do cajueiro, em diferentes condições:

- utilizando polietileno glicol de diferentes massas moleculares (1500, 4000 e 8000);
- em diferentes pH's (6,0, 7,0 e 8,0);
- em diferentes temperaturas (27 e 40°C);
- em presença de NaCl (0,1 e 1,0 M).

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1- EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A maioria das técnicas de separação utilizadas no processo bioquímico industrial para a recuperação e isolamento de enzimas, tais como filtração e centrifugação são altamente dependentes do tamanho da partícula. Os processos de separação sólido-líquido são, portanto, limitados quando células de bactérias ou resíduos celulares são processadas. Por outro lado, a crescente importância das proteínas, da tecnologia do DNA recombinante de células procarióticas e eucarióticas, tem levado ao desenvolvimento de novos e mais eficientes métodos de separação e purificação. Técnicas de recuperação de proteínas têm sido desenvolvidas baseadas na partição líquido-líquido (KULA et al., 1982; CASTRO & CABRAL, 1988). A extração líquido-líquido é um procedimento bem estabelecido em processos químicos industriais, incluindo algumas aplicações nas indústrias de fermentação tradicional, com por exemplo, a de antibióticos (HATTON, 1985). Entretanto, o uso de uma fase orgânica tem tido uma aplicação limitada no processamento de bioprodutos sensíveis, como proteínas, ácidos nucleicos e células, devido sua baixa solubilidade em solvente orgânico e o efeito desnaturante deste. Micelas reversas têm sido usadas na tentativa de superar este problema da solubilização em água e seu conteúdo na fase orgânica usando surfactantes. Entretanto, a separação de fases também pode ocorrer quando polímeros são adicionados em uma solução aquosa, como um resultado da incompatibilidade entre os mesmos (ALBERTSSON, 1986). Quando as concentrações dos polímeros excedem um certo valor, duas fases aquosas são formadas, as quais são biocompatíveis com as células e preservam a função biológica de proteínas e ácidos nucleicos com acentuada estabilidade.

3.2- SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

Quando pares de polímeros solúveis em água ou um polímero solúvel e um sal são misturados com água acima de concentrações críticas, um sistema bifásico aquoso (SBA) é formado. Uma extensa lista destes sistemas foi desenvolvida por ALBERTSSON (1986) e pode

ser analisada na TABELA 01. Os sistemas mais comumente usados são Polietileno glicol/Dextran e Polietileno glicol/sais.

TABELA 01- Sistemas bifásicos aquosos e seus componentes

Sistema Polímero/Polímero	
Polímero	Polímero
Polipropileno glicol	Metoxipolietileno glicol
	Polietileno glicol
	Álcool polivinílico
	Polivinilpirrolidina
	Hidroxiopropil dextran
Polietileno glicol	Álcool polivinílico
	Polivinilpirrolidina
	Dextran
	Ficoll
Metilcelulose	Hidroxiopropil dextran
	Dextran
Etilhidroxiethylcelulose	Dextran
Hidroxiopropil dextran	Dextran
Ficoll	Dextran
Sistema Polímero/Soluto de Baixo Peso Molecular	
Polímero	Soluto de Baixo Peso Molecular
Polipropileno glicol	Fosfato de potássio
	Glicose
	Glicerol
Polietileno glicol	Fosfato de potássio
Metoxipolietileno glicol	Fosfato de potássio
Polivinilpirrolidina	Fosfato de potássio

Cada SBA pode ser caracterizado por um único diagrama de fases, que contém a composição das fases em equilíbrio para o sistema. Os dados fundamentais para qualquer tipo de processo de extração líquido-líquido são as composições de equilíbrio das fases. No caso do SBA, um diagrama de fases é necessário para auxiliar o desenvolvimento de modelos termodinâmicos para sua predição (DIAMOND & HSU, 1992).

3.2.1- Diagramas de Fases

Numa mistura de dois polímeros e água, um sistema de duas fases se formará somente quando os constituintes estão presentes em uma certa faixa de concentrações. A composição dos constituintes em cada fase separada pode ser representada por um diagrama de fases. A FIGURA 01 mostra um diagrama para um sistema polímero P/polímero Q. A concentração do polímero P é plotada na abscissa e a concentração do polímero Q na ordenada; as concentrações são expressas como porcentagem (massa/massa). A linha curva separando as duas áreas é chamada binodal. Todas as misturas que tem composições representadas pelos pontos acima da linha são pontos de duas fases e os pontos abaixo representam uma solução homogênea (ZASLAVSKY, 1995).

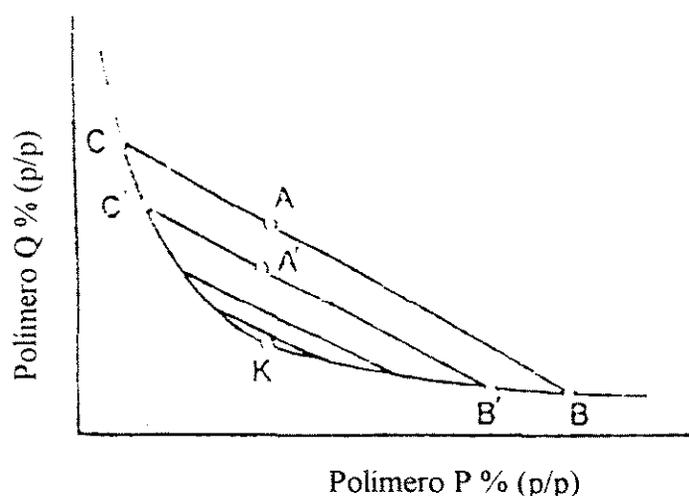


FIGURA 01- Diagrama de fases Polímero Q/Polímero P

Para descrever o SBA com mais detalhes, calcula-se as composições das duas fases que estão em equilíbrio. A composição das fases inferior e superior obtidas neste sistema será então

representada pelos pontos B e C, respectivamente. Ao mesmo tempo, o ponto A representa a composição total do sistema B e C. Pares de pontos como B e C são chamados nós e a linha que os une é conhecida como linha de amarração ("tie-line"), sendo o ponto crítico (K), o ponto na binodal em que os volumes e as composições das duas fases teoricamente tornam-se iguais (ZASLAVSKY, 1995).

ALBERTSSON (1986) deduziu a expressão para a razão entre os volumes das fases superior (s) e inferior (i):

$$\frac{V_s}{V_i} = \frac{d_i}{d_s} * \frac{AC}{AB}$$

No entanto, as densidades das duas fases não são muito diferentes da densidade da água, portanto, a razão de volumes entre as duas fases pode ser obtida aproximadamente a partir das distâncias AB e AC da "tie-line".

3.2.2- Diagrama Termodinâmico das Fases

Existem dois pontos de vista importantes na força motriz da separação de fases do sistema bifásico aquoso polímero/polímero. De um lado tem sido utilizada a teoria desenvolvida por FLORY (1941) e HUGGINS (1941) para descrever a termodinâmica que leva a separação das fases. O caminho mais simples para discutir suas hipóteses é primeiro apresentado na expressão geral da energia livre de Gibbs de mistura a pressão e a temperatura constante:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

onde ΔG_m , ΔH_m , ΔS_m e T referem-se a energia livre de Gibbs de mistura, a entalpia de mistura, entropia de mistura e temperatura, respectivamente. Se ΔG_m é negativo, quando os dois polímeros são misturados com água, uma solução resultará sem separação de fases. Se ΔG_m é positivo, a separação das fases ocorrerá. A teoria de Flory-Huggins sugere que se as concentrações das

soluções de polímeros são baixas, existirá apenas um pequeno ganho na entropia na mistura dos polímeros em água. Entretanto, desde que a cadeia do polímero tem uma área superficial muito maior do que os compostos de baixo peso molecular, as interações entre os segmentos das duas moléculas de polímeros, que são geralmente desfavoráveis, levará a um ΔH_m positivo que dominará o ΔG_m da expressão (FLORY, 1953). O ΔG_m positivo resultará na separação das fases. Portanto, pode-se concluir que pelo uso da teoria de Flory-Huggins, a água não possui um papel importante na separação das fases, e sim apenas as interações dos polímeros.

Por outro lado, ZASLAVSKY e colaboradores (1989) têm defendido que a estrutura da água também deve ser considerada quando discutida a separação das fases. Suas razões são baseadas nas propriedades físico-químicas da água (tempo de relaxamento dielétrico, constante dielétrica, afinidade relativa da água para o grupo CH_2 e polaridade total) nas fases dos sistemas, as quais foram diferentes. Além disso, eles basearam-se no fato de que alterando diferentes fatores (temperatura, solventes orgânicos, sais inorgânicos) efeitos similares são produzidos no comportamento do diagrama do SBA. O único ponto que esses fatores têm em comum é afetar a estrutura da água.

3.2.3- Fatores que Influenciam o Comportamento das Fases

O diagrama de fases pode ser influenciado por muitos fatores incluindo peso molecular do polímero, temperatura, sal e pH, embora os efeitos e mecanismos pelo qual estes influenciam a separação das fases não estejam completamente elucidados (DIAMOND & HSU, 1992).

3.2.3.1- *Peso Molecular dos Polímeros*

Na FIGURA 02 o efeito do peso molecular do dextran no diagrama de fases PEG/Dextran é mostrado. Com o aumento do peso molecular do dextran, necessita-se de uma menor concentração deste polímero para ocorrer a separação das fases. Em geral, o aumento do peso molecular diminui a concentração de polímero necessária para separação das fases, e quanto maior

a diferença no peso molecular entre os dois polímeros mais assimétrica é a binodal (ZASLAVSKY, 1995).

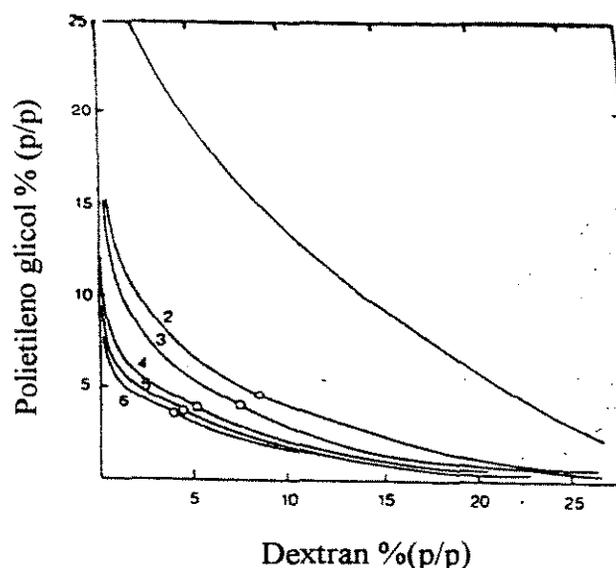


FIGURA 02- Efeito do peso molecular do dextran no diagrama de fases PEG 6000/Dextran

1 D5 (PM = 3.400); 2 D17 (PM = 30.000); 3 D24 (PM = 40.500); 4 D37 (PM = 179.000); 5 D48 (PM = 460.000); 6 D68 (PM = 2.200.000)

3.2.3.2- Hidrofobicidade do Polímero

Organizando-se as soluções de polímeros em uma escala de hidrofobicidade, ALBERTSSON (1986) obteve a seguinte sequência: sulfato de dextran < carboximetildextran < dextran < hidroxipropildextran < metilcelulose < álcool polivinílico < polietileno glicol < polipropileno glicol. Se todas essas soluções contêm principalmente água, elas deverão cair em uma faixa estreita desta escala. O ponto principal é que temos um número de líquidos imiscíveis que estão todos muito próximos uns dos outros. Isto significa que as fases dos sistemas formados por estes solventes devem ser seletivas em separar substâncias que estejam próximas a elas na escala, com o mesmo conteúdo de água como solvente, como por exemplo, biomoléculas.

Um sistema bastante analisado para a diferença da hidrofobicidade entre dois polímeros é o polietileno glicol/hidroxipropildextran. Foram testados três hidroxipropildextranos de diferentes graus de substituição, número de grupos hidroxipropil, com o peso molecular da mesma ordem de

grandeza. O polietileno glicol forma duas fases com dextran ou com o hidroxipropildextrano com o menor grau de substituição, mas não com os outros dois hidroxipropildextrano com maiores conteúdos de hidroxipropil. Assim, quanto maior o número de grupos hidrofóbicos na estrutura do dextran, mais compatível será o polímero com o PEG. Usualmente pode-se correlacionar uma certa diferença na hidrofobicidade entre dois polímeros com suas tendências para separação das fases, ou seja, quanto maior é a diferença de hidrofobicidade entre dois polímeros, menor a concentração de polímeros necessária para separação das fases (ALBERTSSON, 1986).

3.2.3.3- *Temperatura*

O diagrama de fases do sistema depende da temperatura. Entretanto, o efeito da temperatura é muito diferente dependendo do tipo de polímero usado. Por exemplo, um sistema PEG/fosfato de potássio (PEG/sal) formará duas fases em temperaturas mais altas mais facilmente, ou seja, uma menor concentração de polímero ou sal será necessária para separação das fases. Pelo contrário, o sistema PEG/Dextran (polímero/polímero) forma fases mais facilmente a temperaturas mais baixas, enquanto o sistema metilcelulose/Dextran não é muito afetado pela temperatura (DIAMOND & HSU, 1992; ZASLAVSKY, 1995).

3.2.3.4- *Adição de Sais.*

3.2.3.4.1- Sistema Polímero/Polímero

Os sistemas contendo polímeros não iônicos, como o polietileno glicol e o dextran, praticamente não são afetados pela adição de baixas concentrações de NaCl (0,1-1,0 M). Apenas para elevadas concentrações de sal é que se observa algum efeito no diagrama de fases. Pelo contrário, a separação das fases em misturas contendo um polímero carregado (polieletrólito) depende fortemente da força iônica e do tipo dos íons presentes (ZASLAVSKY, 1995).

Aparentemente, polieletrólitos permitem a construção de um grande número de SBA com propriedades bem diferentes, o que favorece o aumento da possibilidade de mudanças desejáveis nas fases dos sistemas para o propósito do fracionamento. Isto deve ser limitado, pois os polieletrólitos usualmente interagem mais fortemente com o material biológico do que o polímero não iônico. Assim, existe uma maior chance de se obter complexos de formação irreversíveis entre a proteína ou parte da célula e o polímero quando um polieletrólito é usado no lugar do polímero não iônico, embora, estas interações, geralmente sejam inibidas a elevadas concentrações de sal (ZASLAVSKY, 1995).

3.2.3.4.2- Sistema Polímero/Sal

Soluções salinas com polietileno glicol acima de concentrações críticas formam sistemas bifásicos aquosos. Quanto maior a carga do ânion mais baixa a concentração de sal necessária para que ocorra a separação das fases. Assim, os sais de ânions multivalentes, como o fosfato, são mais eficazes para formar sistemas de duas fases aquosas do que os sais de ânions monovalentes, como a hidroxila ($\text{PO}_4^{-3} > \text{citrato} > \text{SO}_4^{-2} > \text{OH}^-$). Relativamente aos cátions, a tendência para formar duas fases segue a ordem $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{ZnSO}_4 > \text{Li}_2\text{SO}_4$. Contudo, a contribuição do ânion para a eficácia de um determinado sal em promover a separação das fases é muito mais importante do que a contribuição do cátion, isto é, a alteração do cátion do sal tem menos influência no diagrama de fases do que a alteração do ânion (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1986).

Os modelos para correlacionar e prever o equilíbrio líquido-líquido em sistemas bifásicos aquosos são importantes para fundamentar a engenharia de tais processos de extração. Entretanto, desenvolver tais modelos requer informação quantitativa das fases em equilíbrio em sistemas bem definidos. Todavia, resultados experimentais para o equilíbrio de fases em sistemas modelos bem definidos são ainda raramente avaliados na literatura. Portanto, a modelagem para correlacionar e prever a partição de biomateriais está longe de ser adequada para aplicações industriais (GROßMANN et al., 1998).

Os trabalhos para modelagem de soluto (proteínas, pequenos peptídeos e aminoácidos) em sistemas de duas fases aquosas, polímero-polímero, estão divididos em duas classes:

- 1- teorias de Flory-Huggins (BASKIR, 1988; DIAMOND & HSU, 1989; GROßMANN et al., 1998; GROßMANN et al., 1997; TINTINGER et al., 1997 e ZASLAVSKY, 1995)
- 2- expansões do virial (FORCINITI & HALL, 1990; SEBASTIÃO et al., 1997 e ZASLAVSKY, 1995).

3.2.3.5- *Tempo de Separação das Fases*

O tempo requerido para que as fases separem-se varia consideravelmente para diferentes sistemas. Isto depende da diferença na densidade entre as duas fases e suas viscosidades, mas também do tempo necessário para, pequenas gotículas, formadas durante a agitação, coalesçam em gotas maiores. Perto do ponto crítico a diferença da densidade é pequena e o tempo de separação é grande. Longe do ponto crítico, a concentração de polímeros e a viscosidade são altas, o que torna o tempo de separação também longo para estes sistemas. Assim, para composições intermediárias, o tempo de separação é menor (ALBERTSSON, 1986).

Em um dado sistema, o tempo de separação também depende da relação dos volumes das duas fases se estes têm viscosidades diferentes. Se a fase mais viscosa é maior em volume do que a outra fase, o tempo de separação é maior do que se a fase mais viscosa tem um volume semelhante ou menor do que a outra fase. Os sistemas PEG/sal e PEG/Dextran têm um tempo de separação pequeno (5-30 minutos) enquanto os sistemas Ficoll/Dextran ou Metilcelulose/Dextran usualmente têm um tempo de separação maior (1-6 horas). Esses tempos dados são os necessários para o volume principal das fases separar, ou seja, até que uma interface horizontal tenha sido formada. Usualmente pequenas gotas das fases permanecem por um longo tempo, mesmo depois que a interface horizontal é evidenciada (ALBERTSSON, 1986).

3.2.4- Propriedades Físico-Químicas das Fases

O comportamento do SBA depende das propriedades físico-químicas das fases.

3.2.4.1- *Viscosidade*

O aumento do peso molecular dos polímeros aumenta a viscosidade, porém, menores concentrações de polímeros com peso molecular maiores são requeridas para separação das fases. Como a viscosidade da solução de polímero é fortemente dependente da concentração, a viscosidade de uma das fases pode ser reduzida pelo uso de uma fração de maior peso molecular. As fases formadas não são sempre líquidas. Dependendo do tipo do polímero usado, uma fase pode ser mais ou menos sólida ou formar um gel. Dextran forma sistemas com fase líquida com PEG com peso molecular acima de 1000. Quando PEG's de peso molecular menores são utilizados, o dextran forma uma fase sólida ou gel (ALBERTSSON, 1986).

3.2.4.2- *Densidade das Fases*

Devido ao alto conteúdo em água, a densidade das fases é próxima a 1. A diferença de densidade entre as fases neste sistema é também pequena, sendo no entanto maior em sistemas PEG/fosfato (0,04 - 0,1) do que em sistemas PEG/Dextran (0,02 - 0,07) (KULA, 1985).

3.2.4.3- *Tensão Interfacial*

A tensão interfacial entre as duas fases é muito pequena. Na menor concentração dos polímeros, que é a composição próxima do ponto crítico, a tensão interfacial é menor. Esta baixa tensão interfacial minimiza a desnaturação de biomoléculas que ficam na interface, preservando a sua atividade biológica. A tensão interfacial é mais elevada em sistemas PEG/sal do que em sistema PEG/Dextran (KULA, 1985).

3.2.4.4- *Pressão Osmótica*

A pressão osmótica das fases é pequena devido aos elevados pesos moleculares dos polímeros formadores das fases. Quando as fases estão em equilíbrio, a pressão osmótica é a mesma para ambas. Em elevadas concentrações dos polímeros, a pressão osmótica é independente do peso molecular (ALBERTSSON, 1986).

3.3- PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS

A distribuição das substâncias solúveis como proteínas e ácidos nucleicos entre as fases do sistema bifásico aquoso é caracterizada pelo coeficiente de partição, que é definido pela equação

$$K = \frac{C_s}{C_i}$$

Onde C_s e C_i são as concentrações de equilíbrio dos compostos particionados nas fases superior e inferior, respectivamente. O coeficiente de partição das enzimas é constante para um dado sistema em uma estreita faixa de concentração, não contemplando a associação ou dissociação de proteínas oligoméricas presentes em uma das fases (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

Formalmente, pode-se escrever o logaritmo do coeficiente de partição em vários fatores separadamente:

$$\ln K = \ln K^\circ + \ln K_{el} + \ln K_{hfob} + \ln K_{biosp} + \ln K_{tamanho} + \ln K_{conf}$$

onde el , $hfob$, $biosp$, $tamanho$ e $conf$ significam as contribuições eletroquímica, hidrofóbica, bioespecífica, tamanho e conformacional para o coeficiente de partição, das propriedades estruturais e condições ambientais do sistema e \ln de K° inclui outros fatores. Portanto, o coeficiente de partição da proteína pode também ser expresso como (DIAMOND & HSU, 1992):

$$\ln K = \ln K_{ambiente} + \ln K_{estrutura}$$

A reprodutibilidade do K é normalmente na faixa de $\pm 5\%$ para qualquer volume analisado (KULA et al., 1982).

Devido a capacidade da interface adsorver materiais biológicos, ela pode desempenhar um papel importante na partição entre as duas fases do sistema. No estudo da partição de partículas em suspensão, como células e organelas celulares, tem que ser consideradas três regiões de partição: a fase superior, a interface e a fase inferior, pois a interface adsorve quantidades significativas do biomaterial. O mesmo, normalmente, não ocorre para a partição de substâncias solúveis (ALBERTSSON, 1986).

A partição entre as duas fases depende de muitos fatores. Isto é esperado desde que as interações entre a substância particionada e os componentes de cada fase é um fenômeno complexo envolvendo pontes de hidrogênio, interação de carga, força de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos estéricos. Deste modo, a partição depende do peso molecular e propriedades químicas das moléculas ou partículas particionadas. Para partículas, principalmente os grupos expostos da superfície que ficam em contato com os componentes das fases. A partição de partículas é um fenômeno dependente da superfície. Qualquer molécula acumulará na fase onde o número máximo de interações são possíveis, aonde um conteúdo mínimo de energia do sistema é alcançado (KULA et al., 1982).

Os diferentes fatores que determinam a partição podem ser explorados separadamente ou em combinação para alcançar uma separação efetiva. Pode-se também ampliar alguns desses fatores que dominam o comportamento da partição. Com respeito as substâncias particionadas vários tipos de fatores que interferem na partição podem ser distinguidos (ALBERTSSON, 1986):

1. Partição dependente do tamanho: tamanho da molécula ou da área da superfície das partículas é o fator dominante.
2. Eletroquímico: o potencial elétrico entre as fases é usado para separar moléculas ou partículas de acordo com suas cargas.
3. Afinidade hidrofóbica: propriedades hidrofóbicas das fases do sistema é usada para separação de acordo com a hidrofobicidade das moléculas ou partículas.

4. Afinidade bioespecífica: a afinidade entre sítios nas moléculas ou partículas e ligantes ligados aos polímeros das fases é usado para separação.
5. Dependência conformacional: conformação das moléculas e partículas é o fator determinante.
6. Quiral: formas enantioméricas são separadas.

Os fatores que determinam a partição podem ser estudados pela diferença na partição, ou seja, a partição pode ser comparada para dois sistemas bifásicos aquosos que difiram em apenas um parâmetro. O primeiro sistema (sistema de referência) dará um certo coeficiente de partição K_1 . O segundo SBA é idêntico ao sistema de referência, exceto por um parâmetro, por exemplo, o potencial elétrico interfacial, número dos grupos hidrofóbicos ou ligantes bioespecíficos. O coeficiente de partição nesta fase será K_2 . A diferença ($\Delta \log K = \log K_2 - \log K_1$) deve refletir o efeito do parâmetro na partição. Assim, se a composição iônica é alterada, e então o potencial elétrico, o $\Delta \log K$ dará a informação na carga superficial do biomaterial se a mudança no potencial for conhecida. Por este método pode-se compreender as propriedades da superfície das partículas ou moléculas (ALBERTSSON, 1986).

3.3.1- Fatores que Afetam a Partição de Biomoléculas

3.3.1.1- Concentração dos Polímeros

Próximo ao ponto crítico do sistema, moléculas como proteínas se particionam quase igualmente entre as fases. Se a concentração do polímero é aumentada, ou seja, a composição das fases do sistema desvia mais do ponto crítico, a partição da proteína terá preferência por uma das fases. Existe exceções a esta regra, como por exemplo, o coeficiente de partição pode primeiro aumentar com o aumento da concentração do polímero, passar por um máximo, e então diminuir (DIAMOND & HSU, 1992).

No caso de partículas celulares, isto favorecerá completamente a fase superior ou inferior quando o sistema está próximo ao ponto crítico, ou seja, não existe adsorção na interface. Quando a concentração de polímero é aumentada as partículas tendem a ser mais absorvidas na interface. Assim, se as partículas estão na fase superior próximo ao ponto crítico, elas serão removidas desta fase para interface e as vezes da fase inferior quando a concentração do polímero é aumentada. Dependendo das propriedades da superfície das partículas elas serão removidas seletivamente para fase de cima. Quanto mais distante do ponto crítico, maior a concentração dos polímeros e maior a tensão interfacial (ALBERTSSON, 1986).

3.3.1.2- *Peso Molecular do Polímero*

A partição será favorecida pela fase contendo o polímero com menor peso molecular, ou seja, a substância particionada será mais atraída pelo polímero de menor molécula e mais repelida pelo polímero de maior peso molecular, desde que todos os outros fatores como, concentração do polímero, composição dos sais, temperatura e assim por diante, sejam mantidos constantes. Pequenas moléculas tal como aminoácidos ou pequenas proteínas não são muito afetadas como moléculas de proteínas maiores (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

3.3.1.3- *Peso Molecular da Substância Particionada*

Quanto maior o tamanho da molécula, maior é a superfície exposta que pode interagir com os componentes das fases. A equação de Brønsted descreve qualitativamente a partição da molécula em função de sua massa molecular e o fator λ , que é um valor desconhecido. (BRØNSTED, 1931; BRØNSTED & WARMING, 1931):

$$K = e^{(\lambda M/kT)}$$

onde λ é um parâmetro que caracteriza as fases do sistema e as interações com o composto de interesse; M é a massa molecular; k a constantes de Boltzmann e T a temperatura absoluta.

Geralmente, para substâncias de baixo peso molecular, tal como sais inorgânicos, açúcares, aminoácidos e nucleotídeos, a partição é quase igual entre as duas fases, ou seja, o valor do coeficiente de partição é aproximadamente 1. Entretanto, o valor do coeficiente de partição de algumas destas substâncias pode-se desviar consideravelmente de 1, como mostrado pelo estudo de JOHANSSON (1970).

Sulfatos e fosfatos possuem valores de K significativamente menores do que 1. Ácidos polibásicos, tais como, fosfórico, cítrico e oxálico, têm K maiores que 1, enquanto seus sais têm K menor do que 1. No caso do fosfato, o K diminui com o aumento da carga do íon fosfato. Entre os compostos aromáticos, a piridina tem um K em torno de 1, enquanto fenol e naftol tem K muito maior do que 1. É claro que, embora, a maioria das substâncias de baixo peso molecular distribuam-se praticamente igualmente entre as fases, existem muitas exceções que não obedecem esta regra (ALBERTSSON, 1986).

3.3.1.4- *Efeitos Eletroquímicos*

3.3.1.4.1- Sistemas Polímero/Polímero

3.3.1.4.1.1- Concentrações Baixas de Sal

A adição de sais em SBA pode ser usada efetivamente para alterar o coeficiente de partição das proteínas. Pequenas alterações na composição do sistema podem transferir o DNA, por exemplo, quase completamente de uma fase para a outra. A partição de biopolímeros é determinada principalmente pelo tipo de íons presentes e pela relação entre estes íons diferentes. Isto pode ser explicado pelo potencial elétrico entre as fases, criado pela distribuição desigual dos íons, que têm diferentes afinidades pelas fases (ZASLAVSKY, 1995).

A partição de proteínas no sistema bifásico aquoso PEG/Dextran depende da composição iônica, pH, tamanho da molécula de proteína e concentração e peso molecular dos dois polímeros (ALBERTSSON, 1958, 1971; ALBERTSSON & NYNS, 1959, 1961).

A FIGURA 03 mostra um exemplo típico da influência de diferentes íons na partição da proteína. O tampão fosfato está presente na concentração de 10 mM. Os outros sais são

adicionados a altas concentrações e eles então prevalecem na criação do potencial interfacial. Os cátions diminuem o coeficiente de partição na ordem $\text{Li}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ = \text{Cs}^+ < \text{K}^+$ e ânions na ordem $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$. Os ânions divalentes monohidrogenofosfato, sulfato e citrato aumentam o K em relação aos íons monovalentes. A ordem do efeito desses íons sob a partição dada é tipicamente para proteína carregada negativamente. A ordem é reversa se uma proteína carregada positivamente é usada. O coeficiente de partição da ovalbumina carregada negativamente, diminui, enquanto que da lisozima, carregada positivamente, aumenta com a série F, Cl, Br, I ou Li, Na, K (ZASLAVSKY, 1995).

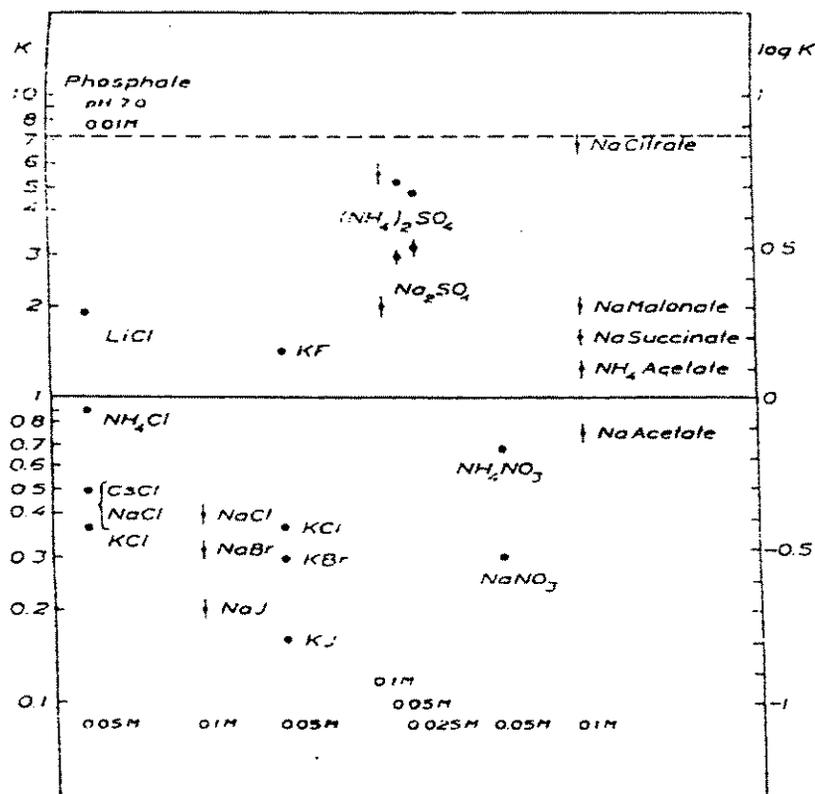


FIGURA 03- Coeficiente de partição da ficoeritrina no sistema PEG 6000 4,4%/Dextran 500 7% com 0,005M de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 a 20°C e com diferentes eletrólitos

ALBERTSSON (1971) obteve a seguinte relação entre a diferença de potencial eletrostático e o K de íons na ausência de potencial (K_- e K_+):

$$\Delta\psi = \frac{RT}{(Z^+ + Z^-)F} \ln(K_-/K_+)$$

onde ψ é o potencial interfacial, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta, Z^+ e Z^- são as cargas dos íons do sal, F é a constante de Faraday, K_- e K_+ são os coeficientes de partição dos íons, hipoteticamente na ausência da diferença de potencial; K_- e K_+ representam a afinidade química dos íons para as duas fases aquosas. Esta equação é válida em condições de eletroneutralidade das fases e na presença de excesso de sal relativamente a biomolécula.

A partir desta relação descrita anteriormente, desenvolveu-se uma relação geral entre o coeficiente de partição da biomolécula carregada e a diferença de potencial eletrostático:

$$\ln K = \ln K_0 + \frac{FZ\Delta\psi}{RT}$$

onde K_0 é o coeficiente de partição da biomolécula quando $\Delta\psi=0$ ou $Z=0$, ou seja, na ausência de potencial ou no ponto isoelétrico da biomolécula.

3.3.1.4.1.2- Concentrações Altas de Sal

A forças iônicas mais elevadas ($>1,0$ M) a partição de proteínas é fortemente influenciada pela concentração do sal. Parece ocorrer um fenômeno geral, em que as proteínas são mais particionadas para a fase superior quando cloreto de sódio é aumentado na faixa de 1-5 M no sistema PEG/Dextran. O $\log K$ aumenta quase linearmente com a concentração de cloreto de sódio nesta faixa (ALBERTSSON, 1986).

A influência da carga líquida da proteína na sua partição pode ser estudada pela medida do coeficiente de partição a diferentes pH's. Para superar a influência dos diferentes íons do tampão no potencial elétrico entre as fases, um sal neutro tal como o cloreto de sódio ou sulfato de sódio é adicionado em excesso. Se o coeficiente de partição K é plotado versus o pH, uma curva é obtida para o NaCl e uma outra diferente para o Na₂SO₄, desde que os sais dados aumentem a diferença do potencial elétrico interfacial. As duas curvas cruzarão no ponto isoelétrico (ALBERTSSON, 1970; ALBERTSSON et al., 1970) e o ponto de cruzamento pode ser usado para a determinação do ponto isoelétrico de proteínas (SASAKAWA & WALTER,

1972; WALTER & SASAKAWA, 1971; WALTER et al., 1972) e também de outras macromoléculas ou partículas.

Nas concentrações de cloreto de sódio acima de 1M a maioria das proteínas tendem a ir para a fase superior, rica em PEG. Provavelmente, isto é resultado também das interações hidrofóbicas com o PEG ou o fenômeno relacionado com o "salting out". Embora o PEG seja fracamente hidrofóbico, suas interações com regiões hidrofóbicas nas proteínas podem aumentar em altas concentrações de sal. Entretanto, este efeito é observado principalmente para cloreto de sódio em sistema PEG/Dextran. Se o fosfato é aumentado a altas concentrações, muitas proteínas vão para fase inferior (ALBERTSSON, 1986).

3.3.1.4.2- Sistemas Polímero/Sal

Em sistemas bifásicos constituídos por um polímero e um sal, a partição do material biológico é fortemente influenciada pela concentração do sal, o que pode ser atribuído aos efeitos do "salting-out" (KULA et al., 1982). Em sistemas PEG/sal, um aumento no comprimento da "tie-line" promove a transferência das proteínas da fase rica em sal para a fase rica em PEG e, se a solubilidade das proteínas nesta fase não for suficientemente elevada, ocorrerá a precipitação destas na interface. O tipo de sal é um fator muito importante uma vez que a constante de "salting-out" depende do tipo de sal (KIM, 1986).

3.3.1.5- *Interações Hidrofóbicas*

O efeito elétrico pode ser anulado a partir da escolha de uma composição de sal desejável para o SBA, de modo que, a diferença do potencial elétrico entre as fases torne-se zero. Conseqüentemente, outros fatores determinantes da partição tornam-se mais importantes, tais como propriedades hidrofóbicas-hidrofílicas das superfícies das partículas (ZASLAVSKY, 1995).

O efeito hidrofóbico pode ser aumentado por ligações covalentes de grupos hidrofóbicos a um dos polímeros, dependendo do tamanho do grupo hidrofóbico ligado ao polímero e do

número e força das ligações das regiões hidrofóbicas da molécula da proteína. (SHANBHAG & JOHANSSON, 1974; SHANBHAG & AXELSSON, 1975). Se a proteína, por exemplo, contém superfície ou regiões com grupos ligantes hidrofóbicos, seu coeficiente de partição será alterado. Assim, a chamada partição por afinidade hidrofóbica pode ser usada para caracterizar as propriedades das proteínas ou partículas de células e também para a separação de moléculas ou partículas de diferentes hidrofobicidade (ALBERTSSON, 1986).

3.3.1.6- *Afinidade Bioespecífica*

A partição por afinidade bioespecífica foi introduzida por SHANBHAG & JOHANSSON (1974), que demonstraram que a albumina de soro humana pode ser seletivamente extraída do plasma pelo PEG/palmitato, no sistema PEG/Dextran. Ligantes bioespecíficos acoplados a um dos polímeros podem influenciar fortemente a partição de moléculas ou partículas que tenham afinidade pelo ligante. Esta influência varia com o número de sítios presentes nas moléculas e partículas que possam ser ligados e do número de ligantes acoplados ao polímero.

3.3.1.7- *Conformação da Biomolécula*

Sistemas bifásicos aquosos com potencial interfacial zero podem ser obtidos pela escolha de um sal desejável ou mistura de sais. A partição de proteínas em tais sistemas seria independente da carga líquida da proteína, ou seja, independente do pH. Algumas proteínas também apresentam um coeficiente de partição constante sob uma grande faixa de pH no SBA com potencial interfacial zero (JOHANSSON & HARTMAN, 1974). Outras proteínas apresentam mudanças em certos intervalos de pH. Em alguns casos, isto ocorre quando a proteína sofre uma alteração conformacional, tal como no caso da albumina sérica em pH baixo, ou quando moléculas de proteínas formam dímeros, como com a lisozima. Para tais proteínas, o K° não é independente do pH e a partição em sistemas com potencial interfacial zero seria então usada para detectar mudanças na conformação, quando, por exemplo, grupos previamente

escondidos são expostos na superfície da proteína, ou no estudo do fenômeno associação-dissociação entre as proteínas (ALBERTSSON, 1986).

3.3.1.8- *Quiralidade da Biomolécula*

Formas enantioméricas de moléculas devem se particionar diferentemente em um SBA contendo componentes opticamente ativos. Os polímeros Dextran, Ficoll, amido e celulose são todos opticamente ativos e devem distinguir as formas D e L das moléculas. Também, uma proteína ligada que possa selecionar as formas D ou L e ser enriquecida em uma das fases pode ser usada para partição quiral. D e L triptofano foi separado pelo SBA contendo albumina de soro (EKBERG et al., 1985).

3.3.1.9- *Temperatura*

A temperatura é um fator importante na partição. O diagrama de fases depende da temperatura, particularmente próximo do ponto crítico, onde uma pequena alteração na temperatura terá uma influência considerável na composição dos polímeros e também na partição da substância no SBA. A temperatura tem menor influência na partição a valores mais distantes do ponto crítico (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

3.4- APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Uma das características atrativas da extração líquido-líquido é a facilidade de "scale-up". Isto deve-se ao fato que o coeficiente de partição para substâncias solúveis em muitos casos é independente do volume total das fases do sistema, da razão de volume e da concentração da substância a ser particionada para uma larga faixa de concentração. O comportamento da partição em larga escala para o SBA pode então ser pré-definido com grande exatidão de experimentos

laboratoriais em pequenos tubos testes. Desta forma, a mistura e o rápido equilíbrio de fases são facilmente alcançados, requerendo relativamente pouca energia (ALBERTSSON, 1986).

3.4.1- Concentração

Muitas substâncias de interesse biotecnológico estão disponíveis em soluções diluídas ou em suspensões, como culturas líquidas de bactérias, algas ou vírus ou um extrato enzimático. O início do processo de isolamento e purificação, nestes casos, é realizado a partir de grandes volumes, sendo necessário um primeiro passo de concentração do material que pode ser obtido a partir da utilização de um SBA. Um SBA pode levar a uma concentração efetiva desde que possa ser selecionado de tal maneira que a maioria das substâncias desejadas sejam transferidas para a fase com menor volume, quando comparada à solução original. No entanto, várias impurezas podem estar presentes juntamente com o produto desejado, o que não é adequado. Por outro lado, vários passos de purificação podem ser realizados a fim de se obter o produto desejado livre de contaminantes (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993).

3.4.2- Purificação de Biomoléculas em Larga Escala

A partição pelo Sistema bifásico aquoso tem as seguintes vantagens para a purificação de biomoléculas em larga escala (ALBERTSON, 1986):

1. O "scale-up" pode facilmente e seguramente ser alcançado a partir de pequenos experimentos de laboratório.
2. Rápida transferência de massa e equilíbrio são alcançados, através de uma pequena quantidade de energia na forma de mistura mecânica. Geralmente, o equilíbrio entre as fases é alcançado rapidamente, em segundos, pela agitação do SBA. Provavelmente devido a baixa tensão interfacial, que permite uma dispersão muito fina de uma fase na outra, mesmo com agitação suave.

3. Pode ser desenvolvido como um processo contínuo
4. Os polímeros estabilizam as enzimas. Nenhum sinal de desnaturação ou perda na atividade biológica, tal como atividade enzimática, tem sido observado depois do experimento de partição em SBA polímero/polímero, quando a partição é realizada em pH e concentração de sal adequados. Os polímeros usados são polissacarídeos ou polióis que são conhecidos por estabilizar certas enzimas.
5. A separação pode ser seletiva e rápida
6. A rápida separação permite a utilização da temperatura ambiente, ao invés de baixas temperaturas, tendo um menor custo de investimento.
7. É mais econômico do que outros métodos de purificação.

3.4.3- Bioconversão

Sistemas bifásicos aquosos podem ser usados para a produção e purificação simultânea de bioprodutos usando enzimas ou microrganismos. O biocatalisador (enzima ou suspensão celular) é confinado em uma das fases junto com o substrato enquanto o produto se particiona para a outra fase. O produto pode ser removido por repetidos passos de partição ou pelo procedimento de extração contínua (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Além de sistemas utilizando células animais, como células de hibridoma de rato para produção de antibiótico em sistema PEG/Dextran (ZIJLSTRA et al., 1996), células vegetais, como de células de raízes de *Tagetes patula* também foram usadas para produção de metabólitos secundários (BUITELAAR et al., 1992).

A extração pode ser usada para remover o produto da enzima e substrato, favorecendo a purificação, e também com o propósito de aumentar a velocidade de reação se a enzima for inibida pelo produto, como frequentemente acontece (CABRAL & AIRES-BARROS, 1993). Na

TABELA 02 encontram-se alguns exemplos de bioconversão utilizando enzimas e microrganismos.

TABELA 02- Bioconversão extrativa utilizando enzimas e microrganismos como catalisadores em sistemas bifásicos aquosos

Enzima	Conversão	Sistema	Referência
Penicilina G acilase	D(-) PG metil éster → cefalexin (antibiótico)	PEG/Dextran PEG/(NH ₄) ₂ SO ₄	HERNANDEZ-JUSTIZ et al., 1998
α-amilase papáina	Hidrólise do amido e hemoglobina	PEG/Dextran	KONDO et al., 1994
α-quimotripsina e tripsina	Proteólise da caseína	PEG/Dextran	MUKATAKA et al., 1992
β-galactosidases	Lactose → glicose	PEG/Reppal PES PEG/sais	CHEN & WANG, 1991
β-galactosidase	Lactose → glicose	PEG/pullulan	NGUYEN et al., 1988
Microrganismo	Produção	Sistema	Referência
<i>Escherichia coli</i>	Produção das proteínas termoresistentes	PEG/Dextran	UMAKOSHI et al., 1996
<i>Serratia marcescens</i>	Quitinase	PEG/Dextran	CHEN & LEE, 1995
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	α-amilase	PEG/Dextran	PARK & WANG, 1991
<i>Bacillus licheniformis</i>	Protease alcalina	PEG/Dextran	LEE & CHANG, 1990

3.5- SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS

Um amplo espectro de polímeros tem sido testado para a obtenção de sistemas bifásicos aquosos. Para o campo da pesquisa, a maioria dos sistemas são aceitos, mas quando são extrapolados para a escala industrial, outros critérios devem ser avaliados. O custo do polímero, o

tempo da separação das fases, a quantidade necessária para formação do sistema bifásico, e a possibilidade do reciclo do polímero, são fatores de grande importância (MATTIASSON & LING, 1987).

Apesar do sistema PEG/Dextran ser clássico, o dextran é extremamente caro para ser utilizado industrialmente devido ao seu elevado custo de purificação (NILSSON et al., 1987), exceto para alguns casos raros, quando produzem-se compostos de alto valor agregado. Como alternativa tem-se proposto o uso do dextran não purificado. Com este recurso pretende-se manter as propriedades de partição do sistema reduzindo substancialmente o custo associado a aplicação em grande escala. No entanto, estes sistemas possuem alta viscosidade e conseqüentemente uma lenta separação (KRONER et al., 1982).

Em muitos casos, a eficiência do uso de sais como componentes da fase inferior tem sido testada. O sistema PEG/ sulfato de potássio foi usado para o isolamento de enzimas em larga escala (HUSTEDT et al., 1983). Os sistemas PEG/sais possuem a vantagem dos componentes serem relativamente baratos, embora não sejam adequados para a partição por afinidade, devido a sua elevada força iônica e pela possibilidade de desnaturação de materiais com atividade biológica. Além destes sistemas apresentarem o inconveniente de adicionarem elevadas concentrações de sais, como fosfatos e sulfatos, nos efluentes industriais.

De acordo com a análise econômica da primeira etapa da separação de células mortas, por exemplo, o custo desta etapa de extração com SBA foi estimado por ser três quartos do preço dos componentes das fases: PEG e sal (DATAR, 1986). O custo total foi, na melhor das hipóteses, semelhante ao da microfiltração de fluxo tangencial. Esta análise mostra que o preço do polímero é aproximadamente o parâmetro que determina a viabilidade econômica do método de extração. Um outro exemplo foi a avaliação do custo de extração de enzimas intracelulares, em torno de metade a dois terços do custo da primeira etapa da recuperação (MATTIASSON & LING, 1987).

Diferentes polímeros, tais como o dextran bruto (KRONER et al., 1982) derivados de amido (TJERNELD et al., 1986 e VENÂNCIO & TEIXEIRA, 1993), álcool polivinílico (TJERNELD, 1989), maltodextrina (SZLAG & GUILIANO, 1988), derivados de celulose (SKUSE et al., 1992), derivados de goma de guar (VENÂNCIO et al., 1995) e arabinogalactana (CHRISTIAN et al., 1998), têm sido testados indicando que estes devem ser considerados como alternativas ao Dextran fracionado.

A utilização do hidroxipropilamido, denominado comercialmente como Aquaphase PPT, foi reportado por TJERNELD (1986) como alternativa ao dextran, já que apresentou um décimo do preço. Sua utilização comparada ao sistema tradicional reduziu em sete vezes o custo do SBA. O Reppal PES, nome comercial de um derivado do hidroxipropilamido semelhante ao Aquaphase PPT, tem sido aplicado com sucesso como substituto do dextran em bioconversões extrativas (JOHANSSON & JOELSSON, 1985). Estes derivados do amido foram especialmente desenvolvidos para separações em duas fases aquosas, porém ainda são economicamente inviáveis, embora sejam mais baratos que o dextran fracionado.

SKUSE e colaboradores (1992), estudaram um sistema formado por Pluronic P105, um copolímero constituído por blocos intercalados de óxido de polipropileno e óxido de polietileno, e por Klucel L, um hidroxipropil celulose. Este sistema possui diagramas de fases similares aos obtidos para o sistema PEG/Dextran, mas com o inconveniente da elevada viscosidade resultante da presença de polímero de celulose. VENÂNCIO & TELXEIRA (1993) reportaram o uso de um derivado do hidroxipropilamido, com o preço de um décimo do Reppal PES, embora este polímero comercial possua uma grande quantidade de material insolúvel, que pode ser responsável pelo valor elevado da viscosidade da fase inferior, que foi de cinco a seis vezes maior do que o sistema PEG/Dextran correspondente e dez vezes maior do que o PEG/Aquaphase PPT.

O sistema PEG/Derivado de goma de guar (VENÂNCIO et al., 1995), possui a vantagem de necessitar baixas concentrações de polímeros para formação das fases. O custo deste sistema testado foi semelhante aos de outros sistemas usando um polímero bruto e significativamente mais barato do que outros sistemas referidos na literatura. A utilização de uma arabinogalactana, extraída do tronco de plantas do gênero *Larix*, disponível comercialmente em grau ultra-filtrado (AG-UF) e alimentar (AG-FG), forma com PEG um SBA que possui baixa viscosidade e exibiu comportamento para a separação de proteínas semelhante ao dextran fracionado, possuindo um grande potencial como alternativa ao dextran (CHRISTIAN et al., 1998).

3.6- UTILIZAÇÃO DE GOMAS COMO POLÍMERO PARA SISTEMAS BIFÁSICOS ALTERNATIVOS

As gomas podem ser definidas genericamente como substâncias poliméricas que, em solvente ou agente de inchamento apropriado e mesmo a baixas concentrações, são capazes de formar dispersões ou soluções altamente viscosas ou até mesmo géis. Com esta definição, o termo aplica-se a uma vasta variedade de substâncias, incluindo hidrocarbonetos de alto peso molecular, borrachas, proteínas, polissacarídeos e seus derivados, além de alguns polímeros sintéticos (MILLER, 1987).

TABELA 03- Classificação das gomas industriais quanto a fonte de onde são obtidas

Gomas Naturais	Gomas Modificadas
Exsudado de Plantas	Carboximetilcelulose
Goma arábica	Hidroximetilcelulose
Goma caraia	Hidroxietilcelulose
Goma tragacanto	Carboximetilamido
Goma do cajueiro	Acetado de amido
Extraídas de Algas	Hidroxipropilamido
Ágar	Carboximetilguar
Alginato	Alginato de propileno glicol
Carragenana	
Extraídas de Sementes	
Goma guar	
Goma do marmeleiro	
Fermentação microbiológica	
Dextrana	
Xantana	

Industrialmente, no entanto, o termo goma, é mais específico, e está associado a polissacarídeos e seus derivados. O solvente ou agente de inchamento é, neste caso, a água. As gomas industriais podem ser classificadas em naturais e modificadas. As naturais podem ser obtidas de exsudados de árvore, de sementes, de algas ou por fermentação microbológica. As modificações são as derivadas de polissacarídeos insolúveis, como por exemplo, a celulose. A TABELA 03 apresenta exemplos de gomas industriais classificadas pela fonte e onde são obtidas (MILLER, 1987).

3.7.1- Goma do Cajueiro

As gomas vegetais oriundas de árvores (ou exsudados vegetais), são constituídas principalmente por heteropolissacarídeos, sendo produzidas espontaneamente, após injúria mecânica ou invasão microbiana através dos troncos, galhos ou fruto, constituindo-se então como parte do metabolismo normal da planta. Sua produção parece estar relacionada com algum mecanismo protetor do vegetal (MARQUES & XAVIER-FILHO, 1991).

O exsudado do cajueiro, produzido pela *Anacardium occidentale* L., pertencente a família *Anacardiaceae*, é constituída principalmente por um heteropolissacarídeo ramificado (arabinogalactana ácida), que apresenta propriedades adesivas e atividade de inseticida (VENKAI AH, 1985), bem como propriedades emulsificantes (PONTES, 1971). O cajueiro produz 178 - 2000 g/ano de goma, com um valor médio de 700 g/ano (BANDEIRA, 1991). A produção de castanha em árvores mais velhas do que 25 anos aumenta com a extração de goma. Dado a importância da cultura de cajueiros de algumas regiões de países como o Brasil (400.000-45.000 ha de planta) (LIMA, 1988), Índia, Moçambique, Tanzânia e Kenya, um estudo da utilização da goma é de grande importância. Existem estudos da goma do cajueiro com árvores provenientes da Índia (Madrás) e Nova Guiné (Papua) (ANDERSSON et al., 1974; ANDERSSON & BELL, 1975) e também com árvores brasileiras (Pacajus – CE) (RODRIGUES et al., 1993; PAULA & RODRIGUES, 1995). A goma do cajueiro é constituída principalmente por unidades de galactose, arabinose, glicose, ácido urônico, manose e xilose. Entretanto, tem sido verificado que a porcentagem dos monossacarídeos varia de acordo com a região geográfica.

A TABELA 04 mostra a composição da goma de *Anacardium occidentale* de diferentes origens (ANDERSSON et al., 1974; PAULA & RODRIGUES, 1995).

TABELA 04- Composição da goma de *Anacardium occidentale* de diferentes origens

Monossacarídeo Constituinte	Quantidade em %		
	Índia	Nova Guiné	Brasil
Galactose	61	63	73
Arabinose	14	15	5
Glucose	8	9	11
Ramnose	7	7	4
Manose	2	1	1
Xilose	2	-	-
Ácido glucurônico	6,2	5,7	6,3

Estudos recentes (PAULA & RODRIGUES, 1995) sobre propriedades reológicas da goma do cajueiro mostraram que está é uma goma de baixa viscosidade e é comparável em muitos aspectos com a goma arábica. As viscosidades absolutas em soluções de 1% dessas gomas foram 1,0 mPas (goma do cajueiro) e 1,8 mPas (goma arábica). Outros polissacarídeos utilizados na indústria, como metilcelulose, carboximetilcelulose, gomas de caraia e de tragacanto apresentam viscosidades que variam de 1100 –3400 Pas, em soluções a mesma concentração.

4- MATERIAS E MÉTODOS

4.1- MATERIAIS

4.1.1- Reagentes

Na TABELA 05 encontram-se os reagentes utilizados ao longo deste trabalho.

TABELA 05- Reagentes utilizados nas dosagens dos polímeros e proteína

Utilização	Reagente	Pureza	Fornecedor
Formação do sistema bifásico aquoso	Goma do Cajueiro Amarelo	-----	Cajueiro amarelo
	Polietileno Glicol 1500	-----	Allkimia
	Polietileno Glicol 4000	-----	Chemco
	Polietileno Glicol 8000	-----	Sigma
	Hidrogenofosfato de potássio	99 %	Nuclear
	Di-hidrogenofosfato de potássio	99 %	Kanto Chemical Co
Hidrólise do polissacarídeo	Ácido sulfúrico concentrado	95-97 %	Merck
	Hidróxido de sódio	97 %	Vetec
Dosagem de açúcares redutores	Ácido 3,5 dinitro salicílico	---	Sigma
	Tartarato de sódio e potássio	99 %	Vetec
	Glicose	PA	Sigma
Dosagem do Polietileno glicol	Ácido perclórico	60 %	Kanto Chemical Co
	Cloreto de bário	99,9 %	Reagen Quimibrás
	Iodo	99,9 %	Kanto Chemical Co
Proteína	Tripsina	---	Difco
Dosagem da proteína	Comassie e Brilhante Blue	---	Eastman Kodak
	Ácido ortofosfórico	85 %	Vetec
	Etanol	98 %	Merck
	Cloreto de sódio	99 %	Vetec

4.1.2- Equipamentos

Na TABELA 06 encontram-se os equipamentos utilizados para realização deste trabalho.

TABELA 06- Equipamentos utilizados

Equipamento	Fornecedor
Agitador magnético com aquecimento modelo RKI	Ikemoto Rikakogyo Co. LTD, Japão
Agitador de toque (Vortex) modelo MT - 31	YAMATO SCIENTIFIC Co. LTD, Japão
Balanças analíticas modelos: L 610D e R 180 D	SARGTORIUS GmbH, Alemanha
Banho-maria	Fisatom
Bomba de vácuo: EYELA, A-3S	Tokyo Rikakikai, Co. LTD, Japão
Centrífuga de bancada modelo KN-70	KUBOTA, Japão
Estufa	Marconi Equipamentos para Laboratório
Espectrofotômetro B442	Micronal
Potenciômetro modelo F-8L	HORIBA LTD, Japão

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Purificação da goma de cajueiro.

A goma do cajueiro amarelo, isenta de casca de árvore, foi purificada de acordo com o método de RINAUDO-MILLAS (1991) modificado, como mostra o FIGURA 04. A trituração da goma foi feita utilizando grau e pistilo. A precipitação utilizou 3 vezes o volume de etanol, em relação ao volume da solução, permanecendo os oligossacarídeos em solução.

4.2.2 Preparo das soluções tampão

Foi utilizado o tampão fosfato de potássio 15mM nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 e o tampão Tris-HCl no pH 7,2, preparados de acordo com o MORITA & ASSUMPCÃO (1986).

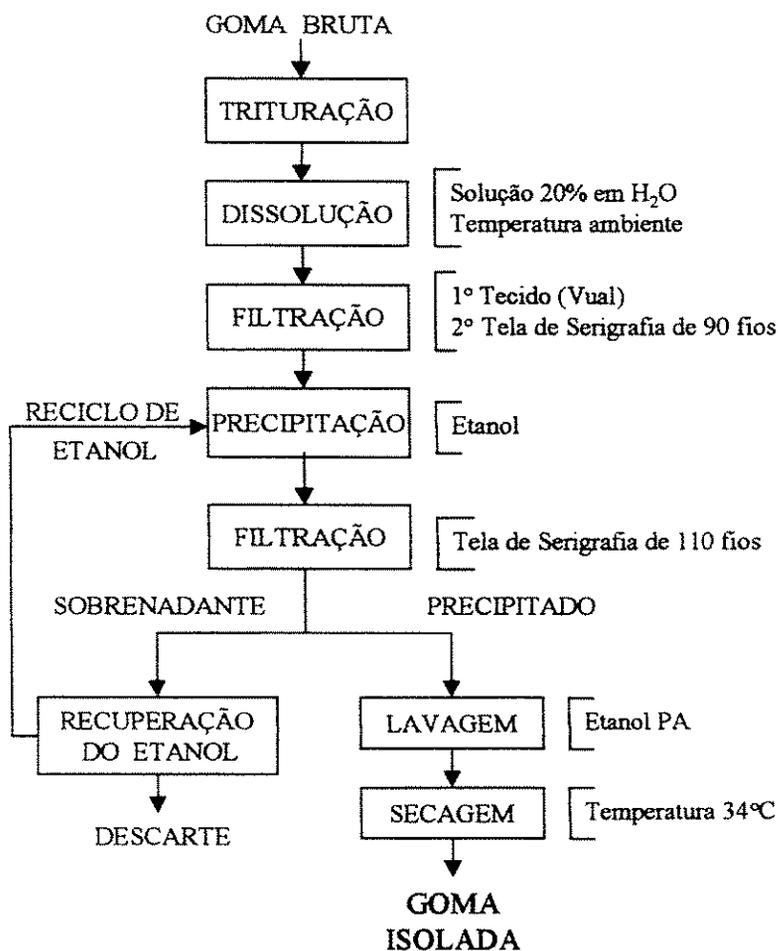


FIGURA 04- Etapas de purificação da goma do cajueiro de acordo com o método de RINAUDO-MILLAS (1991) modificado

4.2.3- Preparo das soluções de polímeros

As soluções de polímeros foram preparadas no tampão fosfato de potássio 15 mM (pH's 6,0; 7,0 e 8,0), nas concentrações dadas na TABELA 07.

4.2.4- Preparo da solução de Tripsina

A solução de tripsina foi preparada em água na concentração de 2mg/ml.

TABELA 07- Soluções estoques de polímeros

Solução	% (p/p)
Polissacarídeo da Goma de Cajueiro	30
Polietileno Glicol 1500	70
Polietileno Glicol 4000	50
Polietileno Glicol 8000	50

4.2.5- Preparo dos Sistemas Bifásicos Aquosos

Para os experimento de determinação do diagrama de fases, foram preparados sistemas de 8 g utilizando-se as soluções de polímeros do item 4.2.3 e tampão fosfato de potássio 15 mM para a construção dos diagramas de fases e análises das "tie-lines". Após a pesagem, os sistemas foram agitados em Vortex durante 2 minutos. Para os experimentos realizados a temperatura ambiente, os sistemas foram centrifugados por 5 minutos a 500 rpm. Para os experimentos realizados a temperatura de 40°C, após agitação, os sistemas foram colocados em um banho-maria a 40°C durante 24 horas, obtendo-se os sistemas bifásicos com concentração total de cada polímero conhecida.

Os sistemas utilizados para os estudos de partição da proteína modelo, foram sistemas de 4 g preparados na ausência e presença de cloreto de sódio, utilizando as soluções de polímeros do item 4.2.3 e tampão fosfato de potássio 15 mM. Após a pesagem os sistemas foram agitados em Vortex durante 2 minutos e adicionados de 400 µl da solução de tripsina (item 4.2.4). Os sistemas foram novamente agitados por 2 minutos e centrifugados por 5 minutos a 500 rpm. Para os sistemas a 40°C, estes foram preparados de acordo como descrito acima. Após o sistema permanecer 24 horas em banho-maria, adicionou-se 400 µl da solução de tripsina (item 4.2.4), agitou-se os sistemas por 2 minutos e colocou-se novamente em banho-maria a 40°C por 2 horas.

4.2.6- Determinação do diagrama de fases

A binodal foi determinada segundo método descrito por ALBERTSSON (1986), que consiste em determinar as composições das fases dos sistemas. Para concentração em cada fase de PEG e polissacarídeo da goma do cajueiro foram feitas as análises de PEG (seção 4.2.9) e ácido 3,5-dinitrossalicílico (seção 4.2.8), a binodal foi traçada através dos pontos representativos dessas duas fases.

4.2.7- Hidrólise do polissacarídeo

Para dosagem dos monossacarídeos presentes no polissacarídeo da goma de cajueiro foi realizada a hidrólise ácida do polissacarídeo. Pesou-se 0,5 g de fase inferior e 1,0 g da fase superior, e adicionou-se 4,5 e 4 ml de água destilada. Em seguida, adicionou-se 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitou-se e a seguir as amostras foram aquecidas durante 1 hora em banho-maria a 100°C, em tubo de ensaio tampado. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e em seguida neutralizada com 5 ml de hidróxido de sódio 6M e posteriormente com hidróxido de sódio 1M, até pH entre 6 e 7. Após a neutralização, a solução foi aferida a 25 ml e a concentração de açúcar dosada pelo método de MILLER (seção 4.2.8).

4.2.8- Determinação de açúcares redutores pelo método de Miller (DNSA)

O método de MILLER (1959) para dosagem dos açúcares redutores é baseado na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNSA) a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, em solução alcalina, sendo os grupos carbonilo dos açúcares oxidados a carboxilo. A presença do sal tartarato duplo de sódio e de potássio é para proteger o reagente da ação do oxigênio dissolvido.

Para quantificação dos açúcares redutores, a 1 ml de amostra, adicionou-se 1 ml do reagente DNSA e aqueceu-se em banho-maria a 100°C por 1 hora. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e aferida para 25 ml, em proveta graduada. Foi lida a absorbância a 540 nm da solução obtida, e o teor de açúcares redutores totais determinado a partir da curva de

calibração. A curva de calibração utilizou glicose como solução padrão na concentração até 2 mg/ml.

4.2.8.1- *Preparo do reagente DNSA*

O reagente de DNSA é preparado pela dissolução de 5 g de ácido 3,5 dinitro salicílico em 100 ml de hidróxido de sódio 2N a 70°C em banho-maria. Em paralelo, 150 g de tartarato de sódio e potássio são solubilizados em 100 ml de água destilada a 70°C em banho-maria. Em seguida a solução de DNSA é misturada lentamente, sob agitação, com a solução de tartarato de sódio e potássio e a solução final é aferida a 500 ml com água destilada.

4.2.9- **Determinação do polietileno glicol**

A determinação do polietileno glicol foi feita segundo o método de SKOOG (1979). Para quantificação do PEG, pesou-se 0,2 g da fase inferior e 1,0 g da fase superior e aferiu-se a 50 ml com água destilada. A 1 ml da solução anterior adicionou-se 4 ml de ácido perclórico 0,5M e homogeneizou-se; a 2 ml desta solução adicionou-se 0,5 ml de cloreto de bário 5%, 0,5 ml de solução de iodo 0,01 M e 0,5 ml de ácido perclórico 0,5 M. Após 15 minutos de reação, a absorbância foi lida a 535 nm. A quantificação de PEG foi feita a partir da curva de calibração, para os PEGs de diferentes massas moleculares (1500, 4000 e 8000) na concentração até 0,08 mg/ml.

4.2.10- **Determinação do conteúdo protéico**

A determinação da tripsina na fase superior foi feita de acordo com o método de BRADFORD (1976) modificado. Devido a viscosidade da fase inferior, a concentração da proteína nesta fase foi calculada através do balanço de massa. O princípio do método de Bradford é baseado no fato que o corante Coomassie Brilliant Blue coexiste em duas formas de cor

diferentes: a cor vermelha e a azul. A forma de cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma, por ligação da parte cromófora do corante a proteína. A 400 µl da fase superior adicionou-se 2 ml do reagente de Bradford e a absorbância foi lida a 595 nm antes de 15 minutos. O aparelho foi zerado com a fase superior de um sistema com a mesma composição do sistema sem proteína, nas mesmas condições descritas para as amostras. A quantificação da tripsina foi feita a partir da curva de calibração, na concentração até 200 µg de tripsina/ml.

4.2.10.1- *Preparação do reagente de Bradford*

O reagente de Bradford é preparado pela dissolução de 100 mg de Coomassie Brilliant Blue em 50 ml de etanol 95%, 100 ml de ácido ortofosfórico e aferido a 1 litro com água destilada. A solução é agitada por 1 hora e então filtrada. A solução é preparada na ausência de luz.

4.2.11- Cálculo do coeficiente de partição

O cálculo do coeficiente de partição foi feito utilizando-se a fórmula descrita abaixo:

$$K = \frac{\text{Concentração de Tripsina na Fase Superior}}{\text{Concentração de Tripsina na Fase Inferior}}$$

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- DETERMINAÇÃO DOS DIAGRAMAS DE FASES

A primeira etapa do trabalho foi realizada a fim de se determinar a uniformidade entre a matéria-prima obtida em diferentes localidades no estado de Pernambuco.

De fato, lotes isolados da goma demonstraram características particulares em relação a viscosidade, coloração e solubilidade, destacando-se a importância em se utilizar uma amostra padronizada.

Os resultados das análises referentes às características da goma em estudo podem ser observados nos gráficos apresentados abaixo (FIGURAS 05 e 06), onde se demonstram as binodais de uma amostragem única de goma e de um lote contendo gomas de diferentes localidades do estado de Pernambuco. Vale ressaltar entretanto que, apesar de cada lote apresentar características particulares como descrito acima, o sistema estudado forma fases com altas concentrações dos polímeros para ambas as gomas.

A utilização de polietileno glicol de peso molecular 550 não foi favorável, pois a fase inferior do sistema formado era altamente viscosa, inviabilizando o seu uso em processos de separações biotecnológicas.

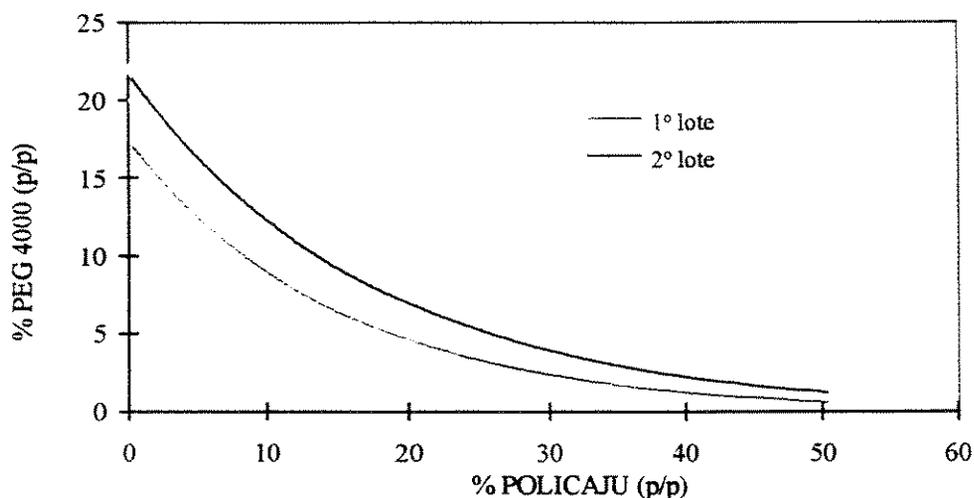


FIGURA 05- Diagrama de fases do sistema PEG 4000/POLICAJU (pH 7,0), para dois lotes de goma (1º lote e 2º lote) a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

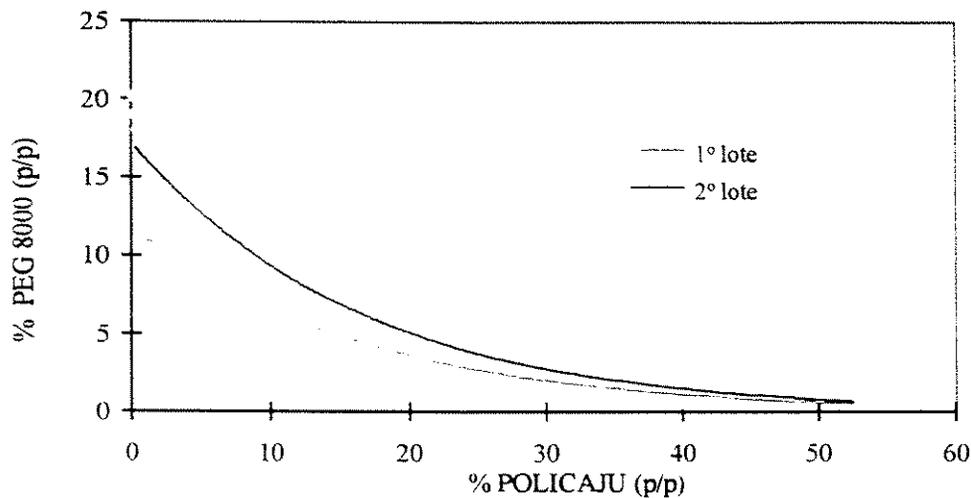


FIGURA 06- Diagrama de fases do sistema PEG 8000/POLICAJU (pH7,0), para dois lotes de goma (1º lote e 2º lote) a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Nos estudos para obtenção dos diagramas de fases do sistema PEG/POLICAJU, observou-se a partir de dados coletados na revisão bibliográfica que são necessários PEG's de peso molecular elevado para a formação de duas fases aquosas quando se estudam sistemas polímero/polímero, o mesmo não acontecendo em sistemas PEG/sais, já que neste caso, se utilizam PEG's de baixo peso molecular. Desta forma, não foi possível comparar dados obtidos para o sistema PEG 1500/POLICAJU.

Para efeitos de comparação, os diagramas de fase dos sistemas PEG 4000/POLICAJU e PEG 4000/Dextran 500 (FIGURA 07) e PEG 8000/POLICAJU e PEG 8000/Dextran T500 (FIGURA 08) foram plotadas graficamente. As curvas possuem perfis semelhantes, havendo porém um deslocamento no sentido de maior concentração dos polímeros para ambos os sistemas PEG 4000/POLICAJU e PEG 8000/POLICAJU. Este deslocamento está relacionado ao menor peso molecular do POLICAJU em relação ao Dextran (ALBERTSSON, 1986). De fato, o peso molecular do POLICAJU está em torno de 110.000 Da (MENESTRINA et al., 1998), enquanto que o peso molecular do Dextran 500 e Dextran T500 é de 215.000 Da (ZASLAVSKY, 1995) e 507.000 Da (ZASLAVSKY, 1995), respectivamente.

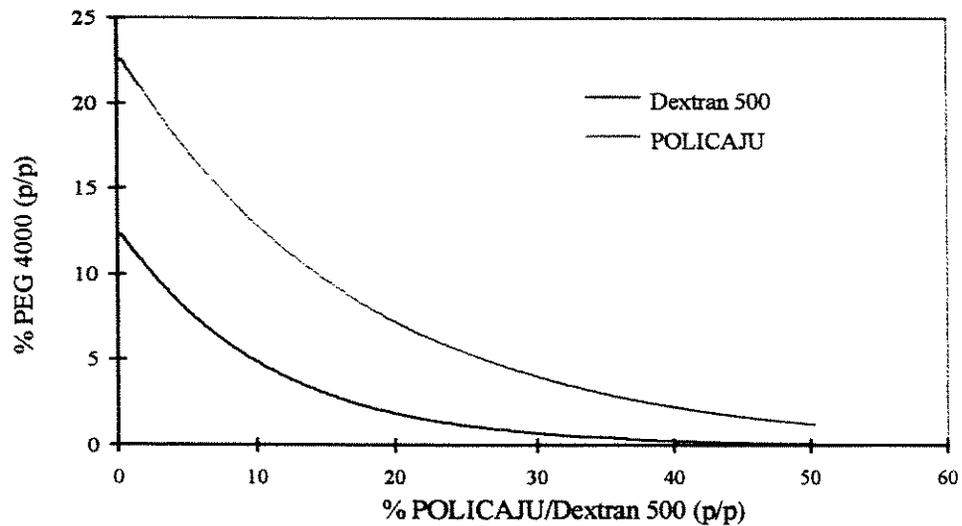


FIGURA 07- Diagramas de fases dos sistemas PEG 4000/POLICAJU e PEG 4000/Dextran 500 (ZASLAVSKY, 1995). a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

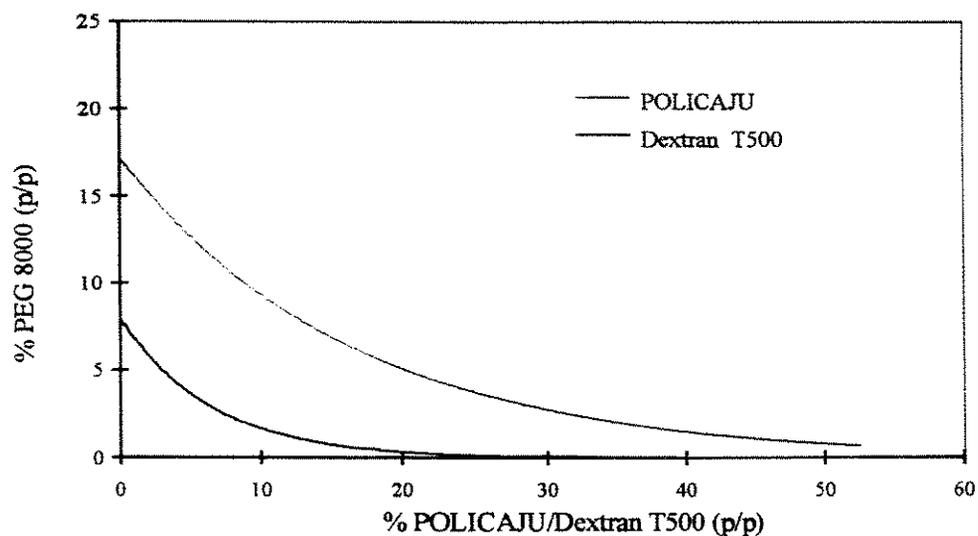


FIGURA 08- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU e PEG 8000/Dextran T500 (ZASLAVSKY, 1995) a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

5.2- EFEITO DO PESO MOLECULAR DO PEG NO DIAGRAMA DE FASES

Analisando-se os diagramas de fases para os três PEG's (1500, 4000, 8000), para cada valor de pH estudado (FIGURAS 09, 10 e 11), observou-se um deslocamento das binodais no

sentido do PEG 8000 para o 1500, ou seja, quanto menor o peso molecular do polímero, maior a concentração necessária para a formação de fases, estando este comportamento de acordo com outros estudos previamente realizados (ALBERTSSON, 1986; VENÂNCIO et al., 1995; SZLAG & GIULIANO, 1988; ZASLAVSKY, 1995).

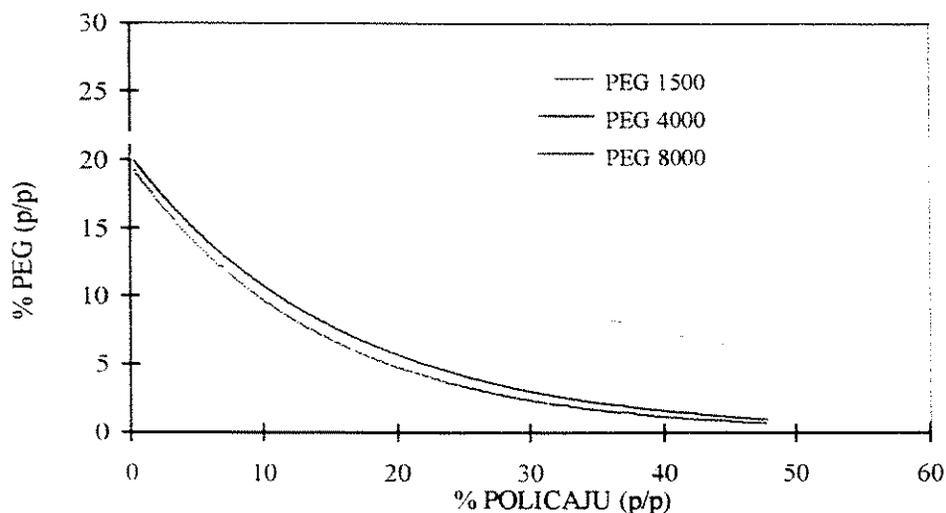


FIGURA 09- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 6,0 a 27°C ± 2°C

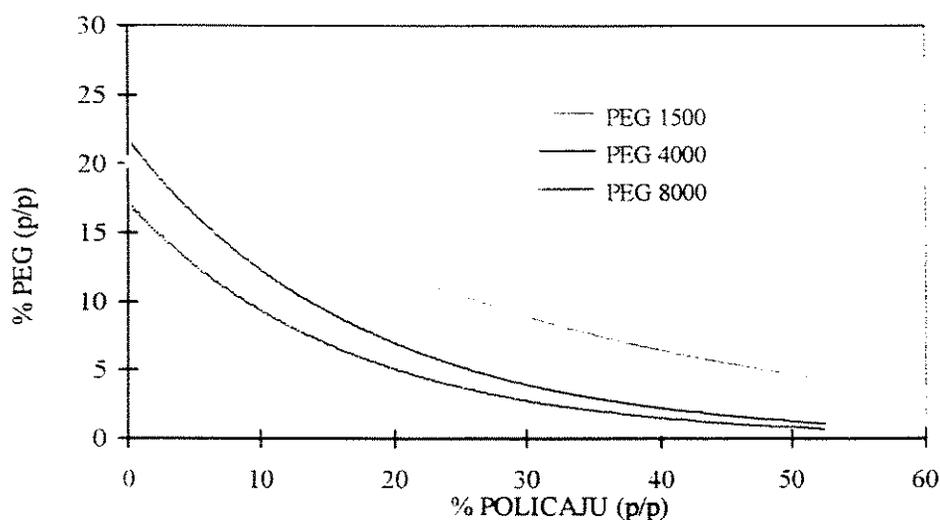


FIGURA 10- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 7,0 a 27°C ± 2°C

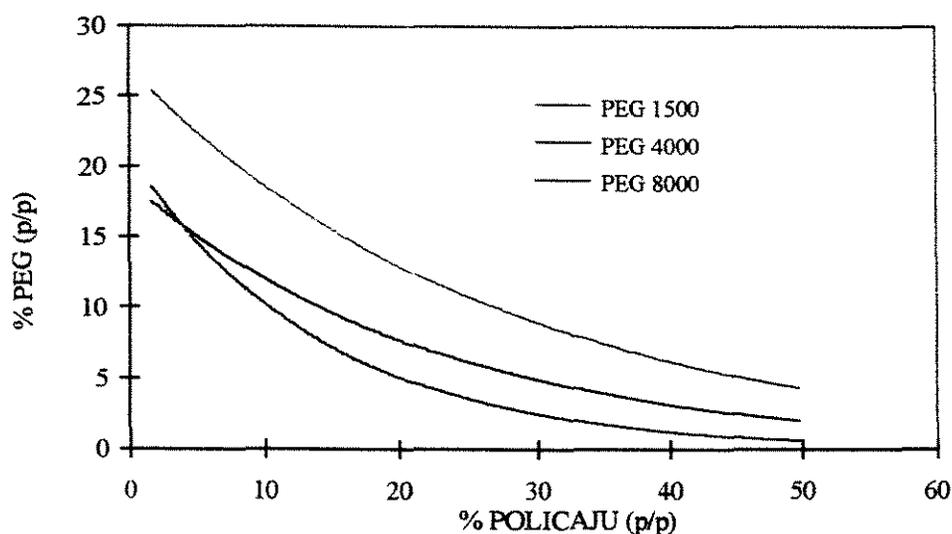


FIGURA 11- Diagramas de fases dos sistemas PEG 8000/POLICAJU, PEG 4000/POLICAJU e PEG 1500/POLICAJU no pH 8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

5.3- EFEITO DA TEMPERATURA NO DIAGRAMA DE FASES

Com relação a temperatura, observou-se um comportamento semelhante para os sistemas estudados utilizando pesos moleculares de PEG diferentes ao se aumentar a temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ou seja, a binodal para os três sistemas permaneceu praticamente inalterada com a variação da temperatura (FIGURAS 12, 13 e 14). Os resultados encontrados nas temperatura estudadas não concordam com os dados de ALBERTSSON (1986), os quais indicam que o aumento da temperatura provoca uma maior miscibilidade entre as fases, sendo necessárias concentrações mais altas dos polímeros para formação de um sistema bifásico. VENÂNCIO & TEIXEIRA (1993) estudando o sistema bifásico PEG/hidroxipropilamido, observaram a necessidade de maiores concentrações dos polímeros para a formação das fases ao se aumentar a temperatura de 19°C para 50°C . FORCINITE e colaboradores (1991) estudaram o sistema PEG/Dextran também observaram um deslocamento da binodal no sentido de maiores concentrações de polímeros com o aumento da temperatura de 4 para 40°C .

O estudo do deslocamento da binodal para baixas temperaturas, não foi considerado um parâmetro relevante, uma vez que a goma do cajueiro torna-se bastante viscosa a baixas

temperaturas, dificultando a utilização deste sistema para a aplicação em escala industrial. Por outro lado, vários autores têm sugerido a modificação química de polímeros, a fim de torná-los mais adequados para a aplicação em SBA. TJERNELD e colaboradores (1986) realizaram estudos modificando quimicamente a molécula de amido pela introdução de grupos hidroxipropil e obtiveram um polímero mais estável a baixas temperaturas. Segundo os autores, mesmo com o custo adicional da modificação, a aplicação da técnica seria comercialmente viável. A modificação da goma também pode ser considerada como sugestão para trabalhos futuros.

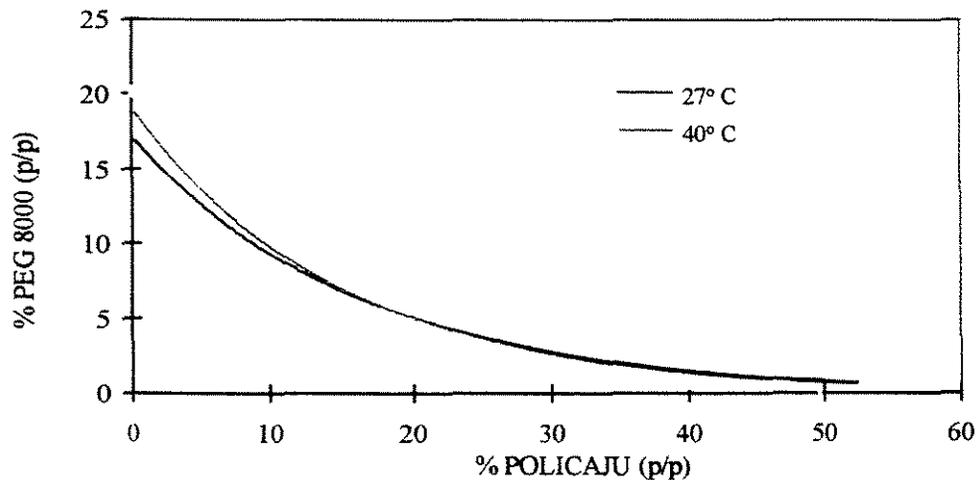


FIGURA 12- Diagramas de fases do sistema PEG 8000/POLICAJU nas temperaturas $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (pH 7,0)

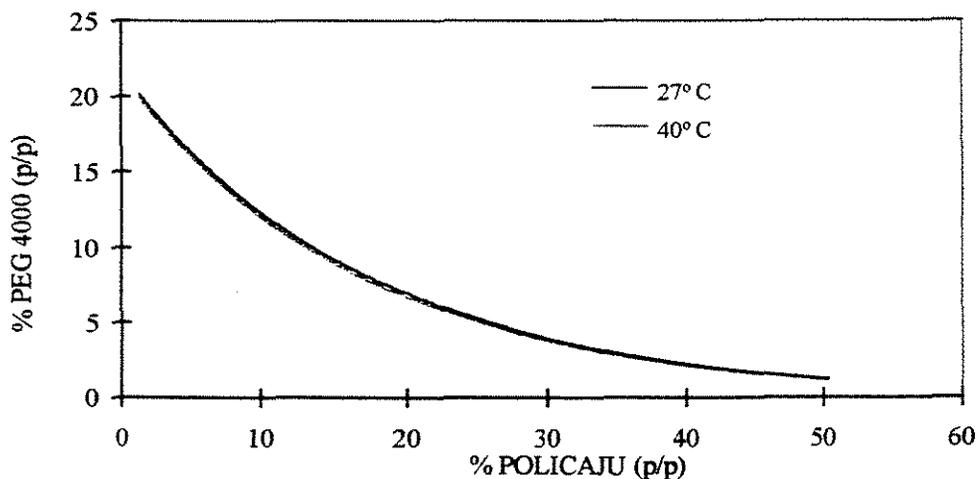


FIGURA 13- Diagramas de fases do sistema PEG 4000/POLICAJU nas temperaturas $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (pH 7,0)

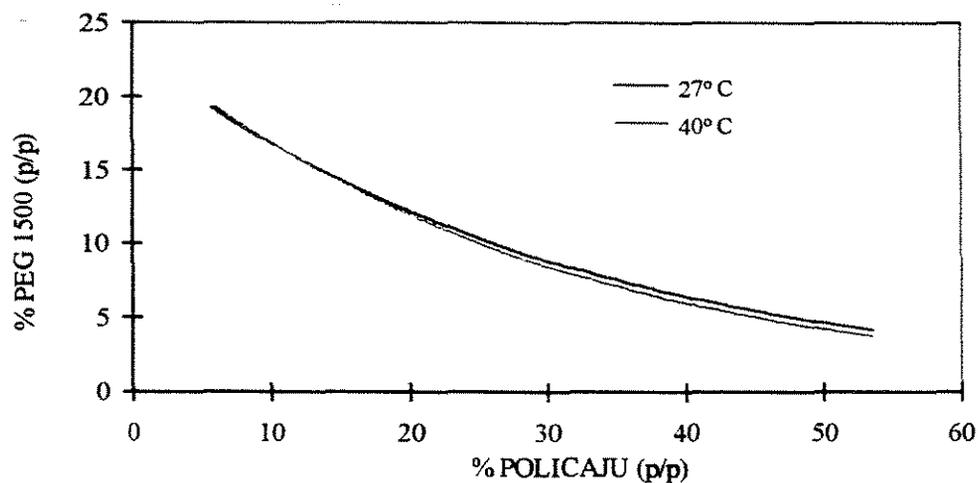


FIGURA 14- Diagramas de fases do sistema PEG 1500/POLICAJU nas temperaturas $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (pH 7,0)

5.4- EFEITO DO pH NO DIAGRAMA DE FASES

Analisando-se o comportamento de cada sistema, não houve um deslocamento significativo das binodais na faixa de pH estudada (FIGURAS 15, 16 e 17). Não foram encontrados dados relevantes a cerca da influência deste parâmetro sobre a binodal em sistemas polímero/polímero descritos na literatura.

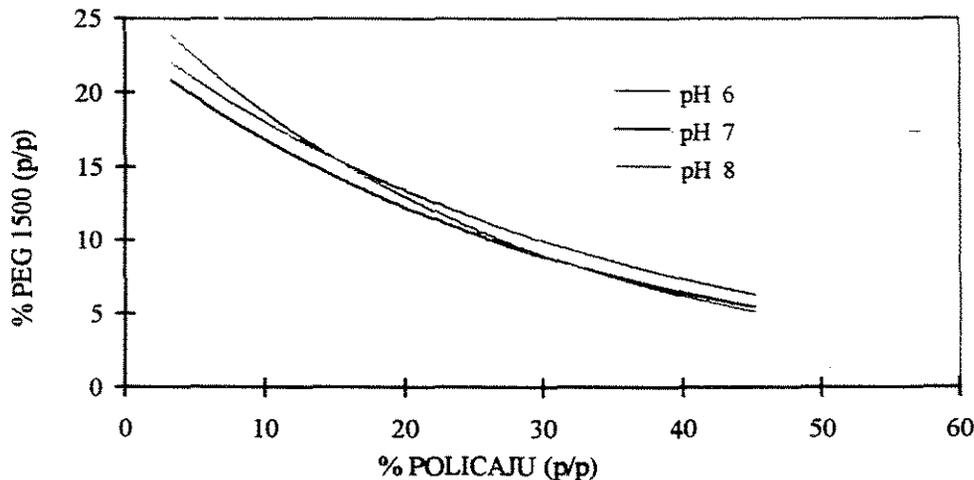


FIGURA 15- Diagrama de fases do sistema PEG 1500/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

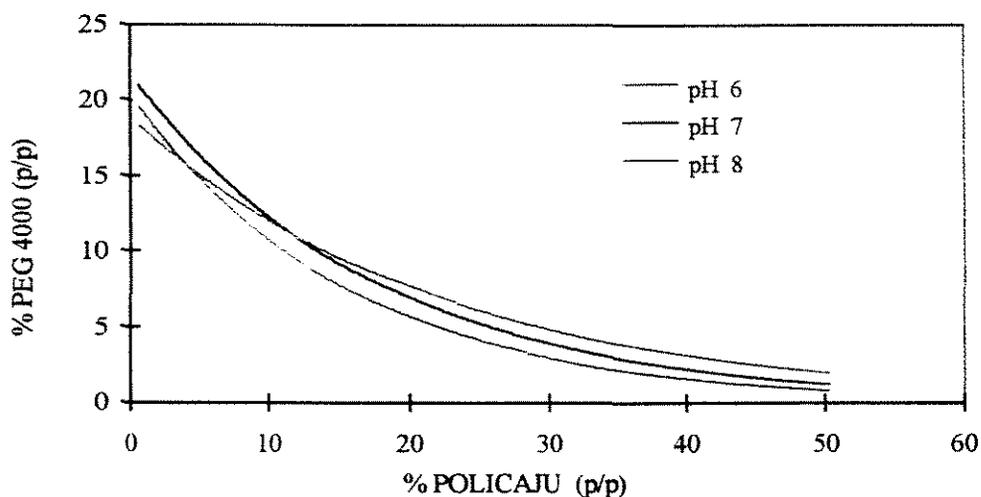


FIGURA 16- Diagrama de fases do sistema PEG 4000/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a 27°C ± 2°C

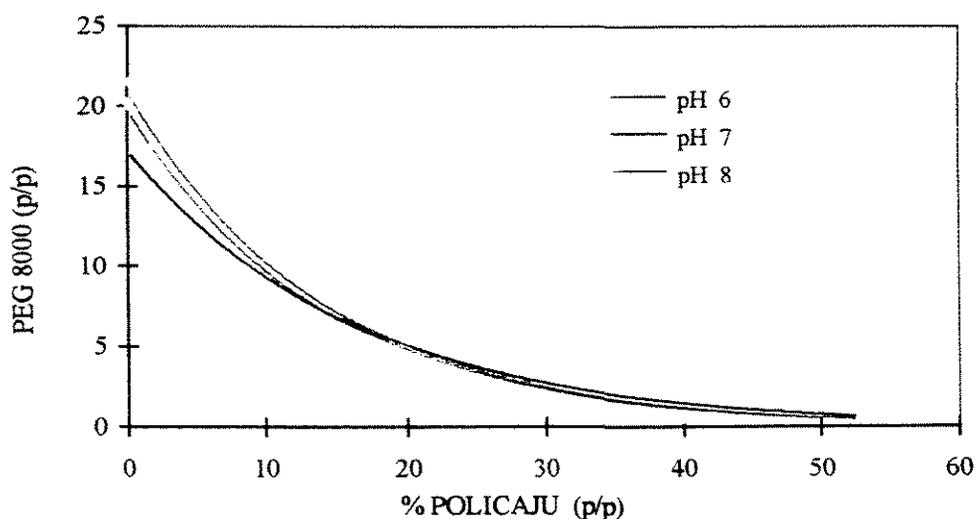


FIGURA 17- Diagrama de fases do sistema PEG 8000/POLICAJU nos pH's 6,0, 7,0 e 8,0 a 27°C ± 2°C

Por outro lado, para sistemas PEG/sal, a variação do pH provoca o deslocamento da binodal no sentido da maior concentração dos constituintes das fases com a diminuição do pH (FRANCO, 1992; HUDDLESTON et al., 1991). Para os sistemas bifásicos PEG/ Sais de fosfato estudados por VIDEIRA & AIRES-BARROS (1994), quando o pH diminui de 8 para 7 a proporção de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ aumenta e devido a rejeição do PEG por grupos (ânions)

multivalentes uma maior concentração de sal e/ou polímero será necessária para obter um sistema bifásico. Estes resultados são corroborados por SARMENTO e colaboradores (1994).

5.5- ESTUDOS DE PARTIÇÃO

A purificação de proteínas usando sistemas bifásicos aquosos é influenciado por vários parâmetros, tais como pH do sistema, tipo e concentração de sais presentes no sistema, o peso molecular do polímero e concentração e propriedades da proteína, como estrutura, hidrofobicidade, peso molecular (ALMEIDA et al., 1998).

A partição de moléculas entre duas fases é um fenômeno complexo devido ao envolvimento de vários fatores nas interações entre o soluto e os componentes constituintes das fases como as pontes de hidrogênio, interações entre cargas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos estéricos. Isto torna o peso molecular e as propriedades químicas do polímero, o tamanho e propriedades químicas do soluto particionado de extrema importância. Uma vez que, a superfície da proteína é constituída por diversos tipos de aminoácidos, as propriedades químicas do polímero tem papel importante na partição das proteínas em SBA (HACHEM et al., 1996).

Devido a complexidade dos fenômenos de partição, é difícil prever o comportamento da proteína e selecionar as condições de separação para se planejar um experimento (HACHEM et al., 1996).

Neste trabalho caracterizou-se o sistema Polietileno glicol/POLICAJU e estudou-se sua aplicação através da partição de uma proteína modelo, a tripsina. A influência de diversos parâmetros como pH, peso molecular do PEG, comprimento da "tie-line", temperatura e adição de sal na partição da proteína foram estudados. A composição total dos sistemas assim como a composição das "tie-lines" estudadas nos experimentos de partição estão apresentadas nas tabelas a seguir:

TABELA 08- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 6,0

PEG 1500	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (% p/p)			Composição da Fase Inferior (% p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	21	13	66	6,22	18,45	75,33	36,97	7,15	55,88
2	22,5	13,8	63,7	3,31	19,82	76,87	40,42	7,97	51,61
3	23	11,7	65,3	7,00	24,62	68,38	37,25	8,13	54,62

TABELA 09 -Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 6,0

PEG 4000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	18	9	73	5,52	13,54	80,94	36,35	2,37	61,28
2	20	11	69	1,66	19,23	79,11	43,22	0,63	56,15
3	22	13	65	0,59	20,24	79,17	47,84	1,68	50,48

TABELA 10- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 6,0

PEG 8000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior(%p/p)			Composição da Fase Inferior (% p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	16	9	75	3,64	13,33	83,03	39,15	0,86	59,99
2	18	11	71	1,33	19,39	79,28	43,88	0,85	55,27
3	20	13	67	0,35	21,56	78,09	47,37	0,99	51,64

TABELA 11- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0

PEG 1500	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (% p/p)			Composição da Fase Inferior (% p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	21	13	66	8,73	16,91	74,36	39,20	7,00	53,80
2	22,5	13,8	63,7	5,75	19,89	74,36	45,15	5,73	49,12
3	23	11,7	65,3	11,35	16,52	72,13	36,02	6,45	57,53

TABELA 12- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0

PEG 4000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	18	9	73	10,93	10,25	78,82	31,47	4,64	63,89
2	20	11	69	4,12	16,58	79,30	48,43	0,98	50,59
3	22	13	65	1,29	21,32	77,39	50,27	1,54	48,19

TABELA 13- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0

PEG 8000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior(%p/p)			Composição da Fase Inferior (% p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	16	9	75	2,69	13,69	83,62	40,37	0,59	59,04
2	18	11	71	0,80	17,85	81,35	48,78	1,03	50,19
3	20	13	67	0,24	20,13	79,63	52,43	1,25	46,32

TABELA 14- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 8,0

PEG 1500	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (% p/p)			Composição da Fase Inferior (% p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	21	13	66	11,91	16,86	71,23	35,08	7,45	57,47
2	22,5	13,8	63,7	8,60	19,80	71,60	38,72	6,69	54,59
3	23	11,7	65,3	14,70	16,57	68,73	27,18	9,34	63,48

TABELA 15- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 8,0

PEG 4000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	18	9	73	11,75	11,56	76,69	34,49	2,36	63,15
2	20	11	69	4,00	17,59	78,41	42,55	1,74	55,51
3	22	13	65	2,03	19,14	78,83	49,71	4,37	45,92

TABELA 16- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 8,0

PEG 8000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior(%p/p)			Composição da Fase Inferior (% p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	16	9	75	5,59	12,64	81,77	38,99	0,97	60,04
2	18	11	71	2,32	16,86	80,82	43,76	1,41	54,83
3	20	13	67	1,63	22,18	76,19	44,37	0,81	54,82

TABELA 17- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 1500/POLICAJU a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0

PEG 1500	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (% p/p)			Composição da Fase Inferior (% p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	21	13	66	9,74	16,29	73,97	40,58	7,26	52,16
2	22,5	13,8	63,7	6,76	18,86	74,38	53,48	3,67	42,85
3	23	11,7	65,3	12,50	16,55	70,95	36,43	5,51	58,06

TABELA 18- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 4000/POLICAJU a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0

PEG 4000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior (%p/p)			Composição da Fase Inferior (%p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	18	9	73	10,00	11,78	78,22	37,75	2,16	60,09
2	20	11	69	3,00	17,75	79,25	54,07	1,11	53,82
3	22	13	65	2,00	20,73	77,27	49,44	1,80	48,76

TABELA 19- Diagrama de fases e composição das fases do sistema PEG 8000/POLICAJU a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,0

PEG 8000	Composição Total do Sistema (% p/p)			Composição da Fase Superior(%p/p)			Composição da Fase Inferior (% p/p)		
	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O	Goma	PEG	H ₂ O
"Tie-line"									
1	16	9	75	4,22	15,28	80,50	30,84	1,21	67,95
2	18	11	71	2,08	17,24	80,68	43,84	1,08	55,08
3	20	13	67	0,79	21,25	77,96	47,46	1,25	51,29

5.6- INFLUÊNCIA DO PESO MOLECULAR DO PEG NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA

As FIGURAS 18, 19 e 20 demonstram a influência do peso molecular do PEG no coeficiente de partição da proteína. De modo geral, com o aumento da massa molecular do polímero houve uma diminuição do coeficiente de partição (K) em todas as condições testadas. Ao se adicionar a proteína no sistema PEG 1500 13%/POLICAJU 21%, pH 8,0, não houve a formação de fases.

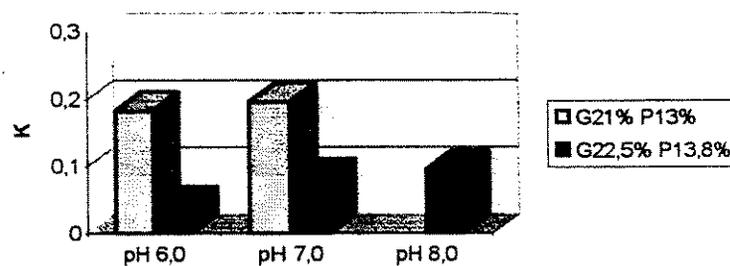


FIGURA 18- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/ POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

*G- POLICAJU, P- PEG

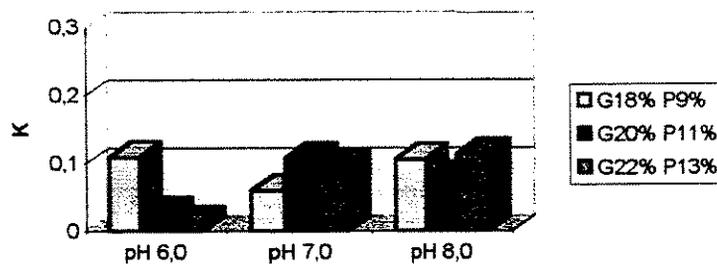


FIGURA 19- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

*G- POLICAJU, P- PEG

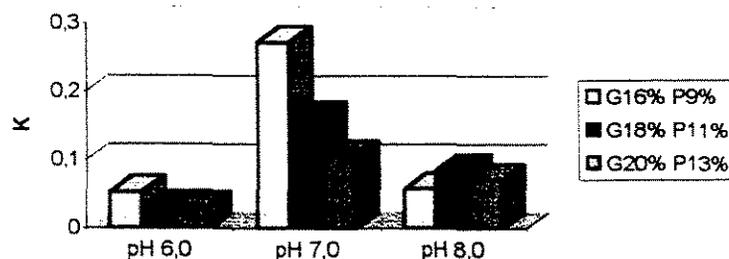


FIGURA 20- Influência do comprimento da "tie-line" e do pH no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

*G- POLICAJU, P- PEG

O PEG é um polímero composto por grupos $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ligados entre si por uma ligação éter. A solubilidade das proteínas em solução deste polímero tem sido interpretada por vários autores em termos dos efeitos do volume excluído do polímero (ATHA et al., 1981; POLSON et al., 1964). Segundo a teoria desenvolvida por estes autores, as proteínas são excluídas estericamente de zonas do solvente ocupadas pelo polímero, sendo as solubilidades proporcionais ao volume de solvente disponível (solvente sem PEG). Assim, quanto maior for o volume excluído do polietileno glicol menor é o volume de solvente disponível, o que implicam uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986). Sendo o PEG um polímero que possui um grupo hidroxila ($-\text{OH}$) ligado a cada um dos grupos $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ terminais, é de se esperar que, para cada uma determinada concentração, a sua hidrofobicidade diminua com a diminuição da massa molecular, uma vez que aumenta a representação daqueles grupos hidrofílicos terminais (KULA, 1985).

Estudos realizados para a partição de cutinase em sistemas PEG/Hidroxipropilamido com polietileno glicol de pesos moleculares 1000, 4000 e 8000 indicaram que partição foi pouco influenciada pelo peso molecular do PEG, uma vez que os coeficientes de partição não demonstraram uma tendência regular. Devido ao efeito do volume excluído, a tendência geralmente esperada seria uma aumento nos coeficientes de partição com a diminuição do peso molecular do PEG. Contudo, é importante considerar que a alteração do peso molecular do

polímero torna necessário alterar a concentração do mesmo, o que influencia o coeficiente de partição no sentido contrário (ALMEIDA et al., 1998).

A importância do peso molecular da proteína também deve ser considerada, uma vez que o efeito da massa molecular do polímero está muito relacionado com a massa molecular do biomaterial. De fato, a partição de aminoácidos ou proteínas de baixa massa molecular não é muito influenciada por variações da massa molecular dos polímeros, não acontecendo o mesmo com proteínas de maior massa molecular (ALBERTSSON, 1986). Pode-se ter, como exemplo, o coeficiente de partição do citocromo C e β -galactosidase no sistema Dextran 40 (0,18 e 0,24, respectivamente) com o correspondente valor no sistema Dextran 500 (0,17 e 1,59, respectivamente) (ALBERTSSON, 1986).

Em estudos realizados para a purificação de cutinase em sistemas PEG/Hidroxipopilamido (ALMEIDA et al., 1998) já descrito acima, os autores também observaram a importância do peso molecular proteína e do polímero, uma vez que a cutinase apresenta baixa massa molecular (22000 Daltons) e que a partição torna-se mais sensível ao peso molecular do polímero para proteínas com peso molecular maior do que 50.000 Daltons (TJERNELD, 1992). Este comportamento da cutinase poderia ser comparado ao comportamento da tripsina nos sistemas estudados, pois seu peso molecular é de 25.000 Daltons.

Estudos de partição do citocromo b5 (13.600 Da) em sistemas PEG/fosfatos demonstraram um aumento no coeficiente de partição com a diminuição do peso molecular do PEG (8000, 3350, 1000 e 400) (SARMENTO et al., 1994). HUDDLESTON e colaboradores (1991) estudaram o coeficiente de partição de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura do pão) em sistemas PEG/fosfatos, observando para PEG 400 e 1000 uma preferência das proteínas pela fase superior. Para o PEG 3350, no entanto, a maioria das proteínas se concentrou na fase inferior, mostrando o efeito pronunciado do peso molecular do PEG no coeficiente de partição. Estudos de partição de albumina de soro bovina (BSA) realizados por CHRISTIAN e colaboradores (1998), demonstraram que a alteração do peso molecular do PEG não teve um efeito significativo na variação do coeficiente de partição para o sistema PEG/Arabinogalactana.

A partição de ácido clavulânico no sistema PEG/fosfato de potássio é muito influenciada pela variação no peso molecular do PEG. Para PEG's de baixo peso molecular, partições semelhantes foram observadas para PEG 1000 e 400 numa mesma "tie-line", para pH 7 e 8. Para PEG de maior massa molecular, 6000 e 4000, uma diminuição no coeficiente de partição com o

aumento da massa molecular foi observado. O efeito do peso molecular do polímero pode ser atribuído ao aumento do número dos grupos hidrofílicos terminais em PEG de cadeia pequena, o qual diminui a hidrofobicidade total, e também ao efeito do volume excluído, que aumenta com o aumento da massa molecular do polímero. Como o ácido clavulânico é uma molécula pequena, ela é provavelmente menos influenciada pelos efeitos do volume excluído (VIDEIRA & AIRES-BARROS, 1994).

Estudos realizados por SCHIMIDT e colaboradores (1994) sobre a correlação entre o efeito da concentração de proteína total e o comportamento da partição das proteínas (amiloglucosidase, subtilisina e inibidor de tripsina) em sistemas PEG 4000/ sais de fosfato demonstraram que a solubilidade das proteínas em solução de PEG é governada pelo efeito de exclusão estérico e pela interação hidrofóbica entre proteína e o grupo etileno do PEG, o qual é provavelmente responsável pela alta solubilidade na fase rica em PEG de muitas proteínas hidrofóbicas. O PEG, sendo de natureza hidrofóbica, tende a interagir fortemente com as regiões não-polares das proteínas (boa afinidade por resíduos de aminoácidos apolares).

5.7- INFLUÊNCIA DO COMPRIMENTO DA "TIE-LINE" NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA

Analisando-se a influência do comprimento da "tie-line" no coeficiente de partição da tripsina, observou-se de modo geral, que a partição diminui com o aumento da "tie-line" para os três valores de pH's testados (FIGURAS 18, 19 e 20). A proteína se concentrou na fase inferior em todas as condições experimentais testadas.

Estudos realizados com a cutinase em sistema PEG 8000/hidroxipropilamido bruto demonstraram um leve decréscimo do coeficiente de partição com o aumento da "tie-line". Esta diminuição da partição se deve ao aumento da concentração de PEG que causa a exclusão molecular da proteína da fase superior, conforme discutido anteriormente (ALMEIDA et al., 1998). O estudo da partição da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em sistemas PEG/hidroxipropilamido demonstrou que o aumento da "tie-line" provocou uma maior afinidade das proteínas para fase inferior diminuindo o K (ORTIN et al., 1991). STURESSON e colaboradores (1990) estudaram o efeito da concentração do polímero na partição da glicose 6-P-

desidrogenase e lactatodesidrogenase em sistemas PEG8000/Aquaphase PPT. Os resultados obtidos demonstraram que as enzimas se concentraram preferencialmente na fase inferior com o aumento da "tie-line", semelhante ao sistema PEG/Dextran. Estudos recentes realizados por CHRISTIAN e colaboradores (1998), também demonstraram a diminuição do K com o aumento de "tie-line" em um novo sistema PEG/Arabinogalactana.

Analisando os sistemas polímero/sais observa-se, um efeito contrário frente aos sistemas polímero/polímero. Estudos de partição do citocromo b5 em sistemas PEG/sais fosfato demonstraram um aumento da partição com o aumento do comprimento da "tie-line" (SARMENTO, 1994). VIDEIRA & AIRES-BARROS (1994) estudando a partição de ácido clavulânico em sistemas PEG/Sais de fosfato também observaram o aumento do coeficiente de partição com o comprimento da "tie-line" para todos os PEG's testados.

O efeito do comprimento da "tie-line" no volume livre em sistemas de PEG/Sais de fosfato foi investigado por HUDDLESTON e colaboradores (1991). Abaixo do ponto crítico o volume livre da mistura PEG/Fosfatos é aproximadamente igual à soma dos volumes livres das soluções individuais daqueles componentes. Acima do ponto crítico, o volume livre da fase de cima, rica em polietileno glicol, permanece relativamente constante, enquanto que o volume livre da fase de baixo, rica em fosfatos, diminui rapidamente em resposta ao aumento da concentração dos componentes do sistema. Comparando estes resultados com os obtidos para as soluções individuais de polietileno glicol e de fosfatos pode se concluir que o aumento do comprimento da "tie-line" promove um aumento da concentração de fosfatos na fase rica em sal, enquanto que na fase rica em polietileno glicol esta permanece relativamente constante e igual ao seu limite de solubilidade em soluções daquele polímero. Na prática, isto resulta no "salting-out" das proteínas da fase rica em sal para a fase rica em polietileno glicol e conseqüentemente num aumento do coeficiente de partição até que os seus limites de solubilidade das proteínas na fase rica em sal, motivada pelo aumento da concentração de fosfatos, dá origem à transferência daquelas da fase rica em sal para a fase rica em polímero, aumentando o coeficiente de partição. O coeficiente de partição de proteínas é pois um parâmetro que depende das suas solubilidades relativas em cada uma das fases.

5.8- INFLUÊNCIA DO pH NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA

O pH é um fator importante no comportamento da partição de uma dada proteína e deve estar sempre relacionado com o ponto isoelétrico da mesma.

Analisando-se os diferentes pH's (6,0, 7,0 e 8,0), não foi possível estabelecer uma correlação da partição da tripsina com o aumento do pH em todos os sistemas estudados (1500, 4000, 8000). Para todos os pH's testados a tripsina particionou-se na fase inferior, rica em goma (FIGURAS 18, 19 e 20).

VENÂNCIO e colaboradores (1995) realizaram estudos de partição de BSA em sistemas PEG/Goma de guar, em condições semelhantes às descritas neste trabalho, para dois PEG's (4000 e 8000) nos pH's 6,0, 6,8 e 8,0. Os resultados demonstraram um leve aumento no coeficiente de partição com o aumento do pH em todos os sistemas testados.

Para o sistema PEG/Hidroxipropilamido bruto estudado por ALMEIDA e colaboradores (1998), em diferentes pH's (4,0, 6,0, 8,0, 9,0), o coeficiente de partição da cutinase ($pI=7,8$) demonstrou pouca alteração com a variação do pH, embora um leve aumento deste parâmetro foi detectado com o aumento do pH de 4,0 para 8,0, porém em pH 9,0 o K foi menor do que em pH 8,0. Isto pode ser explicado com base nas propriedades hidrofóbicas do PEG, que pode se ligar aos resíduos hidrofóbicos da proteína. FORCINITI e colaboradores (1992), reportaram que as interações hidrofóbicas são maiores no pH perto do ponto isoelétrico da proteína e no nosso caso a faixa de pH estudada encontra-se afastada do ponto isoelétrico da tripsina ($pI = 9,2$), explicando assim o perfil de partição semelhante desta proteína nos diferentes pH's.

5.9- INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NaCl NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA

As interações eletrostáticas são importantes em SBA e o efeito da adição de sais nestes sistemas devem ser estudados.

Embora a distribuição dos íons entre as fases seja baixa, é bastante significativa devido a diferença de potencial criada, que afeta a distribuição de partículas carregadas, como as proteínas. Por causa do grande número de cargas nestas macromoléculas, seu comportamento de partição é afetado (QUEIROZ et al., 1995).

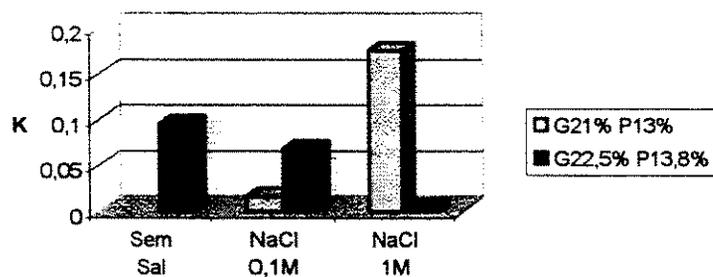


FIGURA 21- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/POLICAJU (pH 6,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

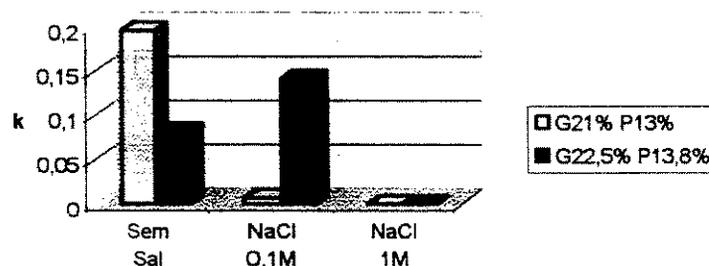


FIGURA 22- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/POLICAJU (pH 7,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

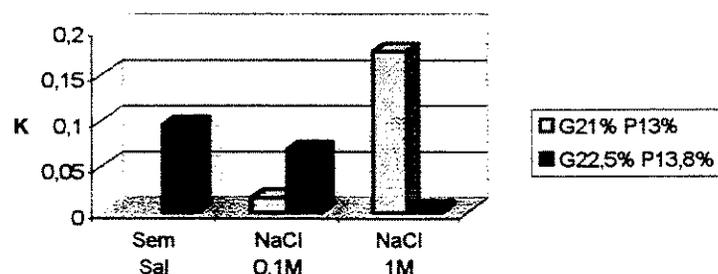


FIGURA 23- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/POLICAJU (pH 8,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

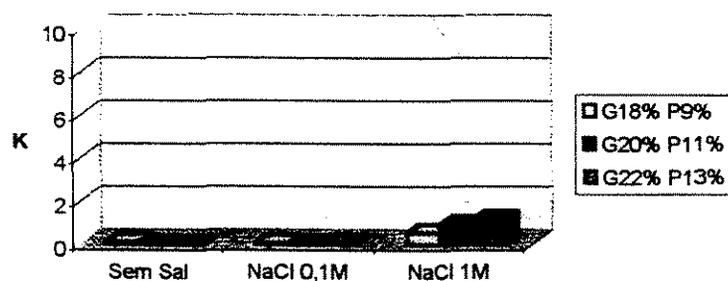


FIGURA 24- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU (pH 6,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

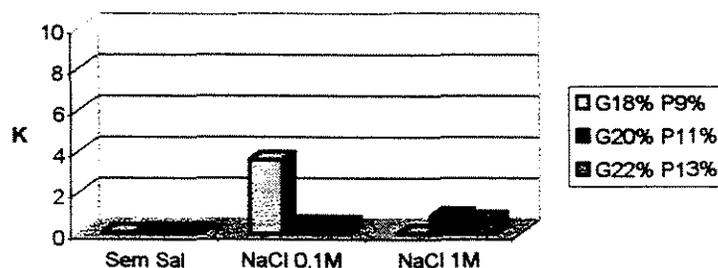


FIGURA 25- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU (pH 7,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

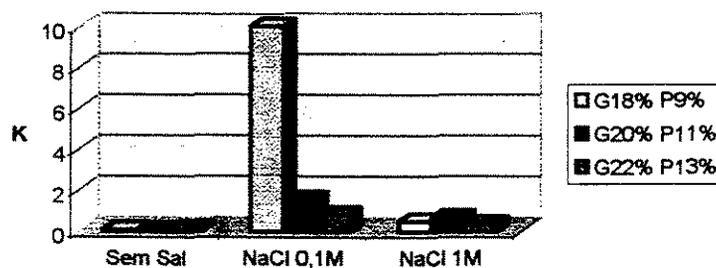


FIGURA 26- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU (pH 8,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

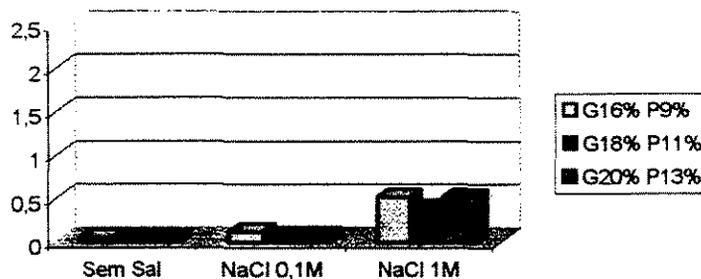


FIGURA 27- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU (pH 6,0)
*G- POLICAJU. P- PEG

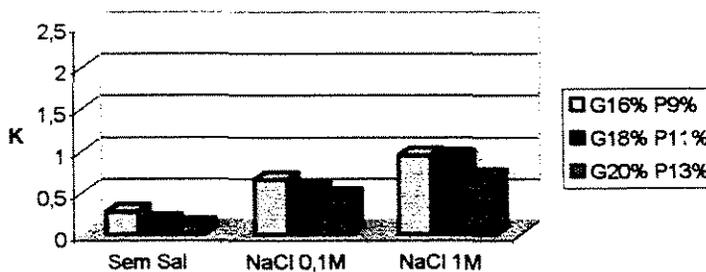


FIGURA 28- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU (pH 7,0)
*G- POLICAJU. P- PEG

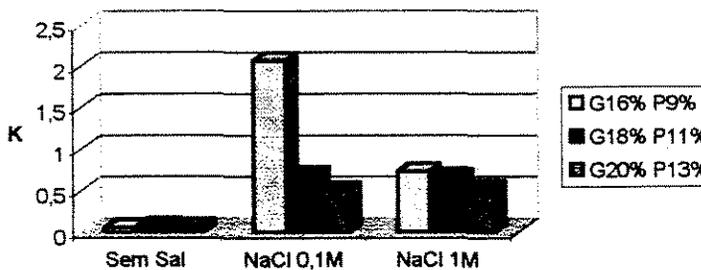


FIGURA 29- Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU (pH 8,0)
*G- POLICAJU. P- PEG

Os resultados obtidos para a adição de NaCl nas concentrações de 0,1M e 1M no K da tripsina não demonstraram um comportamento uniforme de partição. Analisando-se o efeito da ausência e presença do sal em cada concentração separadamente, observou-se, em geral, que na presença de sal para os PEG's 4000 e 8000, há um aumento do K da proteína, enquanto que para o PEG 1500, uma tendência contrária foi observada.

Assim como normalmente observado em certos sistemas, especialmente para o sistema PEG/Dextran (ALBERTSSON, 1986) espera-se que os sais não se distribuam de modo uniforme entre as fases, e que haja uma pequena predominância do íon cloreto na fase superior. Conseqüentemente, a fase superior torna-se negativamente carregada, atraindo as moléculas positivas para esta fase. Como na faixa de pH testado, a tripsina encontra-se carregada positivamente, e adição do NaCl provocou, de modo geral um aumento no K. Por outro lado, tal comportamento não foi observado para o PEG 1500. Provavelmente, outros fatores, que não a carga, devem estar influenciado a partição de modo oposto ao esperado. Muitos parâmetros estão envolvidas na determinação do comportamento de partição de uma molécula, de modo que os mecanismos de ação destas variáveis não estão completamente elucidados (ZASLAVSKY, 1995).

5.10- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PARTIÇÃO DE TRIPSINA

O efeito da temperatura no coeficiente de partição da tripsina foi estudado nas temperaturas $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, como mostrado nas FIGURAS (30, 31 e 32). Para o sistema PEG 1500/POLICAJU observou-se um pequeno aumento do K com o aumento da temperatura, enquanto para o sistema PEG 8000/POLICAJU observou-se o inverso. Para o sistema PEG 4000/POLICAJU, com exceção da primeira "tie-line", o aumento da temperatura provocou uma pequena redução no K.

De modo geral, a variação do K para a tripsina foi pequena, concordando com as observações de FORCINITI e colaboradores (1991), que afirma que o K de proteínas pequenas e hidrofílicas como a lisozima e o quimiotripsigênio é apenas levemente afetado pela variação da temperatura para sistemas PEG/Dextran, nas temperaturas 4, 25 e 40°C .

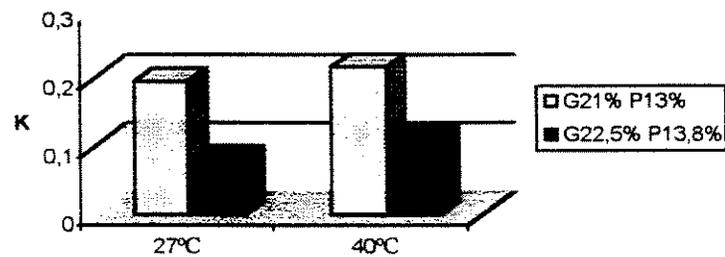


FIGURA 30- Influência da temperatura no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 1500/ POLICAJU (pH 7,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

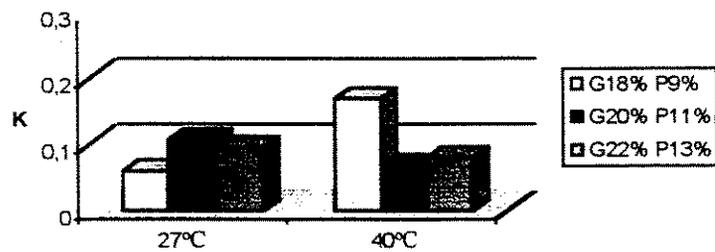


FIGURA 31- Influência da temperatura no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 4000/ POLICAJU (pH 7,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

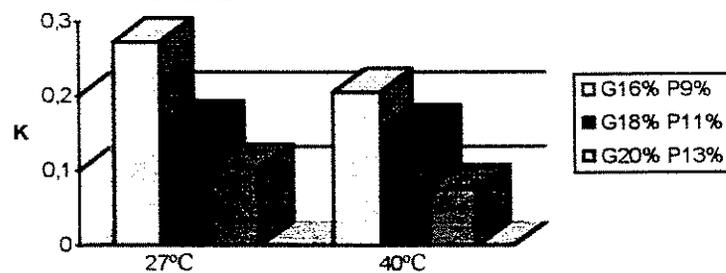


FIGURA 32- Influência da temperatura no coeficiente de partição da tripsina em sistema PEG 8000/ POLICAJU (pH 7,0)

*G- POLICAJU, P- PEG

5.11- ANÁLISE ECONÔMICA DO SISTEMA

Diversos estudos tem sido realizados com a finalidade de se avaliar o impacto econômico da utilização da partição bifásica aquosa em processos em grande escala de biomoléculas (KRONER et al., 1984; DATAR, 1986; CORDES & KULA, 1986; TJERNELD et al., 1987). A maioria das aplicações em larga escala do sistema bifásico aquoso utiliza os sistemas PEG/Sais, que podem desnaturar as proteínas. Apesar do custo associado a estes sistema, KRONER e colaboradores (1984) verificaram que a extração utilizando sistema bifásico aquoso PEG /Sais é competitiva quando comparada com outras técnicas, como a centrifugação, filtração com tambor e filtração com membranas anisotrópicas. Apesar de obter um elevado consumo de reagentes, cerca de 53% do custo total, que é compensado pelo baixo custo com o consumo energético e com o investimento em equipamentos.

Para viabilizar a utilização do sistema bifásico, é necessário reduzir o custo do sistema polímero-polímero, pelo recurso de novos reagentes mais econômicos e pela implementação do reciclo dos polímeros, além da preocupação de utilização de tecnologias limpas e que não causem impacto ambiental.

O custo da goma do cajueiro purificada foi de 18 US/Kg, o que gerou uma redução em torno de 48 vezes em relação ao Dextran (Dextran T500 é de 870 US/Kg). Na TABELA 20 encontram-se os preços de alguns sistemas bifásicos (CHRISTIAN et al., 1998) e os sistemas estudados PEG/POLICAJU, sendo mostradas as composições e os custos de 1 Kg de cada SBA. Para o cálculo dos custos dos sistemas, contactou-se várias empresas e selecionou-se o melhor preço dos reagentes necessários a formação do SBA.

A análise dos resultados apresentados ao longo deste item, mostram que o sistema PEG/POLICAJU é viável para ser utilizado em larga escala. Pela análise econômica obteve-se que o sistema PEG 8000 9% / Poli caju 16% foi o mais barato, sendo este sistema ideal tanto do ponto de vista econômico como tecnicamente, comparando este sistema com os demais estudados.

TABELA 20- Custo de 1 Kg de diferentes sistemas bifásicos aquosos

Sistema	Custo (US\$/Kg)
7% Dextran T500 - 5% PEG 8000	35
7% Dextran bruto - 5% PEG 8000	5,7
14 Hidroxipropilamido- 5% PEG 8000	8,4
16% Arabinogalactana - 5% PEG 8000	12
16% Poli caju - 9% PEG 8000	5,92
18% Poli caju - 11% PEG 8000	6,94
20% Poli caju - 13% PEG 8000	7,97
18% Poli caju - 9% PEG 4000	6,01
20% Poli caju - 11% PEG 4000	6,97
22% Poli caju - 13% PEG 4000	7,93
22% Poli caju - 13% PEG 1500	7,36
22,5% Poli caju - 13,8% PEG 1500	7,65

6- CONCLUSÕES

Os estudos visando a caracterização do sistema bifásico aquoso PEG/POLICAJU permitiram as seguintes conclusões:

- O POLICAJU demonstrou características diferentes de lotes isolados, entretanto apesar de cada lote apresentar características particulares, o comportamento das binodais dos diferentes lotes foram semelhantes.
- O aumento do peso molecular do PEG acarretou um deslocamento da binodal, sendo necessária uma menor concentração dos polímeros.
- A binodal permaneceu praticamente inalterada com o aumento da temperatura de 27 para 40°C, nos três sistemas estudados.
- Na faixa de pH estudada, não ocorreu um deslocamento significativo das binodais dos sistemas.
- Na maioria das condições testadas, quanto a variação de pH, diferentes "tie-lines" e diferentes massas moleculares do PEG, a tripsina se concentrou na fase inferior.
- O coeficiente de partição da proteína diminuiu com o aumento do peso molecular dos polímeros e com o aumento da "tie-line", de uma forma geral.
- A tripsina não demonstrou um comportamento uniforme com o aumento da concentração de NaCl. Mas a análise da ausência e presença do sal em cada concentração separadamente, demonstra que, a presença de sal para os sistemas com PEG 4000 e 8000, ocorre um aumento do coeficiente de partição, enquanto que para o PEG 1500 foi observado uma tendência contrária.

- O efeito do aumento da temperatura acarretou um aumento do K para os sistemas com PEG 1500 e o inverso para os sistemas com PEG 8000. Com o PEG 4000, com exceção da primeira "tie-line" ocorreu uma diminuição do K.

- O sistema PEG/ POLICAJU é viável, comparando com os demais estudados, sendo o sistema PEG 8000 9% / POLICAJU 16 % o de menor custo.

7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O sistema PEG/POLICAJU mostrou-se bastante viável tanto economicamente como tecnicamente, para a purificação da proteína modelo escolhida. A possibilidade de estudar o comportamento de outras biomoléculas neste sistema, bem como aprofundar o conhecimento das variáveis envolvidas na partição destas proteínas é bastante interessante. Existindo também a possibilidade da aplicação deste sistema no processo contínuo e sua utilização em larga escala.

A modificação química do polissacarídeo da goma do cajueiro, com ligantes específicos para biomoléculas é um outro campo possível de estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.-Å. *Nature*, v.182, p. 709, 1958.

ALBERTSSON, P.-Å. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**, 2 ed, Wiley, New York, 1971.

ALBERTSSON, P.-Å. **Advances in Protein Chemistry**, v. 24, p. 309, 1970.

ALBERTSSON, P.-Å. History of aqueous polymer two-phase partition. WALTER, H., BROOKS, D.E. and FISHER, D. (Eds.) **Partition in aqueous two phase systems**. Academic Press, Orlando, Fla, p.1-8, 1985.

ALBERTSSON, P.-Å. **Partition of cell particles and macromolecules**, 3 ed, Wiley, New York, 1986.

ALBERTSSON, P.-Å., NYNS. Ed. **J. Arkiv Kemi**, v. 17, p. 197, 1961.

ALBERTSSON, P.-Å., NYNS, Ed. **J. Nature**, v. 184, p. 1465, 1959.

ALBERTSSON, P.-Å., SASAKAWA, S., WALTER, H. **Nature**, v. 228, p. 1329, 1970.

ALMEIDA, M. C., VENÂNCIO, A., TEIXEIRA, J. A., AIRES-BARROS, M. R. Cutinase purification on poly(ethylene glycol)-hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 151-159, 1998.

ANANTHAPADMANABHAN, K. P., GODDARD, E. D., **J. Colloid Interf. Sci.**, v. 113, p. 294, 1986.

- ANDERSON, D. M. W., BELL, P. C.; MILLAR, J. R. A. Composition of gum exudatos from *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, oxford, v.13, p. 2189-2193, 1974.
- ANDERSON, D. M. W., BELL, P. C. Structural analysis of the gum polysaccharide from *Anacardium occidentale*, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 79, p. 185-197, 1975.
- ATHA, D. H., INGHAM, K. C. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analyses in terms of excluded volume, **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 12108-12117, 1981.
- BANDEIRA, C. T. **Relatório Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - CNPCa**, v. 6, p. 1-2, 1991.
- BASKIS, J. N. **Thermodynamics of the Separation of Biomaterials in Two-Phase Aqueous Polymer Systems**. Ph.D. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 1988.
- BEIJERINCK, M. W. **Kolloid-Z.**, v. 7, p. 16, 1910.
- BEIJERINCK, M. W. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr, Abt 2**, 2, p. 627-698, 1896.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRØNSTED, J. N. Z. **Phys. Chem. A.**, 2571, 1931.
- BRØNSTED, J. N. Z., WARMING, E., Z. **Phys. Chem. A.**, 155, 343, 1931.

- BUITELAAR, R. M., LEENEM, E.J.T.M., TRAMPER, J. Growth and secondary metabolite production by hairy roots of *Tagetes patula* in aqueous two-phase systems. **Biocatalysis**, v. 06, p. 73-80, 1992.
- CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems: In **Recovery process for biological materials**, JOHN WILEY and SONS Ltd (eds), New York, p. 273-301, 1993.
- CASTRO, M. J. M., CABRAL, J. M. S. **Biotechnol. Adv.**, v. 6, p. 151, 1988.
- CHEN, J.-P., LEE, M.-S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 1021-1027, 1995.
- CHEN, J.-P., WANG, C.-H. Lactose Hydrolysis by β -galactosidase in aqueous two-phase systems, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, p. 168-175, 1991.
- CHRISTIAN, T. J., MANLEY-HARRIS, M., RICHARDS, G. N. A preliminary study of the use larch arabinogalactan in aqueous two-phase systems, **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 7-12, 1998.
- CORDES, A., KULA, M.-R. Process design for large scale purification of formate dehydrogenase from *Candida biondii* by affinity partition, **J. Chromatogr.**, v. 376, p. 375-384, 1986.
- CRAIG, L.C., CRAIG, D. **Techniques of Organic Chemistry**, Weissberger (Eds.), Interscience, New York, v. 4, 1956.
- DATAR, R. Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering, **Process Biochemistry**, v. 21, p. 19-26, 1986.
- DIAMOND, A. D., HSU, J.T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation, **Advances in Biochemistry Engineering**, v. 47, p. 89-135, 1992.

- DOBRY, A., BOYER-KAWENOKI, F. J. **Polymer Sci.**, 2, 90, 1947.
- EKBERG, B., SELLERGREN, B., ALBERTSSON, P.-Å. **J. Chromatogr.**, v. 333, p. 211-214, 1985.
- FLORY, P. J. **J. Chem. Phys.**, v. 9, p. 660, 1941.
- FLORY, P. J. **Principles of Polymer Chemistry**, Cornell University Press, Ithaca, New York, 1953.
- FRANCO, T.T. **Use of modified proteins in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity and charge**, 1992, 184p. Thesis submitted to the University of Reading, Faculty of Agriculture and Food, Department of Food Science and Technology, University of Reading, 1992.
- FORCINITI, D., HALL, C. K. Theoretical Treatment of Aqueous Two-Phase Extraction by Using Virial Expansions. ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington, DC, v. 419, p. 53-70, 1990.
- FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M. R. Temperature dependence of the partition coefficient of proteins in aqueous two-phase systems, **Bioseparation**, v. 2, p. 115-128, 1991.
- FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M. R. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 986-994, 1992.
- GROßMANN, C., TINTINGER, R., ZHU, J., MAURER, G. Partitioning of some amino acids and low molecular peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dipotassium hydrogen phosphate, **Fluid Phase Equilibria**, v. 137, p. 209-228, 1997.
- GROßMANN, C., TINTINGER, R., ZHU, J., MAURER, G. Partitioning of low molecular combination peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran in the

- presence of small amounts of K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer at 293 K: experimental results and predictions, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 699-711, 1998.
- HACHEM, F., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 507-517, 1996.
- HATTON, T. A. **Comprehensive Biotechnology**, COONEY, C. L. and HUMPHREY, A. E. (Eds.), Pergamon Press, Oxford, v. 2, p. 439-448, 1985.
- HERNANDEZ-JUSTIZ, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TERRENI, M.; GUISAN, J. M. Using of aqueous two-phase systems for in situ extraction of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 73-79, 1998.
- HUDDLESTON, J. G., OTTOMAR, K. W., NGONYANI, D. M., LIDDIATT, A. Influence of system and molecular parameters upon fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition, **Enzyme Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 24-32, 1991.
- HUGGINS, M. L. J. **Chem. Phys.**, v. 9, p. 440, 1941.
- HUSTED, H.; KRONER, K. H.; SCHUTTE, H. & KULA, M.R. Extractive purification of enzymes, 3 Rotherburger Fermentation, Symposium "Enzyme Technology" (R.M. Lafferty, ed) Springer-Verlag, p. 135-145, 1983.
- JOHANSSON, G. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 221, p. 387, 1970.
- JOHANSSON, G., JOELSSON, M. Preparation of cibacron blue F3GA (polyethylene glycol) in large scale for use in affinity partitioning, **Biotechnol. Bioeng.**, v.27, p. 621-625, 1985.

- JOHANSSON, G., HARTMAN, A. **Proc. International Solvent Extraction Conference**. Lyon, Soc. Chem. Industries, v. I, p. 927-942, 1974.
- KIM, C. W., PhD Thesis, Massachussets Institute of Technology, Cambridge, MA, 1986.
- KONDO, A., URABE, T., HIGASHITANI, K. Bioconversions in an aqueous two-phase system using enzymes immobilized on ultrafine silica particles, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 700-703, 1994.
- KRONER, K. H., HUSTED, H., KULA, M.-R. Extractive enzyme recovery: economic considerations, **Process Biochemistry**, v. 19, p. 179-189, 1984.
- KRONER, K. H., HUSTED, H., KULA, M.-R. Evaluation of crude dextran as phase forming polymer for the extraction of enzymes in aqueous two-phase systems in large scale, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 24, p. 1015-1045, 1982.
- KULA, M. R. **Comprehensive Biotechnology**, COONEY, C. L. and HUMPREY, A. E. (eds), Pergamon Press, New York, v. 02, p. 451-471, 1985.
- KULA, M. R., KRONER, K. H., HUSTED, T. H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction, **Advances in Biochemical Engineering**, v. 24, p. 73-118, 1982.
- LEE, Y. H., CHANG, N. H. Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an aqueous two-phase system, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69, p. 89-92, 1990.
- LIMA, V. P. M. S. **Cultura do Cajueiro do Nordeste do Brasil**, Banco do Nordeste do Brasil, ETENE, Fortaleza - Ceará, Brasil, p. 405 - 421, 1988.
- MARQUES, M. R., XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of Cashew tree gum exsudate. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, p.1431-1433, 1991.

- MATIASSON, B., LING, T. G. I. Extraction in aqueous two-phase systems for biotechnology. **Biochemistry and Biotechnology**, VENAL, N. S. and HUDSON, M. J. (Eds), p. 270-292, 1987.
- MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, CHRISTOPHER, J., GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.
- MILAS, M. **Polieletrólitos**, GROOTE, R. A. M. C. e Curvelo, A. A. S. (Eds.), USP, São Carlos, 1991; b) Rinaudo. M., Comunicação pessoal.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MILLER, J. N. B. **Industrial Gums**, Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, John Wiley & Sons (Eds.), v. 7, p. 589, 1987.
- MORITA, T., ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**. Padronização - Preparação - Purificação. Edgard Blücher LTDA (Eds), 2ª ed., 1986.
- MUKATA, S., HAYNES, C. A., PRAUSNITZ, J. M., BLANCH, H. W. Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems: enzymatic hydrolysis of casein proteins, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 195-206, 1992.
- NGUYEN, A. L., GROTHE, S., LUONG, H. T. Applications of pullulan in aqueous two-phase systems for enzyme production, purification and utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 341-346, 1988.

- NILSSON, H., KJELLÉN, G., LING, T. G. I., MATTIASSON, B. Reppal PES - A new starch derived polymer for applications in aqueous two-phase systems, **4th European Congress on Biotechnology**, Amsterdam, The Netherlands, p. 14-19, 1987.
- ORTIN, A., CEBRIAN, J. A., LÓPEZ-PÉREZ, M. J., JOHANSSON, G. An aqueous hydroxypropyl starch-poly(ethylene glycol) two-phase system for extraction of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin from bovine whey. **Bioseparation**, v. 2. P. 197-205, 1991.
- PARK, K.-M, WANG, N. S. α -Amylase fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* in an aqueous two-phase system, **Biotechnol. Prog.**, v. 7, p. 439-444, 1991.
- PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale L.* **Carbohydrate polymers**, v.26, p. 177-181, 1995.
- POLSON, A., POTGIETE, G. M. LARGIER, J. F., MEARS, G. E. F., JOUBERT, F. J. **Biochemical and Biophysical Acta**, v.82, p. 463, 1964.
- PONTES, U. R. **Rev. Farm. Bioquim.**, v. 2, p. 83-91, 1971.
- QUEIROZ, J. A., GARCIA, F. A. P., CABRAL, J. M. S. Partitioning of *Chromobacterium viscosum* lipases in aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, v. 5, p. 307-311, 1995.
- RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), **Polímeros: ciência e tecnologia**, ano III, n^o1, p. 31-36, 1993.
- SARMENTO, M. J. **Extração líquido-líquido de uma proteína recombinante, citocromo b₅, utilizando sistemas de duas fases aquosas**. Lisboa, 1994. Tese de Mestrado em Biotecnologia, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 1994.

- SASAKAWA, S., WALTER, H. Partition behavior of native proteins in aqueous dextran-poly(ethylene glycol)-phase systems, **Biochemistry**, v. 11, n. 15, p. 2760-2765, 1972.
- SCHMIDT, A. S., VENTOM, A. M., ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems, **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, n. 15, p. 131-142, 1994.
- SEBASTIÃO, M. J., MARTEL, P., BAPTISTA, A., PETERSEN, S. B., CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M. R. Predicting the partition coefficients of a recombinant cutinase in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 248-257, 1997.
- SHANBHAG, V. P., AXELSSON, C. G. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 61, p. 1141-1146, 1974.
- SHANBHAG, V. P., AXELSSON, C. G. **Eur. J. Biochem.**, v. 60, p. 17-22, 1975.
- SHANBHAG, V. P., JOHNSON, G. **Biochim. Biophys. Res. Comm.**, v. 61, 1141, 1974.
- SKUSE, D. R.; NORRIS-JONES, R.; YALPANI, M. & BROOKS, D. E. Hydroxypropyl cellulose / poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: system characterization and partition of cells and proteins, **Enzyme Microb. Technol.**, v. 14, p. 785-790, 1992.
- SKOOG, B. Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations. **Journal of Blood Trans. Immunopathol.**, v. 37, n. 6, p. 345-349, 1979.
- STURESSON, S.; TJERNELD, F.; JOHANSSON, G. Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol), **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.3, n.26, p. 281-295, 1990.
- SZLAG, D. C., GIULIANO, K. A. A low cost aqueous two-phase system for enzyme extraction. **Biotechnology Techniques**, v.2, p. 277-282, 1988.

- TINTINGER, R., ZHU, J., GROßMANN, C., MAURER, G. Partitioning of some amino acids and low molecular mass peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran in the presence of small amounts of K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer at 293 K: experimental results and predictions, **J. Chem. Eng. Data**, v. 42, p. 975-984, 1997.
- TJERNELD, F. **New polymers for aqueous two-phase systems**, FISHER, D. and SUTHERLAND, I. A (Eds.), Plenum Press, New York,, p. 429-438, 1989.
- TJERNELD, F. **Poly(ethyleneglycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications**, HARRIS, J. M. (Eds.), Plenum Press, New York,, p. 115-128, 1992.
- TJERNELD, F., BERNER, S., CAJARVILLE, A. E., JOHANSSON, G. New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification, **Enzyme Microbiology Technology**, v. 8, p. 417- 423, 1986.
- VENÂNCIO, A. A. D., TEIXEIRA, J. A., MOTA, M. Evaluation of crude hydroxypropil starch as a bioseparation aqueous two-phase-forming polymer, **Biotechnology Progress**, v. 09, p. 635-639, 1993.
- VENÂNCIO, A., ALMEIDA, C., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, A. Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two-phase system, **Bioseparation**, v.5, p. 253-258, 1995.
- VIDEIRA, M., AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate, **Journal of Chromatography A**, n. 668, p. 237-240, 1994.
- WALTER, H., SASAKAWA, S., ALBERTSSON, P.-Å. **Biochemistry**, 11, 3880, 1972.
- ZASLASVSKY, B.Y. **Aqueous two-phase partitioning - Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**, Merceel Dekker, Inc. New York, 1995.

ZASLAVSKY, B. Y., BAGIROV, T. O., BOROVS KAYA, A. A., GULAEVA, N. D., MIHEEVA, L. H., MAHMUDOV, A. U., RODNIKOVA, M. N. **Polymer**, v. 30, p. 2104, 1989.

ZIJLSTRA, G. M., GOOIJER, C. D., POL, L. A. V., TRAMPER, J. Design of aqueous two-phase systems supporting animal cell growth: a first step toward extractive bioconversions, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 2-8, 1996.

9- ADENDO

Durante o decorrer deste trabalho, auxiliamos em outras pesquisas e seus resultados foram submetidos para a publicação e apresentados em Congresso:

L. A. OLIVEIRA, L. A. SARUBBO, A. L. F. PORTO, J. L. LIMA-FILHO, J. M. L. MENESTRINA, M. IACOMINI, G. M. CAMPOS-TAKAKI, E. B. TAMBOURGI. **Preliminary study of a new aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol**, XXVIII Reunião Anual SBBq 99, Caxambu, MG, 22 a 25 de maio de 1999.

L. A. SARUBBO, L. A. OLIVEIRA, A. L. F. PORTO, H. S. DUARTE, A. M. A. CARNEIRO-LEÃO, J. L. LIMA-FILHO, G. M. CAMPOS-TAKAKI, E. B. TAMBOURGI. **New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol)**, 11th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Gulf State Park Resort Hotel and Convention Center - Gulf Shores, Alabama, USA, 27 de junho a 2 de julho de 1999.