

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

*Este exemplar  
corresponde à versão  
corrigida e aprovada,  
desta Tese.*

*Campinas, 16 de abril de 1990*

*Fernando Galembek*

**USO DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS  
NO FRACIONAMENTO E CONCENTRAÇÃO  
DE PROTEÍNAS E ÍONS.**

*Tese de Doutorado*

*Maria do Carmo Gonçalves*

*Orientador: Prof. Dr. Fernando Galembek*

**Campinas  
1990**

## AGRADECIMENTOS

- ao Prof. Dr. Fernando Galembeck pela orientação, incentivo e amizade;
- ao Prof. Dr. H. Masuda pela orientação do primeiro capítulo desta tese;
- à Japan International Cooperation Agency pela bolsa concedida;
- ao CNPq e FAPESP pelos recursos utilizados neste trabalho;
- aos meus professores;
- aos meus amigos;
- aos meus pais;
- ao Walter.

## RESUMO

Este trabalho está dividido em três partes.

A primeira delas descreve a obtenção de membranas assimétricas de blendas de polisulfona - poli(vinilpirrolidona), através do processo de inversão de fase e para utilização em ultrafiltração. As membranas foram caracterizadas através de medidas de fluxo e retenção de soluções de polietileno glicóis e de dextranas, com diferentes pesos moleculares, e também por microscopia eletrônica de varredura. Os cortes obtidos para estas membranas variam entre  $4 \times 10^3$  a  $2 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup> e dependem, principalmente, da composição da solução de partida e do tratamento feito na membrana após a formação do filme.

Na segunda parte é demonstrada a possibilidade prática de fracionamento e concentração de proteínas de soro, em função de suas massas molares, utilizando-se para isto as seguintes técnicas de membrana: ultrafiltração centrífuga, osmocentrifugação e ultrafiltração em múltiplo estágio. Esta última técnica consiste na centrifugação do soro a 3000 rpm e durante 1 hora, em dispositivos que possuem três membranas com diferentes cortes. Ocorre assim o fracionamento das proteínas do soro ao mesmo tempo em que os componentes retidos são concentrados.

A última parte do trabalho trata da investigação da formação de gradientes de íons sódio e potássio em soluções de polieletrólitos, submetidos à osmocentrifugação. Os gradientes gerados dependem da concentração de polieletrólito, da concentração total de íons e do tempo de centrifugação. De forma geral, os gradientes de potássio são mais acentuados do que os de sódio. Conclui-se que a osmocentrifugação é uma técnica útil também no fracionamento de solutos de baixa massa molar, tais como íons.

## ABSTRACT

This thesis is divided in 3 parts.

The first part describes the performance of polysulfone - poly(vinylpyrrolidone) blend membranes prepared by phase inversion and intended to be used in ultrafiltration. These membranes were characterized by scanning electron microscopy and by permeability measurements of aqueous solutions of poly(ethylene glycols) and dextrans, covering a range of MW's. The molecular weight cutoffs of these membranes varied from  $4 \times 10^3$  to  $2 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>. Membrane cutoff are mainly dependent on the casting solution composition and on the membrane post-casting treatment.

The second part demonstrates the fractionation and concentration of serum proteins according to their molecular weights, by using three membrane techniques: centrifugal ultrafiltration, osmosedimentation and multistage ultrafiltration. This latter technique consists in serum centrifugation (e.g. during 1 hour at 3000 rpm), in cells fitted with three different MW-cutoff membranes. As a result, serum fractionation is obtained together with the concentration of the retained solutes.

The third part of this thesis describes the formation of sodium and potassium - ion concentration gradients by osmocentrifugation of polyelectrolyte solutions. The gradients thus obtained is dependent on the polyelectrolyte concentration, total ions concentration and centrifugation time. Concentration gradients of potassium ions are always greater than those of sodium ions. These results demonstrate the potential usefulness of osmocentrifugation in the fractionation of low-MW solutes, according to their molecular weights.

## ÍNDICE

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
I. MEMBRANAS DE POLISULFONA-POLIVINILPIRROLIDONA	
I.1. Introdução	01
I.1.1. Membranas sintéticas	01
I.1.2. Formação de membranas sintéticas	03
I.1.3. Mecanismos de formação de membranas microporosas	05
I.1.4. Objetivo	12
I.2. Parte experimental	13
I.2.1. Materiais e equipamentos	13
I.2.2. Preparação das membranas	13
I.2.3. Tratamento das membranas	14
I.2.4. Soluções utilizadas em experimentos de ultrafiltração	15
I.2.5. Equipamento de ultrafiltração	16
I.2.6. Experimentos de ultrafiltração	17
I.2.7. Microscopia eletrônica de varredura	18
I.3. Resultados e discussão	18
I.3.1. Efeito do tempo de evaporação e do aquecimento	19
I.3.2. Efeito da variação da composição de PVP	20
I.3.3. Efeito dos tratamentos posteriores à coagulação	26
I.3.4. Efeito da massa molar de PVP	27
I.3.5. Ultrafiltração de proteínas	31

II.	MÉTODOS DE FRACIONAMENTO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO	36
II.1.	Introdução	36
II.1.1.	Precipitação fracionada	37
II.1.2.	Cromatografia de permeação em gel	39
II.1.3.	Ultrafiltração	43
II.1.4.	Polarização em ultrafiltração	47
II.1.5.	Ultrafiltração centrífuga	52
II.1.6.	Ultrafiltração centrífuga em múltiplo estágio	53
II.1.7.	Osmossedimentação e osmocentrifugação	54
II.1.8.	Objetivo	56
II.2.	Parte experimental	57
II.2.1.	Materiais e equipamentos	57
II.2.2.	Celas de ultrafiltração centrífuga e osmocentrifugação	58
II.2.3.	Membranas	59
II.2.4.	Experimentos de ultrafiltração e de osmocentrifugação	61
II.2.5.	Experimentos de concentração	61
II.2.6.	Caracterização das frações por cromatografia de permeação em gel	64
II.2.7.	Calibração da coluna	65
II.2.8.	Ultrafiltração centrífuga de soro fetal bovino	67
II.2.9.	Osmocentrifugação de soro fetal bovino	68
II.2.10.	Ultrafiltração centrífuga de soro bovino adulto	71
II.2.11.	Ultrafiltração centrífuga em múltiplo estágio	74
II.2.12.	Efeito de condições de centrifugação nos fatores de separação	79

II.2.13.	Gradientes de concentração e fatores de separação na solução retida em ultrafiltração centrífuga	80
II.3.	Discussão	84
II.3.1.	Membranas	84
II.3.2.	Fracionamento de proteínas	85
II.3.3.	Um modelo para descrever a remoção convectiva da camada de polarização	89
III. OSMOCENTRIFUGAÇÃO DE POLIELETRÓLITOS		
III.1.	Introdução	97
III.1.1.	Aspectos gerais	97
III.1.2.	Aplicações	99
III.1.3.	Propriedades de equilíbrio de soluções de polieletrólitos	100
III.1.3.1.	Tratamento teórico	100
III.1.3.2.	Estrutura de soluções de polieletrólitos	112
III.1.3.3.	Interações com íons	118
III.1.3.4.	Equilíbrio Donnan	120
III.1.4.	Propriedades de transporte de soluções de polieletrólitos	123
III.1.4.1.	Viscosidade	124
III.1.4.2.	Sedimentação	130
III.1.5.	Osmocentrifugação	138
III.1.6.	Plano fatorial	138
III.1.7.	Objetivo	142
III.2.	Parte experimental e resultados	143
III.2.1.	Materiais e equipamentos	143
III.2.2.	Membranas	143
III.2.3.	Celas de osmocentrifugação	144

III.2.4.	Neutralização de ácido poliacrílico	146
III.2.5.	Experimentos de osmocentrifugação	146
III.3.	Discussão	159
III.3.1.	Concentração total de contra-íons	160
III.3.2.	Efeito das variáveis	161
III.3.3.	Fracionamento de íons	162
III.3.4.	Implicações deste trabalho	163
III.4.	Apêndice - Lista de símbolos	165
IV.	CONCLUSÃO	168
V.	BIBLIOGRAFIA	169

## MEMBRANAS DE POLISULFONA - POLI(VINILPIRROLIDONA)

### 1.1 - Introdução

#### 1.1.1 - Membranas sintéticas

Uma membrana sintética é uma interface que separa duas fases e restringe o transporte de várias espécies químicas de maneira específica. A transferência de massa através de uma membrana pode ser causada por difusão de moléculas individuais (em alguns casos agregados) ou por fluxo convectivo induzido por um campo elétrico, ou gradiente de concentração, pressão ou temperatura. Revisões importantes nesta área foram publicadas por Strathmann [1], Lonsdale [2], Pusch [3, 4, 5] e Cabasso [6].

As membranas sintéticas podem variar significativamente em suas estruturas e funções, dependendo da área de aplicação. Na tabela 1 são resumidas as propriedades e aplicações de membranas tecnicamente relevantes.

Uma classificação existente para membranas é dada em função do mecanismo de separação a ela associada. Existem, essencialmente, três mecanismos de separação [3, 4]:

- separação baseada em diferenças de tamanho molecular dos permeantes (efeito peneira).
- separação baseada em diferenças de carga das substâncias a serem separadas (sais ou íons de valência diferentes, misturas de eletrólitos e não eletrólitos) (efeito eletroquímico)
- separação dependendo de diferenças de solubilidade das substâncias na fase da membrana, ocasionadas por características físico-químicas diferentes das substâncias a serem separadas (efeito de solubilidade).

Tabela 1 - Membranas sintéticas: estrutura, preparação e aplicação [1]

Tipo de membrana	Material formador	Preparação	Aplicação
Membranas cerâmicas e metálicas. poros: 0,05 a 20 $\mu\text{m}$	argila, sílica, grafite, alumínio, óxido de prata e tungstênio.	Moldagem e sinterização das partículas	filtração em temperaturas elevadas
Membranas poliméricas sinterizadas poros: 0,1 a 20 $\mu\text{m}$	teflon, polietileno e polipropileno	Moldagem e sinterização de partículas poliméricas	filtração de suspensões, filtração de ar
Membranas poliméricas estiradas. poros: 0,1 a 5 $\mu\text{m}$	teflon, polietileno	Estiramento de um filme polimérico	filtração de ar, filtração de solventes orgânicos
Membranas perfuradas poros: 0,02 a 20 $\mu\text{m}$	policarbonato, poliéster	Irradiação do polímero e tratamento com ácido	filtração de suspensões, esterilização de soluções biológicas
Membranas microporosas poros: 0,1 a 10 $\mu\text{m}$	ésteres celulósicos, polisulfona, poliamida	Espalhamento de uma solução polimérica e coagulação do polímero com um não-solvente	esterilização, purificação de água, diálise, ultrafiltração de soluções moleculares
Compositos	ésteres celulósicos, polisulfona, poliamida	Deposição de um filme homogêneo sobre uma estrutura porosa	osmose reversa e separação de soluções moleculares
Membranas homogêneas	borracha de sílica	Extrusão de um filme homogêneo ou evaporação de solvente	separação de gás, pervaporação
Membranas de troca iônica	policloreto de vinila, polisulfona, polietileno	Imersão de uma resina de troca iônica em um polímero, ou sulfonação e aminação de um filme polimérico homogêneo	eletrodialise, dessalinização

## I.1.2 - Formação de membranas sintéticas

A formação de membranas sintéticas pode ser caracterizada pelos seguintes técnicas [7]:

1. Formação de um filme polimérico por extrusão de um material polimérico, por evaporação do solvente de uma solução polimérica ou por polimerização in-situ e condensação.
2. Formação de uma membrana polimérica microporosa por inversão de fase.
3. Produção de uma membrana inorgânica de superfície modificada (vidro ou  $ZrO_2$ , capilares de carbono) ou de finas placas porosas de materiais inorgânicos, tais como laminados de mica, onde poros são criados por bombardeamento de íons e subsequente extração (etching).

A formação de filmes a partir de soluções de polímero de acordo com o método 1 geralmente produz membranas homogêneas, sem poros.

Uma membrana homogênea consiste de um filme denso, através do qual uma mistura de espécies químicas é transportada sob gradiente de pressão, concentração ou potencial elétrico. A separação dos vários componentes na solução é diretamente relacionada a sua taxa de transporte dentro da fase da membrana, que é determinada por sua difusividade e concentração na matriz da membrana. Uma importante propriedade de membranas homogêneas é que espécies químicas de tamanhos similares e portanto de mesmas difusividades, podem ser separadas quando sua concentração, isto é, sua solubilidade na membrana difere substancialmente. Um representante típico de uma membrana homogênea é um filme de borracha de sílica.

Membranas porosas podem ser produzidas pelo método 1 somente quando se utiliza sistemas heterogêneos (p. ex., adicionando

substâncias que possam ser posteriormente extraídas). Mais ainda, é possível criar poros em um filme polimérico, isto é, por estiramento do filme ou bombardeamento com fragmentos ou metais pesados induzidos por neutrons e subsequente lixiviação.

O processo de inversão de fase (mecanismo 2) geralmente produz membrana microporosa do tipo simétrico ou assimétrico.

A distinção entre membranas simétricas e assimétricas é feita em função da distribuição de poros em sua estrutura. Em membranas simétricas os poros são distribuídos uniformemente ao longo da secção transversal da membrana, não existindo variações muito grandes de tamanho de poros. A estrutura de uma membrana assimétrica é formada por uma camada polimérica fina e densa (de 0,1 a 2  $\mu\text{m}$ ) sobre uma sub-camada espessa e altamente porosa (de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de espessura). A sub-camada atua como um suporte e geralmente não afeta as características de separação ou a taxa de filtração da membrana em processos que utilizam pressão como força propulsora de fluxo. Como a velocidade de filtração em processos de osmose reversa e de ultrafiltração são inversamente proporcionais à espessura da camada filtrante, membranas assimétricas mostram melhor desempenho que membranas simétricas.

A maioria das membranas sintéticas disponíveis comercialmente é produzida pelo processo de inversão de fase. Neste processo, uma solução polimérica homogênea é levada à separação de fase por meio da entrada de um não-solvente e saída de solvente. Os procedimentos possíveis são:

a) o não-solvente, que atua como um agente coagulante, é colocado em contato com a solução polimérica na fase vapor.

b) a solução polimérica é preparada juntamente com o não-solvente e

deixada evaporar. O solvente é selecionado de tal forma que seja preferencialmente evaporado da solução.

c) a solução polimérica é espalhada na forma de filme e diretamente, ou após um tempo de evaporação, mergulhada em um banho de coagulação contendo o não-solvente (em geral água), que por sua vez é miscível com o solvente utilizado na preparação da solução polimérica.

Cada um dos procedimentos citados acima conduz a estruturas específicas de membranas microporosas. A coagulação a partir de vapor (a) leva a membranas simétricas, enquanto que o processo de evaporação total (b) e de imersão-coagulação (c) resultam em membranas assimétricas.

### I.1.3 - Mecanismos de formação de membranas microporosas

No processo de imersão-coagulação, uma solução polimérica espalhada sobre uma superfície (p. ex., uma placa de vidro) é imersa em um banho contendo o não-solvente. No trabalho de Wijmans [9] é considerado que a camada filtrante é formada por gelificação e que a camada porosa (suporte) é resultado de separação de fase líquido-líquido, por mecanismo de nucleação e crescimento. O fator determinante do tipo de separação de fase envolvido é a concentração local de polímero, no momento da coagulação.

No primeiro instante, após a imersão existe um rápido esgotamento de solvente do filme e uma penetração de não-solvente relativamente pequena (figura 1). Isto significa que a concentração do polímero na interface filme-banho aumenta e que a fronteira é atravessada no sentido 1 (transição de III para I). A camada de gel

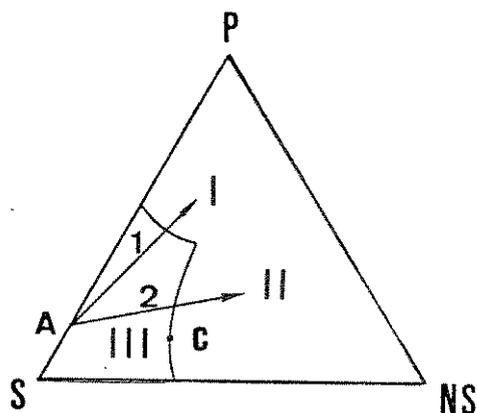


Figura 1 - Diagrama de fase ternário. A: solução polimérica de partida; P: polímero; S: solvente; NS: não-solvente; C: ponto crítico; I - gelificação; II - separação de fase líquido-líquido; III - solução homogênea [9].

fina e densa que é formada desta maneira, isto é, a camada filtrante, irá atuar como uma resistência à difusão do solvente da solução polimérica para o não-solvente. Abaixo desta camada, a separação irá ocorrer em uma concentração baixa de polímero e alta de não-solvente. Neste caso, o tipo de separação será separação de fase líquido-líquido no sentido 2 (transição de III para II).

No caso de coagulação em presença do não-solvente na fase vapor, a solução polimérica de partida entra em contato com a fase vapor saturada com o solvente usado na preparação da solução polimérica. Neste processo, não ocorre saída de solvente da solução, mas somente entrada de não-solvente. Assim, o único mecanismo possível de separação é dado por separação líquido-líquido (sentido 2) e o resultado é a formação de uma membrana microporosa sem a camada densa, ou seja, simétrica.

No modelo proposto, a direção das etapas de coagulação e, portanto, a razão de entrada de não-solvente e saída de solvente, são muito importantes na estrutura da membrana resultante.

Frommer e Lancet [7] estudaram os fatores que governam a formação de poros em membranas assimétricas de acetato de celulose. Os resultados obtidos comprovaram que a formação de grandes cavidades na estrutura da membrana está relacionada com a alta velocidade de coagulação (alta velocidade de entrada do não solvente) e depende da natureza do solvente utilizado na solução de partida. A mudança no tipo de solvente leva à mudança nos seguintes parâmetros: i) velocidade de saída de solvente; ii) velocidade de penetração do não-solvente (água) e iii) concentração de água necessária para coagular o acetato de celulose da solução de partida.

A velocidade de precipitação depende da tendência do solvente puro e do não-solvente em se misturarem e também da volatilidade do solvente utilizado. Foi verificado que aumentando-se a tendência de mistura, a velocidade de coagulação do polímero é aumentada, levando à formação de poros maiores na estrutura da membrana. Quando a solução polimérica é preparada com um solvente volátil (p.ex., acetona) a velocidade de precipitação é mais lenta. Isto é explicado em termos de contração do filme de polímero-acetona anterior à separação de fase, o que acarreta diminuição da velocidade de penetração do não-solvente. O tipo de estrutura encontrada é mais densa que em membranas preparadas a partir de solventes menos voláteis.

Na coagulação de filmes planos, parte da contração da fase polimérica que acompanha a separação de fase pode ser compensada por uma redução uniforme da sua espessura. A contração do filme é dada pela variação da espessura do filme espalhado inicialmente (300  $\mu\text{m}$ , em

geral), em relação à espessura do filme coagulado (entre 60 e 80  $\mu\text{m}$ , para a solução de acetato de celulose e acetona).

Outro parâmetro estudado neste trabalho é a influência do período de exposição ao ar sobre a estrutura da membrana. A espessura da camada superior (camada filtrante, mais densa) aumenta com o aumento no período de evaporação do solvente, anterior à imersão no banho de coagulação. O processo que ocorre durante a imersão de um filme parcialmente gelificado é diferente daquele que ocorre durante a imersão da solução recém espalhada. Desta forma a membrana resultante pode conter desde estrutura porosa assimétrica até simétrica, dependendo apenas do período de evaporação.

Strathmann e Kock [10, 11] também discutiram a formação de membranas simétricas e assimétricas obtidas por coagulação de uma solução polimérica. Estes autores interpretaram as estruturas obtidas por microscopia eletrônica em função de aspectos termodinâmicos e cinéticos associados ao processo de separação de fase. Uma explicação satisfatória para a formação de membranas porosas é apresentada a seguir, sem utilizar o mecanismo de gelificação proposto anteriormente.

Durante a formação da membrana o sistema muda da composição A, que representa a solução inicial de polímero, para a composição C, que representa a membrana final. Na composição C duas fases estão em equilíbrio, uma fase sólida (rica em polímero) que forma a estrutura da membrana, representada pelo ponto E, e uma fase líquida (pobre em polímero) que constitui os poros das membranas preenchidos com não-solvente. O ponto B ao longo do caminho é a concentração na qual tem início a coagulação do polímero e o ponto D representa a composição na qual a solução gelifica. Durante a coagulação, mais

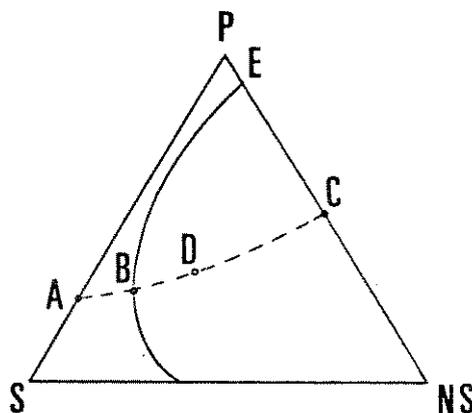


Figura 2 - Diagrama de fase de um sistema polímero-solvente - coagulante, mostrando o caminho de coagulação de uma solução polimérica durante a formação da membrana [10].

solvente é perdido e a viscosidade da fase rica em polímero aumenta. Em um dado ponto, a viscosidade é suficientemente alta e o polímero é considerado como um sólido (ponto D).

Duas diferentes técnicas são representadas na figura 3 para coagulação de membranas. No primeiro método o coagulante é introduzido a partir da fase vapor. Neste caso a coagulação é muito lenta, originando uma estrutura homogênea. Esta estrutura pode ser analisada quando são consideradas mudanças de concentração de solvente e de não-solvente durante o processo de coagulação. A etapa limitante do transporte de não-solvente dentro da solução é dada por uma difusão lenta na fase adjacente à superfície do filme. Isto produz um perfil de concentração uniforme no interior do filme e toda a solução polimérica coagula praticamente ao mesmo tempo. Em uma escala microscópica aparecem áreas de concentrações altas e baixas de polímeros devido aos centros de nucleação formados.

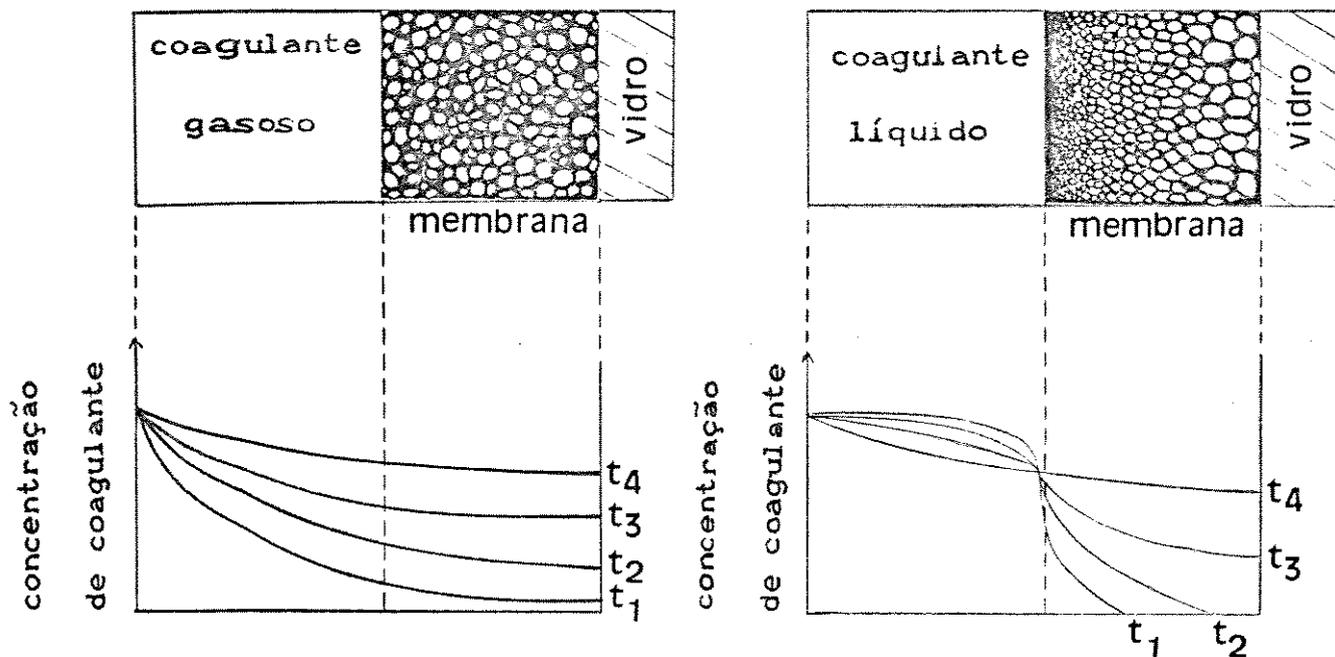


Figura 3 - Perfil de concentração do coagulante na solução polimérica durante tempos diferentes de formação da estrutura da membrana [10].

No segundo procedimento de preparação de membrana, o coagulante é adicionado por imersão do filme polimérico em um banho líquido. Neste caso a coagulação é muito rápida, levando à formação de uma membrana com camada densa. A característica mais importante aqui é que os gradientes de concentração de todos os componentes são bastante acentuados na interface membrana-coagulante. Quando o filme é mergulhado no coagulante o solvente difunde para a solução coagulante e este penetra no filme. Na superfície do filme a

concentração do coagulante logo atinge um valor que leva à separação de fase. No interior, entretanto, a concentração de polímero está ainda distante da concentração limite para a separação de fase. Assim, a separação de fase ocorre inicialmente na superfície do filme, onde, devido ao acentuado gradiente de potencial químico do polímero, existe movimento do mesmo na direção perpendicular à superfície. Este efeito causa um aumento da concentração de polímero na camada superficial, formando a camada densa da membrana assimétrica. Tal camada limita o transporte de coagulante dentro da solução e os perfis de concentração no interior da solução se tornam menos acentuados.

Os mecanismos de formação de membranas microporosas apresentados acima foram discutidos a partir da interpretação de diagramas de fase clássicos. Uma análise detalhada do mecanismo envolvido na formação de estruturas em uma dada membrana depende não só do conhecimento do diagrama de fase do sistema, mas também da cinética de separação de fase do processo de coagulação.

Membranas microporosas podem também ser produzidas a partir de uma blenda de diferentes polímeros [12, 13]. Uma blenda polimérica homogênea é formada por dois ou mais polímeros miscíveis. Esta miscibilidade possibilita a obtenção de um material que combine as propriedades dos polímeros que compõem a blenda. Entretanto, a grande maioria dos polímeros são termodinamicamente incompatíveis, exceto em alguns casos onde existem interações específicas [14].

Um exemplo de membrana polimérica obtida a partir de uma blenda é o par miscível de poli(fluoreto de vinilideno) e poli(acetato de vinila), que combina polímero hidrofóbico e hidrofílico [15]. Também explorando esta característica, foram preparadas membranas a partir da blenda de polisulfona e poli(vinilpirrolidona) por Cabasso e

colaboradores [16, 17]. O trabalho deste autor envolveu a produção de suportes porosos de fibras ócas de polisulfona utilizando poli(vinilpirrolidona) ou poli(etilenoglicol) como aditivo para aumentar a viscosidade da solução polimérica. Um resultado interessante deste trabalho foi que a adição de poli(vinilpirrolidona) à polisulfona resultava em membranas mais permeáveis.

#### I.1.4 - Objetivo

O objetivo principal desta etapa do trabalho, foi desenvolver membranas de ultrafiltração de alta permeabilidade, a partir da blenda de polisulfona - poli(vinilpirrolidona). Outro objetivo foi investigar o efeito de tratamentos posteriores à coagulação sobre o desempenho da membrana obtida.

## 1.2 - Parte experimental

Os experimentos relatados neste capítulo foram conduzidos no Departamento de Membranas do National Chemical Laboratory for Industry, em Tsukuba, Japão, sob a orientação do Dr. H. Masuda [18].

### 1.2.1 - Materiais e equipamentos

Polisulfona, ( $\bar{M}_w = 46.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), Union Carbide, P 3500.

Poli(n-vinil 2-pirrolidona), ( $\bar{M}_w = 10.000, 24.500, 40.000 \text{ e } 1 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ), Tokyo Kasei.

N-metil 2-pirrolidona, Nakarai Chemicals Ltd.

Poli(etileno glicol) ( $\bar{M}_w = 1.000; 2.000; 4.000; 6.000 \text{ e } 20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), Tokyo Kasei.

Dextrana T500 e T2000 ( $\bar{M}_w = 5 \times 10^5 \text{ e } 2 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ), Pharmacia Fine Chemicals.

Albumina bovina (fração V), lote W 85412, Nakarai Chemicals.

Gamaglobulina bovina (fração II), n<sup>o</sup> 167-22, Povide Producten.

Analizador de Carbono Total, Shimadzu, TOC-500.

Cromatógrafo Líquido de Alta Pressão. Jasco, TRI-ROTAL III e coluna Toyo Soda, TSK GEL.

Microscópio Eletrônico de Varredura, Shimadzu, ASM-SX

### 1.2.2 - Preparação das membranas

As membranas testadas em experimentos de ultrafiltração foram obtidas a partir de soluções de polisulfona (PSf,  $\bar{M}_w = 46.000 \text{ e } \bar{M}_n =$

14.000  $\text{g.mol}^{-1}$ ) [19] e poli(vinilpirrolidona) (PVP,  $\bar{M}_w = 40.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), utilizando-se n-metil 2-pirrolidona (NMP) como solvente. As soluções foram preparadas dissolvendo-se inicialmente a poli sulfona e, em seguida, adicionando-se a poli(vinilpirrolidona). As membranas foram preparadas após a dissolução completa dos polímeros, utilizando-se para isto uma máquina de fabricação de membranas [20]. Esta máquina com pequenas alterações, foi posteriormente reproduzida e utilizada no laboratório da Unicamp, sendo descrita com detalhes na seção II.2.3.

A preparação das membranas na máquina é feita através do espalhamento da solução de polisulfona-poli(vinilpirrolidona) sobre placas de vidro, de maneira a formar um filme de solução com espessura inicial de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ . Este filme é, então, deixado evaporar durante um certo tempo em ambiente com umidade relativa inferior a 40%. Após a evaporação, a placa de vidro contendo a solução polimérica é mergulhada em um banho de água fria, à temperatura de aproximadamente 10°C. Em alguns casos a evaporação do filme foi acompanhada de aquecimento, utilizando-se para isto uma lâmpada de infravermelho (600 W) posicionada a uma altura de 60 cm. Após a coagulação em água fria, as membranas obtidas foram transferidas para um recipiente adequado e lavadas em corrente de água filtrada, durante um dia.

### I.2.3 - Tratamento das membranas

As membranas obtidas foram submetidas a 3 tipos de tratamentos que são indicados abaixo:

Tratamento	Condições experimentais
Secagem	2 hs. em estufa a 60°C e 2 hs. em vácuo a 60°C.
Extração do PVP	18 hs. em soxhlet com etanol a 80°C.
Extração do PVP e secagem	18 hs. em soxhlet com etanol, 2 hs. em estufa a 60°C e 2 hs. em vácuo a 60°C.

#### 1.2.4 - Soluções utilizadas em ultrafiltração

As membranas foram avaliadas quanto ao fluxo e retenção de várias soluções, em experimentos de ultrafiltração. Membranas não tratadas e membranas submetidas à secagem foram caracterizadas em experimentos de ultrafiltração com soluções 0,1% (m/m) de sulfato de sódio e 0,3% (m/m) de poli(etileno glicóis) ( $\bar{M}_w = 1.000; 2.000; 4.000; 6.000$  e  $20.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Por outro lado, as membranas submetidas à extração foram avaliadas quanto ao fluxo e retenção de soluções 0,3% (m/m) de dextranas ( $\bar{M}_w = 5 \times 10^5$  e  $2 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Poli(etileno glicóis) e dextranas são polímeros lineares disponíveis comercialmente em várias massa molares médias. Devido a sua solubilidade em água estes solutos são frequentemente utilizados na caracterização de membranas de ultrafiltração [21 - 23].

Após a realização dos experimentos de ultrafiltração descritos anteriormente, foram selecionadas as membranas mais adequadas à ultrafiltração de soluções 0,3% (m/m) de albumina ( $\bar{M}_w = 67.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e 0,3% (m/m) de gamaglobulina ( $\bar{M}_w = 169.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ).

## 1.2.5 - Equipamento de ultrafiltração

O equipamento utilizado em experimentos de ultrafiltração é apresentado esquematicamente na figura 4. Este equipamento abrange um recipiente onde cada solução utilizada para teste foi mantida sob pressão, agitada e termostaticada. Inicialmente, a membrana (área útil =  $12,6 \text{ cm}^2$ ) foi colocada sobre um suporte poroso de aço inoxidável e fixa à base do recipiente com o auxílio de parafusos. O recipiente foi preenchido com 1,4 litros de solução de alimentação e pressurizado com gás nitrogênio. A solução foi continuamente homogenizada por um agitador magnético a 700 rpm, posicionado a 5 mm acima da membrana.

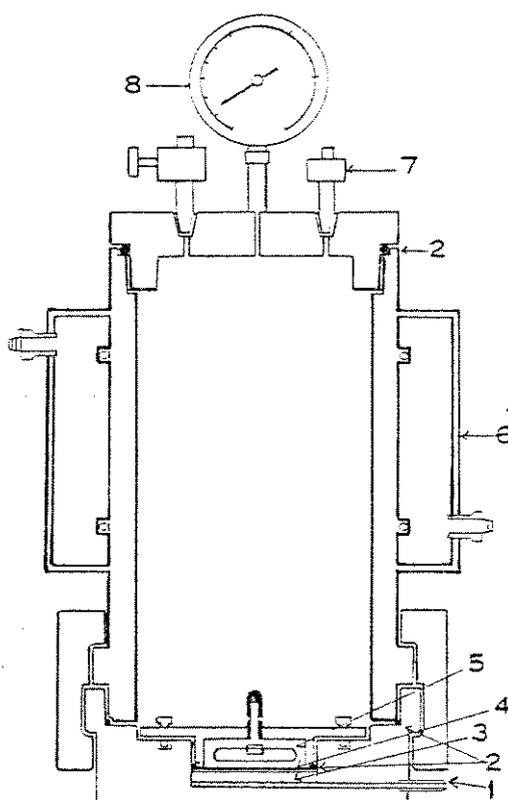


Figura 4 - Equipamento de ultrafiltração: 1 - saída de filtrado; 2 - O-ring; 3 - suporte de aço inoxidável sinterizado; 4 - membrana; 5 - agitador; 6 - camisa de termostatização; 7 - entrada de  $\text{N}_2$  gasoso; 8 - válvula de pressão.

## 1.2.6 - Experimentos de Ultrafiltração

A solução ultrafiltrada foi recolhida em uma proveta de 10 ml, medindo-se o tempo e assim determinando-se o fluxo de filtrado. A concentração desta solução foi determinada através de análise de carbono total em equipamento da Shimadzu.

Para misturas de proteínas, as concentrações de cada componente foram determinadas utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta pressão da Jasco, com colunas de gel da Toyo Soda.

Inicialmente, foi medido o fluxo de água destilada através de cada uma das membranas e posteriormente o fluxo e a concentração do filtrado para as diferentes soluções de alimentação, em ordem crescente de massa molar. O procedimento utilizado consistiu em desprezar os 10 mililitros iniciais de filtrado e recolher 3 amostras sucessivas para medida de volume e análise de carbono.

No caso de proteínas, os experimentos de ultrafiltração foram conduzidos inicialmente com água e em seguida com solução de albumina. Após a ultrafiltração com solução de albumina foi feita limpeza da superfície da membrana com pincel e sob fluxo de água. Após a limpeza foi medido novamente o fluxo de água para confirmar o reestabelecimento do fluxo obtido anteriormente.

O fluxo de solução através da membrana foi obtido dividindo-se o volume de solução ultrafiltrada pela área útil da membrana e pelo tempo de ultrafiltração. A retenção de soluto foi calculada segundo a equação:

$$R = 1 - C_F / C_A \quad (1)$$

onde  $C_A$  e  $C_F$  são as concentrações da solução de alimentação e do filtrado, respectivamente. Foi admitido que não ocorre mudança

significativa na concentração da solução de alimentação durante o experimento, uma vez que o volume da solução é suficientemente grande.

As pressões utilizadas nos experimentos de ultrafiltração variaram em função da composição da membrana e do tipo de tratamento a que foram submetidas.

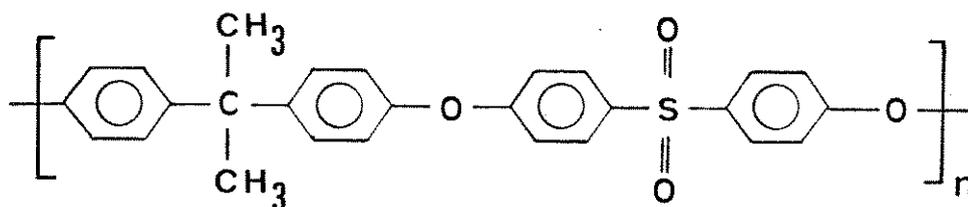
### I.2.7 - Microscopia eletrônica de varredura

As amostras para microscopia eletrônica de varredura foram preparadas através da fratura das membranas em nitrogênio líquido e posterior metalização com ouro [24]. As amostras foram fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu ASM-SX.

### I.3 - Resultados e discussão

O interesse em membranas de polisulfona é devido à estabilidade química, mecânica e térmica deste polímero [25]. Embora este material tenha sido utilizado no início para a obtenção de suportes porosos de membranas compósitas [6], atualmente essas membranas são comercializadas para uma variedade de aplicações em processos de osmose reversa e ultrafiltração [26].

Existem tres tipos comerciais de polisulfonas, com marcas registradas de Udel, Radel e Vitrex [25]. A polisulfona utilizada neste trabalho é a Udel, produzida pela Union Carbide. Sua estrutura química é a seguinte:



A escolha do solvente utilizado na obtenção da solução de preparação das membranas foi baseada nos mapas de solubilidade dos componentes poliméricos [16]. A n-metil 2-pirrolidona é indicada como um bom solvente para os dois polímeros.

### I.3.1 - Efeito do tempo de evaporação e do aquecimento.

O efeito do tempo de evaporação durante a preparação da membranas é apresentado na figura 5. Nota-se que as membranas obtidas a partir de filmes de solução que foram deixados evaporar durante 2 minutos, apresentam fluxo menor e retenção maior que as membranas obtidas sem evaporação anterior. Na mesma figura é também apresentado o fluxo e a retenção de membranas obtidas com o mesmo tempo de evaporação, porém sob aquecimento.

Em geral, quando o filme de solução polimérica é submetido à evaporação antes de ser coagulado, é formada uma camada mais concentrada em sua superfície, que é responsável pelo aumento da espessura da camada superior da membrana [7, 27]. Este resultado é coerente com o que foi observado experimentalmente. Como a camada superior se torna mais espessa e densa a resistência da membrana a fluxo de solvente é também aumentada.

O aquecimento durante a evaporação de solvente é também responsável pelo mesmo efeito, porém aumentando a quantidade de solvente evaporado, para o mesmo período de exposição.

As membranas utilizadas nos experimentos que são descritos a seguir foram preparadas por espalhamento de solução e coagulação imediata.

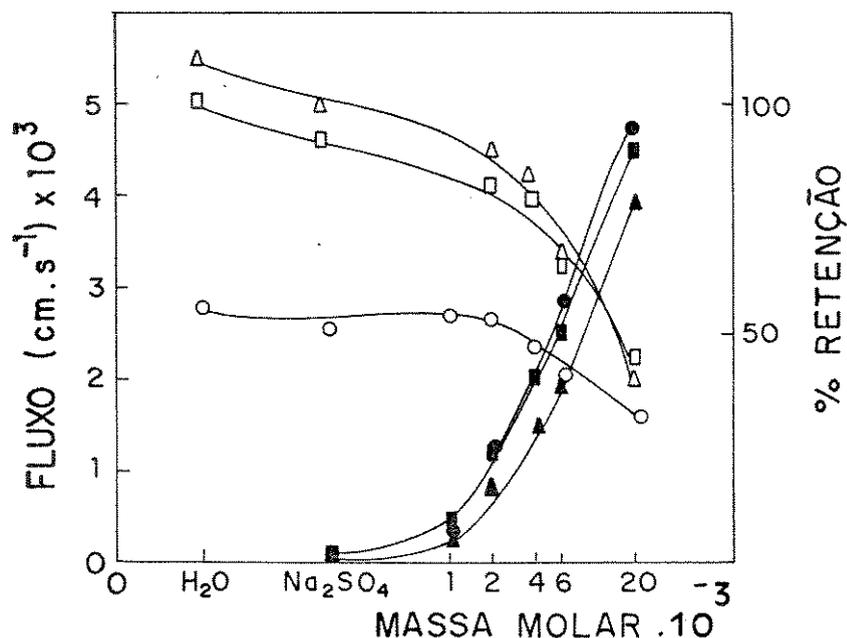


Figura 5 - Efeito do tempo de evaporação sobre o fluxo e a retenção de membranas de PSf (20%) - PVP (1%): (Δ,▲) sem tempo de evaporação; (□,■) dois minutos de evaporação e (○,●) dois minutos de evaporação sob aquecimento. Símbolo vazio: fluxo; símbolo cheio: retenção.

### 1.3.2 - Efeito da variação da composição de PVP

É conhecido que a presença de aditivos na solução polimérica afeta a estrutura final da membrana formada pois altera a velocidade de coagulação da solução polimérica [13, 28]. A utilização de poli(vinilpirrolidona) como aditivo foi anteriormente discutida [12, 16]. O fato de PVP/PSf/NMP formarem um sistema ternário homogêneo numa larga faixa de composição e a alta solubilidade da PVP em água permitem obter, em princípio, membranas de polisulfona mais hidrofílicas e mais porosas.

Neste trabalho foi observado que a adição de pequenas quantidades de PVP na solução de PSf aumenta acentuadamente o fluxo de água através da membrana resultante. Alguns resultados ilustrativos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Efeito de pequenas quantidades de poli(vinilpirrolidona) no desempenho de membranas de polisulfona.

Membrana	Composição		Tratamento	Pressão (Kg/cm <sup>2</sup> )	Fluxo de água (cm/s) x 10 <sup>3</sup>
	% PSf (m/m)	% PVP (m/m)			
1	20	0	—	1,0	<0,4
2	20	2	—	1,0	4,4
3	20	2	extração	0,4	2,9

Os dados apresentados na tabela 2 indicam que o fluxo de água é aumentado com a adição de 2% de PVP em uma solução polimérica contendo 20% de PSf, nos dois tipos de membranas (não tratada e submetida à extração).

Na figura 6 a composição de PSf é mantida constante e igual a 20% (m/m) enquanto que a composição de PVP ( $\bar{M}_w = 40.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) é aumentada de 1 a 25% (m/m). Todas as membranas preparadas foram submetidas aos tratamentos descritos anteriormente. O efeito da variação da composição polimérica sobre a permeabilidade e seletividade da membrana foi avaliado em experimentos de ultrafiltração. Os resultados obtidos são apresentados na figura 6 que inclui: membranas não tratadas (figura 6a), membranas submetidas à secagem (figura 6b), à extração (figura 6c) e à extração e secagem (figura 6d).

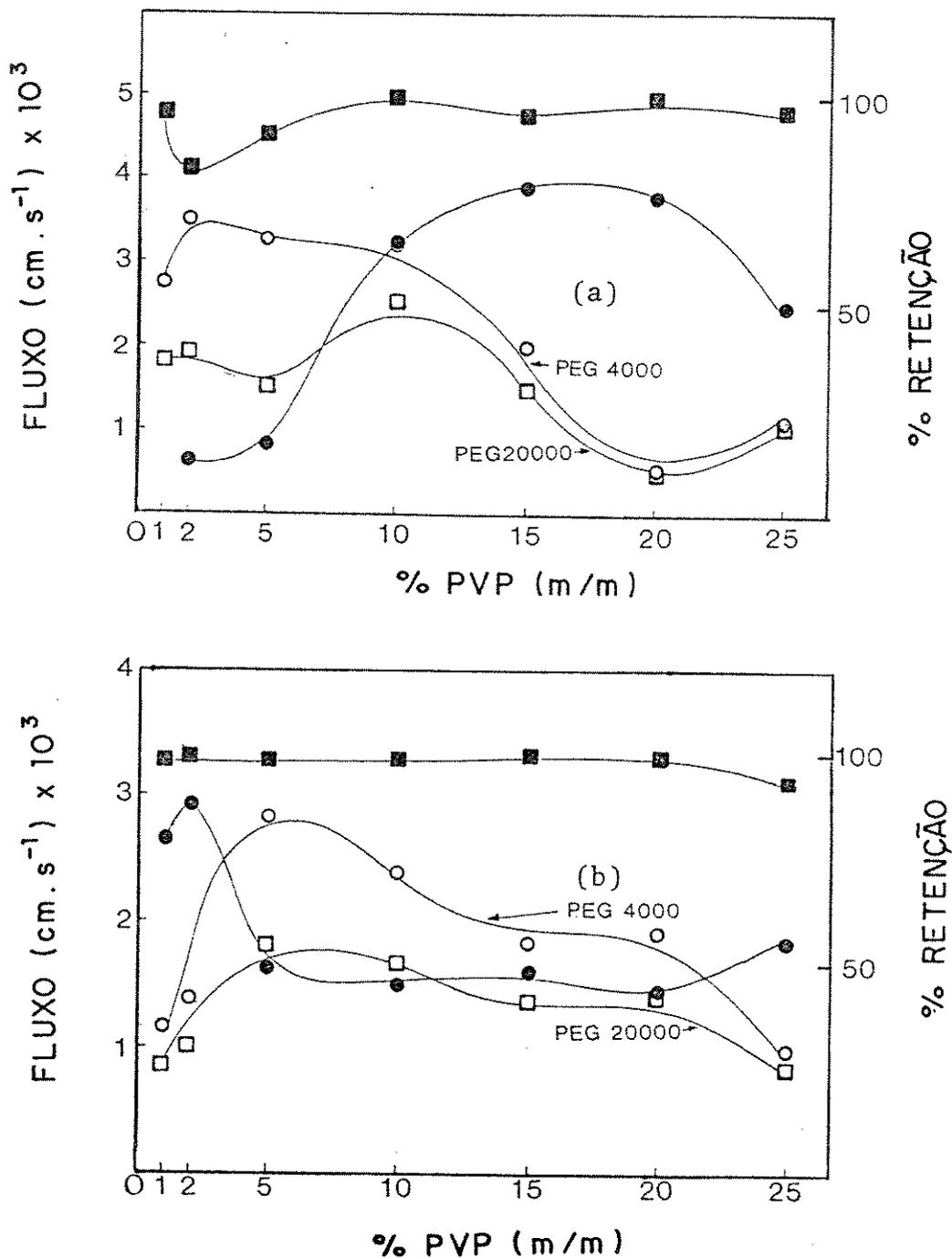


Figura 6 - Ultrafiltração de soluções aquosas de poli(etilenoglicóis) através de membranas preparadas a partir de solução 20% (m/m) de PSf e composição variada de PVP. (a) membrana não tratada ( $P = 1 \text{ Kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) e (b) membrana submetida à secagem ( $P = 6 \text{ Kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).

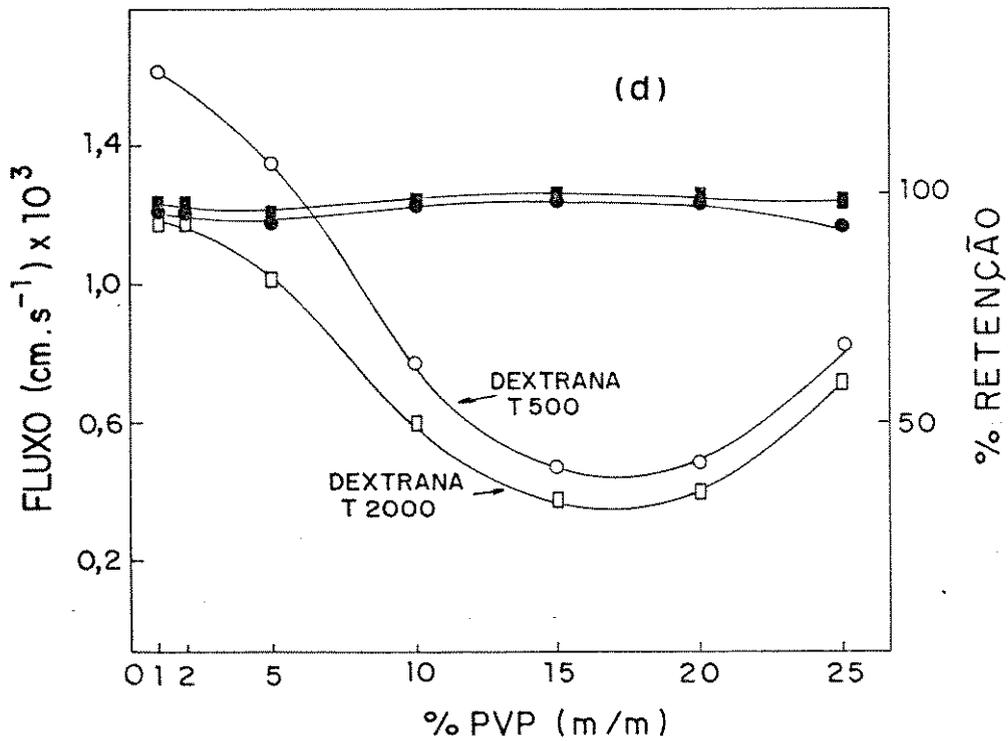
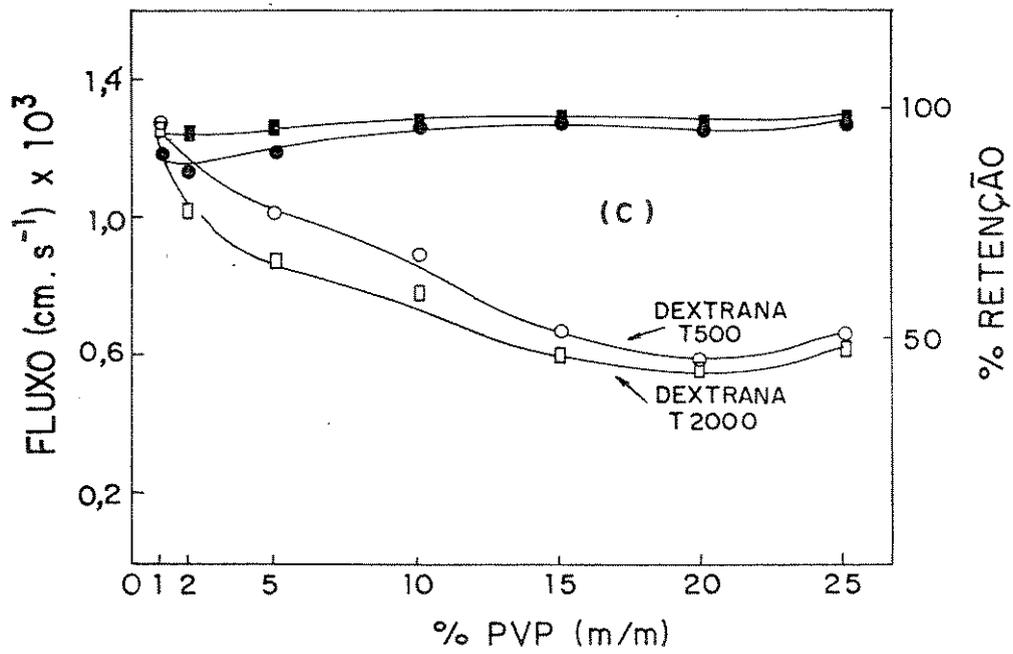


Figura 6 - Ultrafiltração de soluções aquosas de dextranas através de membranas preparadas a partir de solução 20% (m/m) de PSf e composição variada de PVP. (c) membrana submetida à extração ( $P = 0,4 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ) e (d) membrana submetida à extração e secagem ( $P = 0,4 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ).

Membranas submetidas ao tratamento de extração apresentaram diminuição de fluxo com o aumento da concentração de PVP entre 1% e 15% (m/m). Nota-se também que as retenções de soluções de dextrana são superiores a 90% dentro da faixa de concentração de PVP estudada.

Para analisar o efeito da quantidade de PVP adicionado sobre as características das membranas obtidas é também necessário avaliar a variação da microestrutura destas membranas. Faces de fraturas de membranas observadas sob microscópio eletrônico de varredura indicam mudanças estruturais bastante acentuadas em função da quantidade de PVP. As micrografias apresentadas na figura 7 mostram uma estrutura esponjosa e contínua de uma face a outra da membrana. A figura 8 ilustra estruturas com cavidades maiores, que aumentam de tamanho à medida que se afasta da camada superficial. As dimensões dos poros da camada filtrante superficial impedem que os mesmos sejam observados em micrografias de varredura.

A formação de estruturas no interior de membranas obtidas através do processo de inversão de fase é função, principalmente, da velocidade de entrada de não solvente na solução polimérica e da forma dos domínios originados durante a separação de fase [7, 29]. Este fator é influenciado pela viscosidade da solução. Membranas de ultrafiltração obtidas a partir de um único polímero geralmente apresentam aumento no tamanho das cavidades internas à medida que a viscosidade da solução de partida é diminuída [29, 30].

Neste trabalho, o efeito do aumento da concentração do segundo polímero também pode ser relacionado ao aumento da viscosidade da solução de partida. Soluções com maior teor de PVP são mais viscosas, a velocidade de entrada da água é menor e o resultado final é a obtenção de membranas com poros mais uniformes, sem a presença de grandes cavidades. A presença de grandes cavidades é geralmente

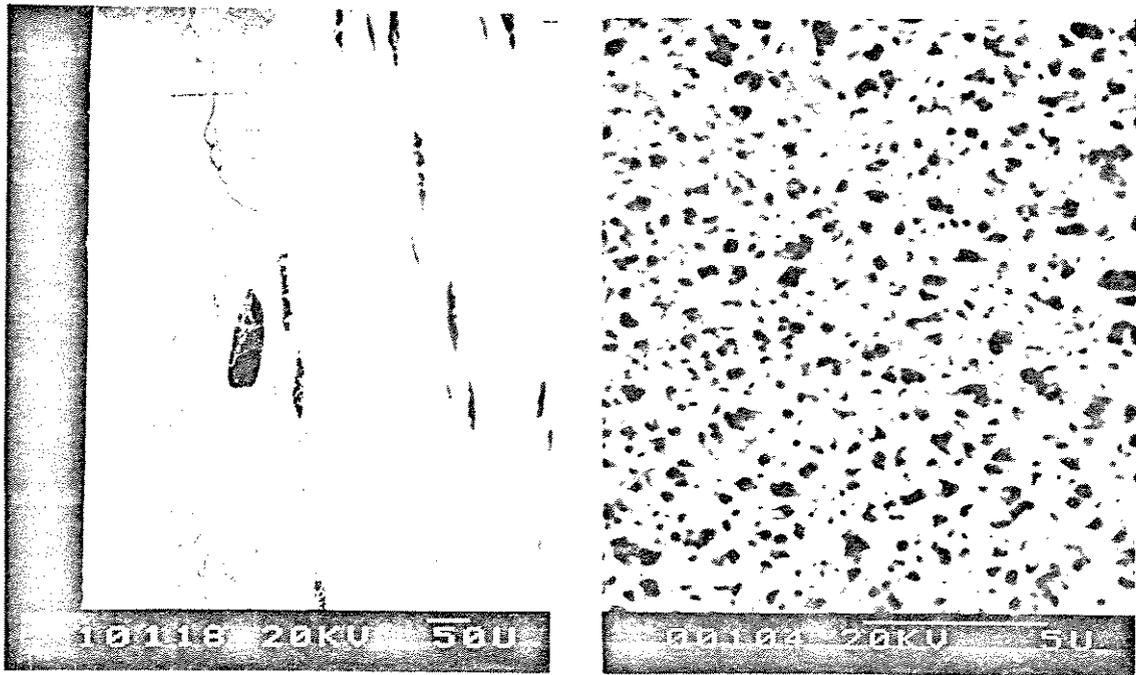


Figura 7 - Corte transversal de membrana PSf (20%) - PVP (25%).

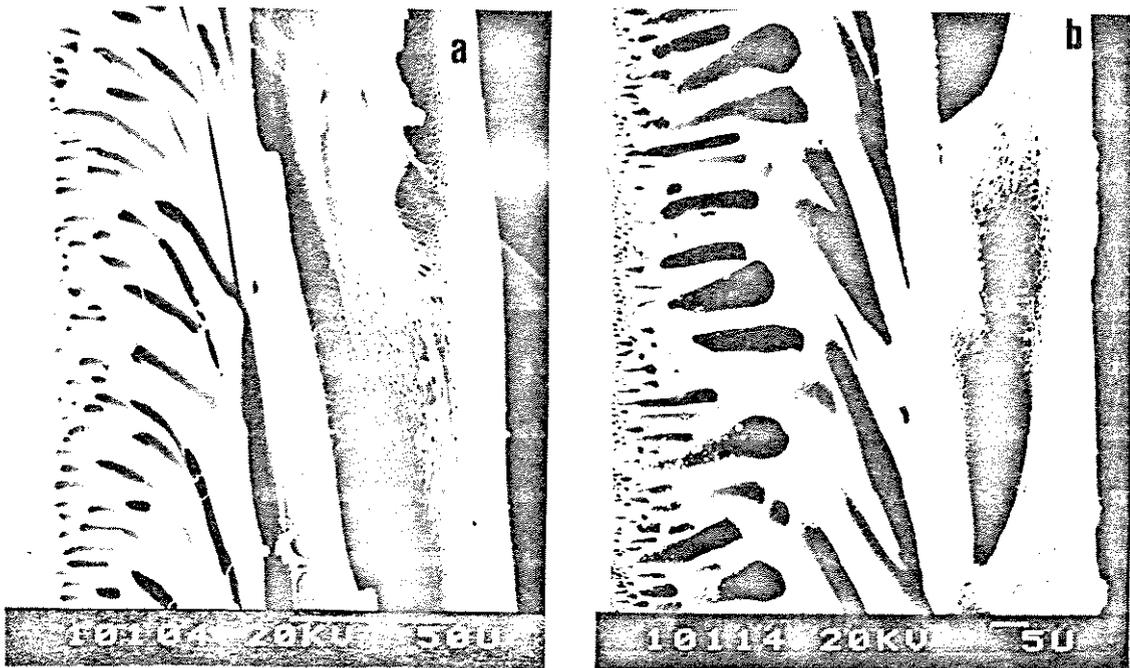


Figura 8 - Cortes transversais de membranas: (a) PSf (20%) - PVP (10%); (b) PSf (20%) - PVP (1%).

indesejável pois a membrana com estas características é mais suscetível a empacotamento sob pressão. Além disso, quanto maior a concentração de PVP na solução, provavelmente, maior será a quantidade de água necessária para que seja atingida a condição de separação de fases. Assim, na solução contendo maior quantidade de PVP, quando a separação de fase se inicia, a água já se encontra mais uniformemente distribuída, originando poros mais uniformes. Porém, uma discussão mais detalhada seria somente possível a partir do conhecimento dos diagramas de fase para este sistema.

### I.3.3 - Efeito dos tratamentos posteriores à coagulação

Os tratamentos de secagem e extração de membranas de PSf/PVP envolveram o aquecimento das mesmas a temperaturas de 60 e 80°C, respectivamente. O efeito de secagem sob aquecimento de membranas de poli sulfona foi também investigado em trabalho anterior [31].

Como resultado foi observada a redução de fluxo através das membranas, que pode ser atribuída à contração de poros por aquecimento. Em temperaturas mais elevadas, a mobilidade das cadeias poliméricas é maior, provocando uma alteração nas morfologias dos poros.

Analisando-se as pressões utilizadas nos experimentos de ultrafiltração apresentados na figura 6, observou-se que as membranas submetidas a tratamentos de extração apresentaram permeabilidade mais elevada. Estes resultados indicam que após a preparação das membranas e sua lavagem exaustiva com água, tratamento comum em todos os casos, uma fração de PVP ainda permanece na estrutura da membrana. Como etanol é melhor solvente de PVP que a água, a extração com este solvente é mais efetiva pois é ainda feita à temperatura mais elevada. Esta última afirmação foi constatada através da análise de resíduos de

PVP no etanol utilizado na extração. Portanto, o maior fluxo de soluções através de membranas submetidas a extração deve-se a um aumento no tamanho médio de poros, resultante da saída de uma quantidade maior de PVP durante a extração.

#### I.3.4 - Efeito da massa molar de PVP

O efeito da massa molar de PVP nas características de fluxo e retenção de membranas obtidas a partir de 10% (m/m) de PSf e 10% (m/m) de PVP, é apresentado na figura 9. Em primeiro lugar observa-se que o aumento de massa molar de PVP provoca a diminuição de fluxo de água e aumento de retenção de solutos, quando as membranas não são submetidas a tratamento. Por outro lado, membranas tratadas com etanol apresentam aumento de fluxo de água com o aumento da massa molar de PVP.

Parte dos poros da camada filtrante é formada pela extração do PVP do filme formado pela blenda PSf/PVP. O sistema ternário PSf/PVP/NMP é homogêneo. Com a saída do solvente ocorre a separação de fases de forma que o filme final apresenta domínios distintos. O tamanho e a distinção destes domínios depende da interação entre os dois componentes poliméricos. Quanto maior a massa molar, menor é a miscibilidade e maiores são os domínios para uma mesma condição de obtenção do filme. Portanto, maiores serão os poros após a extração de PVP por etanol. Isto explica o aumento na permeabilidade da membrana (figura 9 c e d).

Por outro lado, a extração do PVP apenas com água é menos efetiva que a extração com etanol. Como a miscibilidade de pares poliméricos aumenta com a diminuição da massa molar, em membranas com PVP de baixa massa molar a extração deste polímero é menos completa. A presença de uma pequena quantidade de PVP nos poros torna a membrana

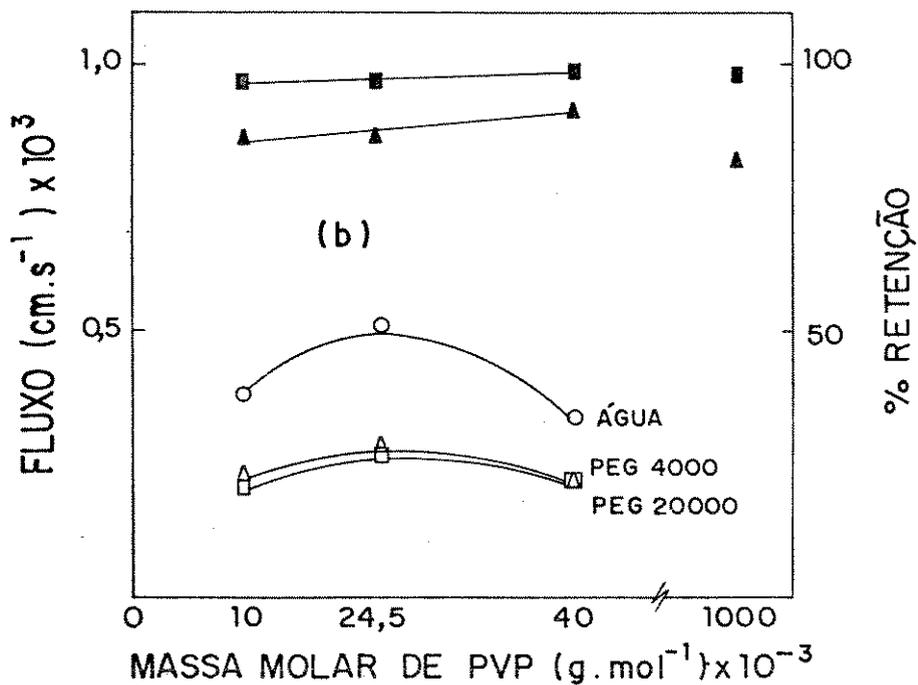
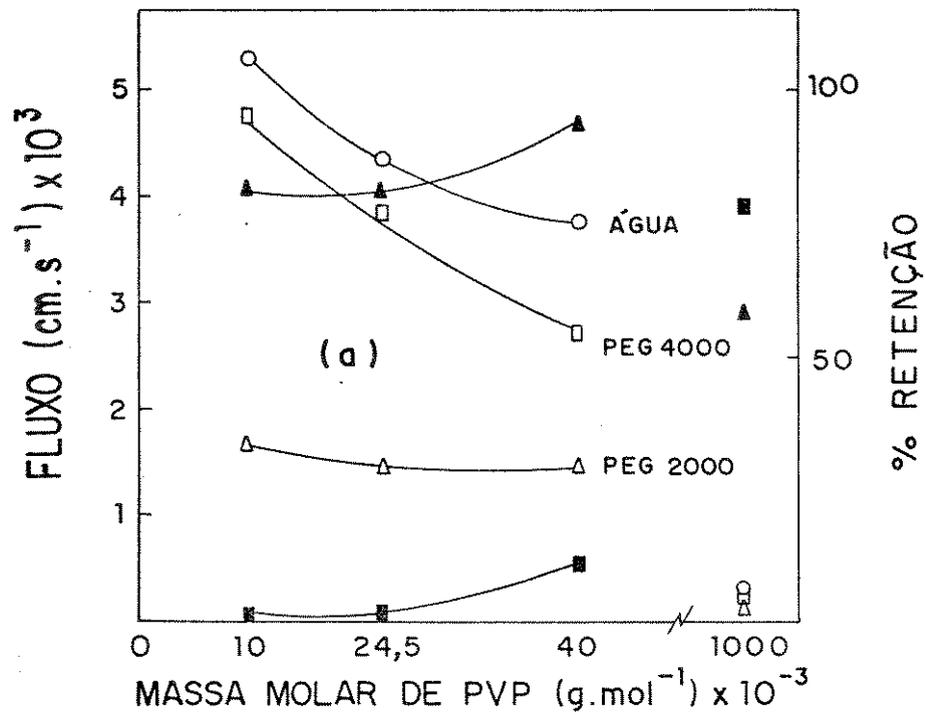


Figura 9 - Ultrafiltração de soluções aquosas de poli(etilenoglicóis) através de membranas PSf (10%) - PVP (10%): (a) membranas sem tratamento ( $P = 0,1 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ); (b) membranas submetidas à secagem ( $P = 0,4 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ).

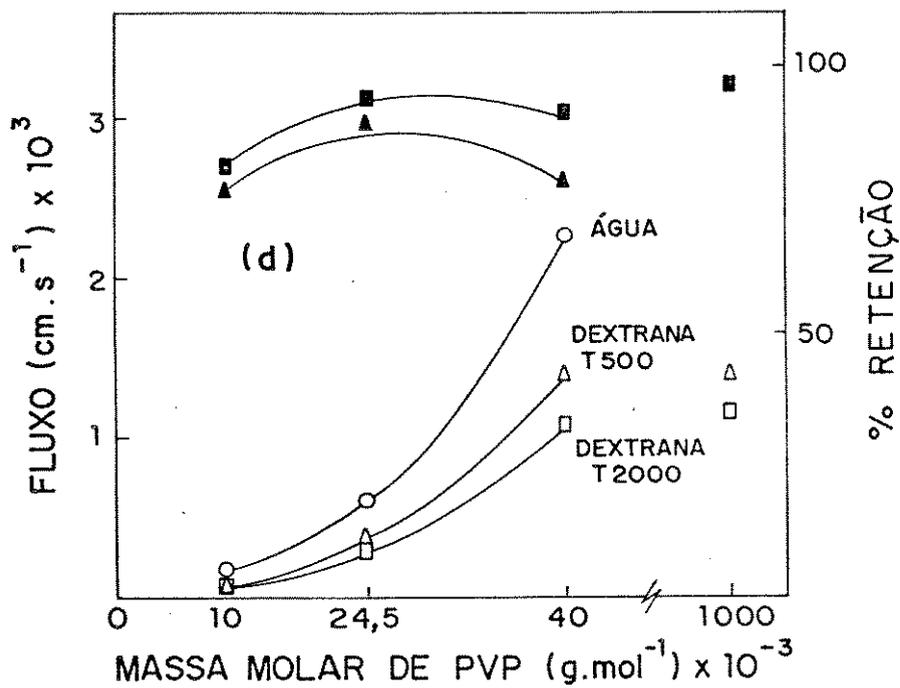
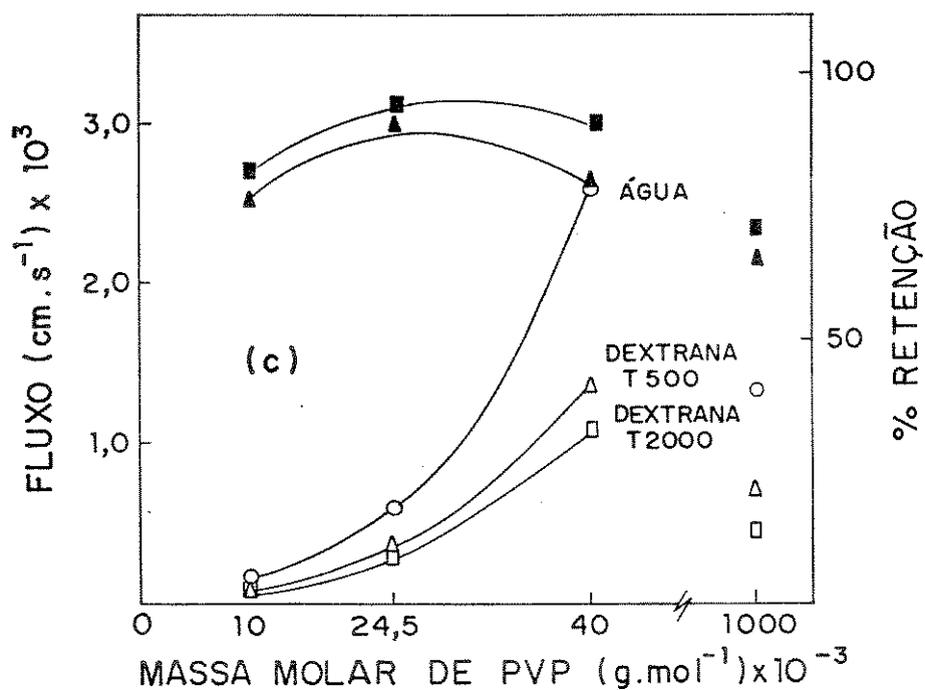


Figura 9 - Ultrafiltração de soluções aquosas de poli(etilenoglicóis) através de membranas PSf (10%) - PVP (10%): (c) membranas submetidas à extração ( $P = 0,1 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ); (d) membranas submetidas à extração e secagem ( $P = 0,4 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ).

mais hidrofílica e, portanto, mais permeável à água [32]. Isto explica os resultados da figura 9 a e b.

A diminuição do fluxo com aumento da massa molar de PVP em membranas não tratadas pode ser também atribuído ao aumento da viscosidade da solução utilizada na preparação das membranas e, da mesma forma discutida anteriormente, à estrutura final da membrana obtida. O mesmo efeito de viscosidade é provavelmente mais acentuado quando se utiliza PVP com massa molar igual a  $1 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ .

### 1.3.5 - Ultrafiltração de proteínas

O desempenho de membranas de PSf/PVP na ultrafiltração de soluções de albumina e gamaglobulina é apresentado nas figuras 10 e 11, em função do tempo de ultrafiltração e da pressão aplicada, respectivamente.

Na figura 10 observa-se que o fluxo através das duas membranas decresce com o tempo enquanto que a retenção aumenta. O fluxo de água não é indicado nas figuras, mas se mantém aproximadamente constante neste intervalo de tempo. Este último resultado pode ser usado para justificar que o efeito de compactação da membrana é desprezível quando a pressão aplicada é inferior a  $0,4 \text{ kg.cm}^{-2}$ .

O efeito da pressão sobre o fluxo de água e das soluções de proteínas indica uma dependência linear e crescente, porém mais acentuada na ultrafiltração de água. Isto indica que o aumento de pressão favorece a maior vazão de solvente e, portanto, o maior acúmulo de soluto retido sobre a membrana. Este acúmulo é, portanto, responsável pelo aumento da resistência a fluxo.

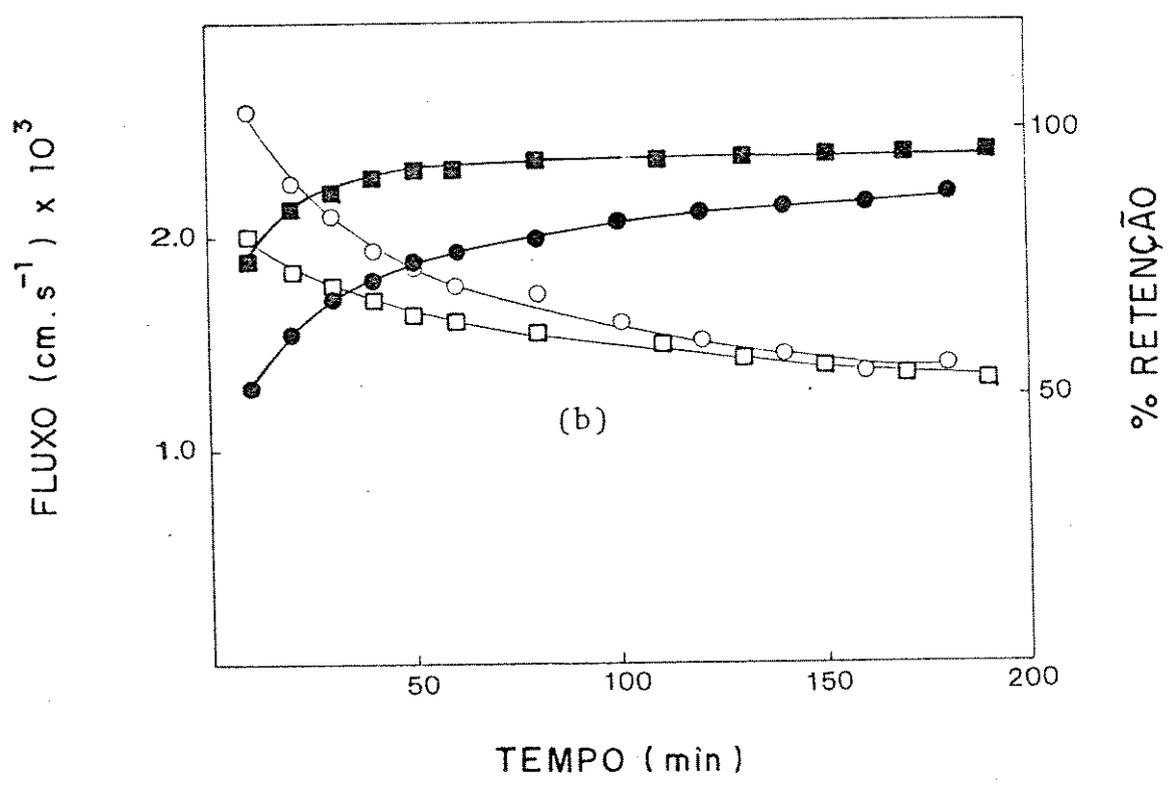
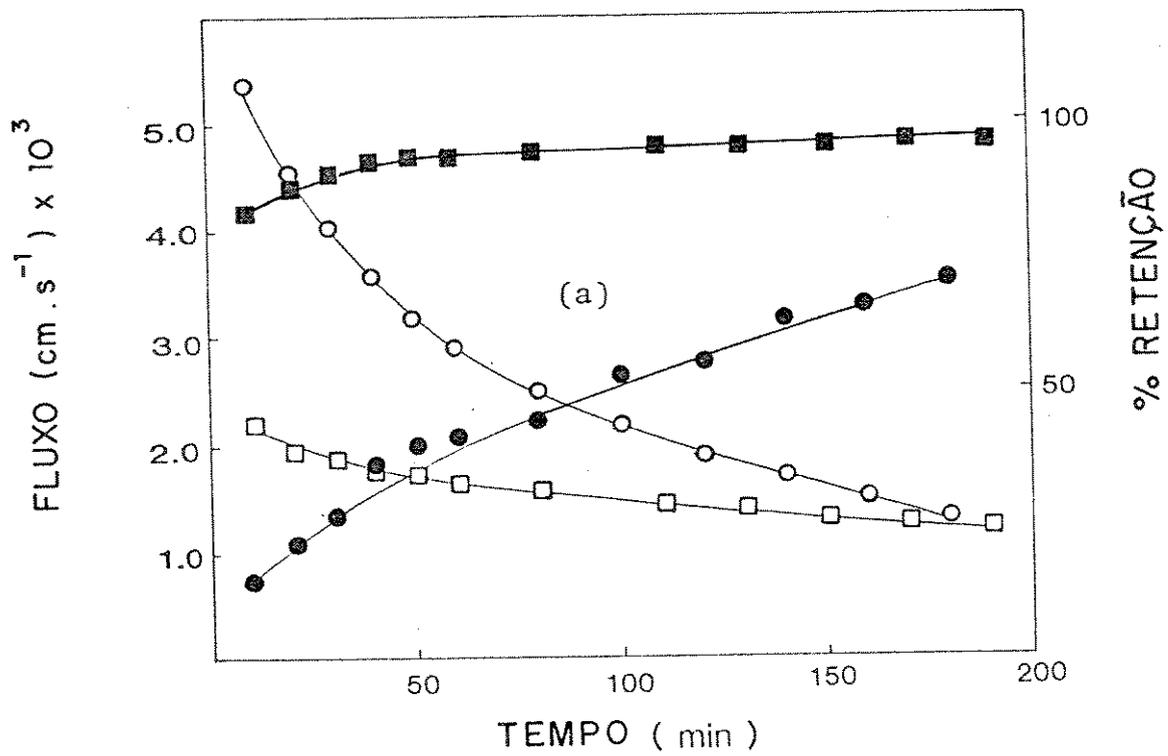


Figura 10 - Variação do desempenho da membrana com o tempo em experimentos de ultrafiltração de albumina (○,●) e gamaglobulina (□,■). Membranas submetidas a extração: (a) PSf (10%) - PVP (5%); (b) PSf (10%) - PVP (10%). Pressão =  $0,4 \text{ Kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

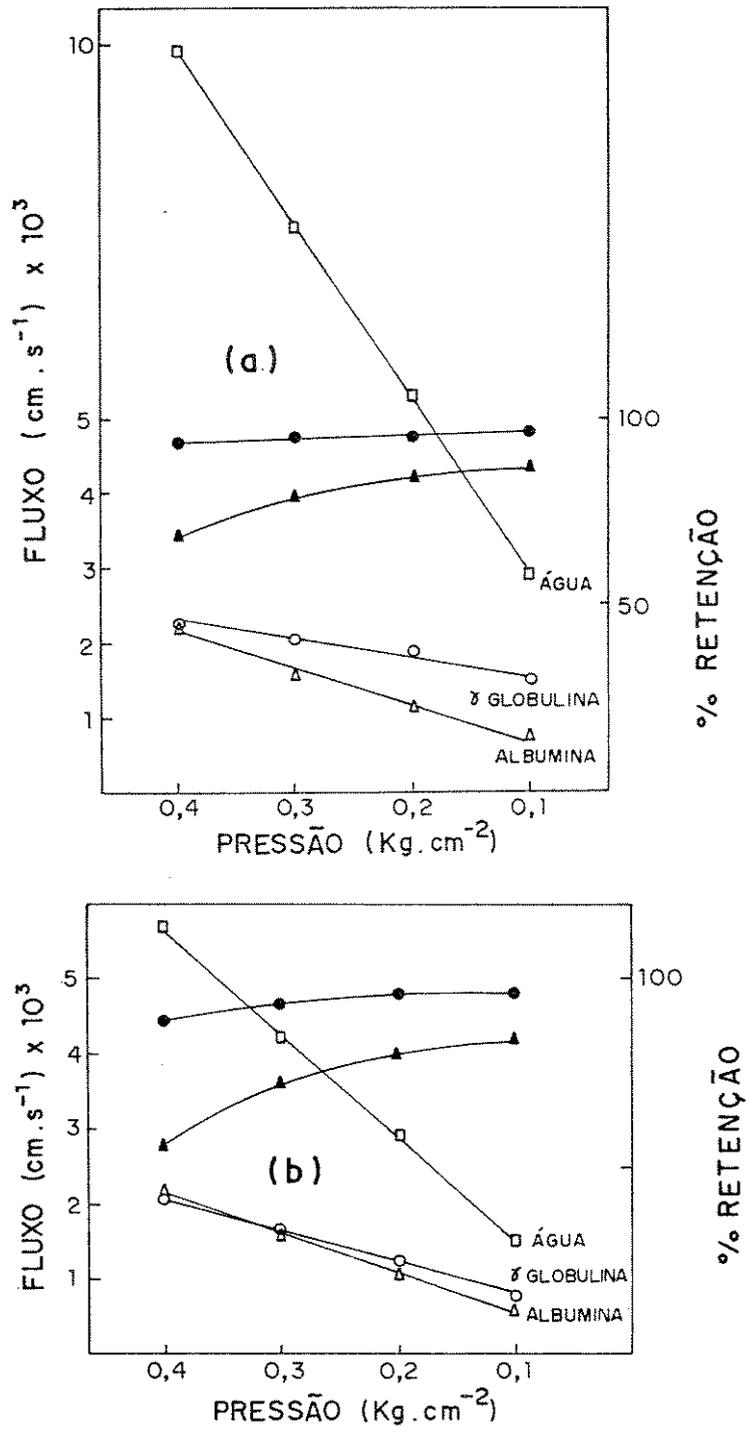


Figura 11 - Variação do desempenho da membrana com a pressão em experimentos de ultrafiltração de albumina (Δ,▲) e gamaglobulina (○,●). Membranas submetidas a extração: (a) PSf (10%) - PVP (5%); (b) PSf (10%) - PVP (10%).

Grace [33] estudou o mecanismo de transferência de massa através de substratos porosos, obtendo as seguintes expressões para dois tipos de causas de redução de fluxo com o tempo em filtração:

a) mecanismo de bloqueio ou entupimento

$$K_i t = \frac{1}{Q} - \frac{1}{Q_0} \quad (2)$$

b) mecanismo de formação de bolo

$$\frac{t}{V} = \frac{K_c V}{2} + \frac{1}{Q_0} \quad (3)$$

onde  $K_i$ ,  $K_c$ ,  $Q_0$  são constantes,  $t$  é o tempo,  $V$  é o volume de filtrado (ml) e  $Q$  é a vazão (ml/min). Estes dois fatores de redução de fluxo são denominados de polarização em processos de separação por membrana.

Os resultados de ultrafiltração de solução de albumina são satisfatoriamente representados pelo mecanismo de bloqueio, cujo comportamento é descrito pela equação 2. Neste caso, como a membrana é parcialmente permeável a moléculas de albumina, durante a ultrafiltração os poros da membrana se tornam gradualmente bloqueados pelo acúmulo de soluto sobre a superfície da membrana. Este bloqueio é reponsável pela redução do tamanho médio de poros da membrana e o conseqüente aumento da retenção de moléculas de albumina. Os resultados apresentados na figura 10 mostram diminuição de fluxo de  $5 \times 10^{-3}$  a  $1,5 \times 10^{-3}$  cm.s<sup>-1</sup> e aumento de retenção de 20 a 75%, após 3 horas de ultrafiltração. A curva apresentada na figura 12 (a), obtida a partir da equação 2, mostra desvio da linearidade esperada, a partir de 150 minutos de experimento. Este comportamento pode ser resultante da mudança de mecanismo de bloqueio de poros para mecanismo de formação de bolo (equação 3) uma vez que acima deste tempo a retenção da membrana já é bastante elevada.

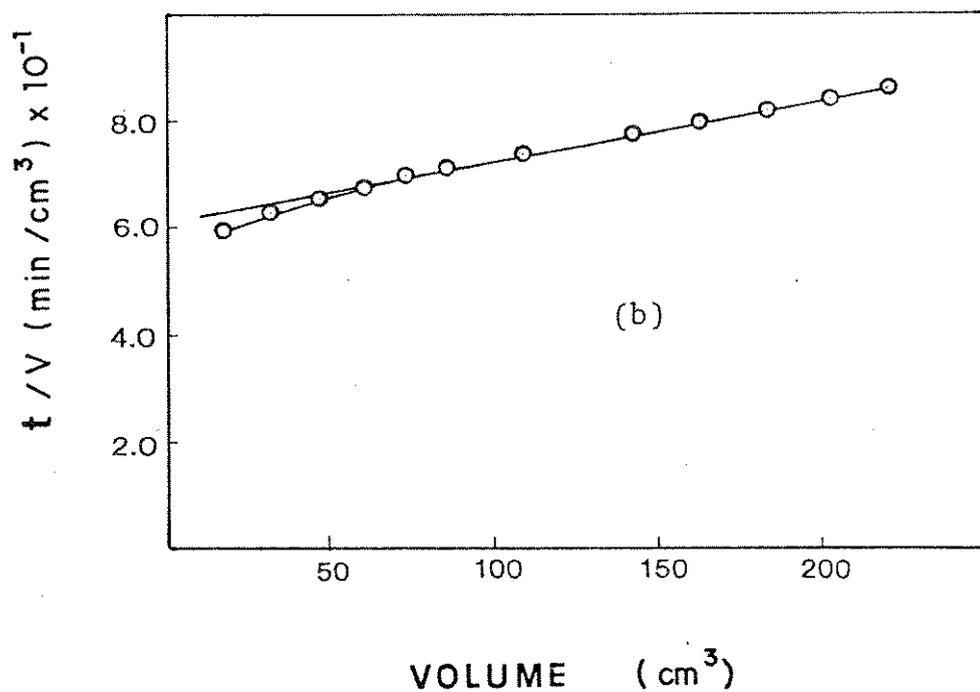
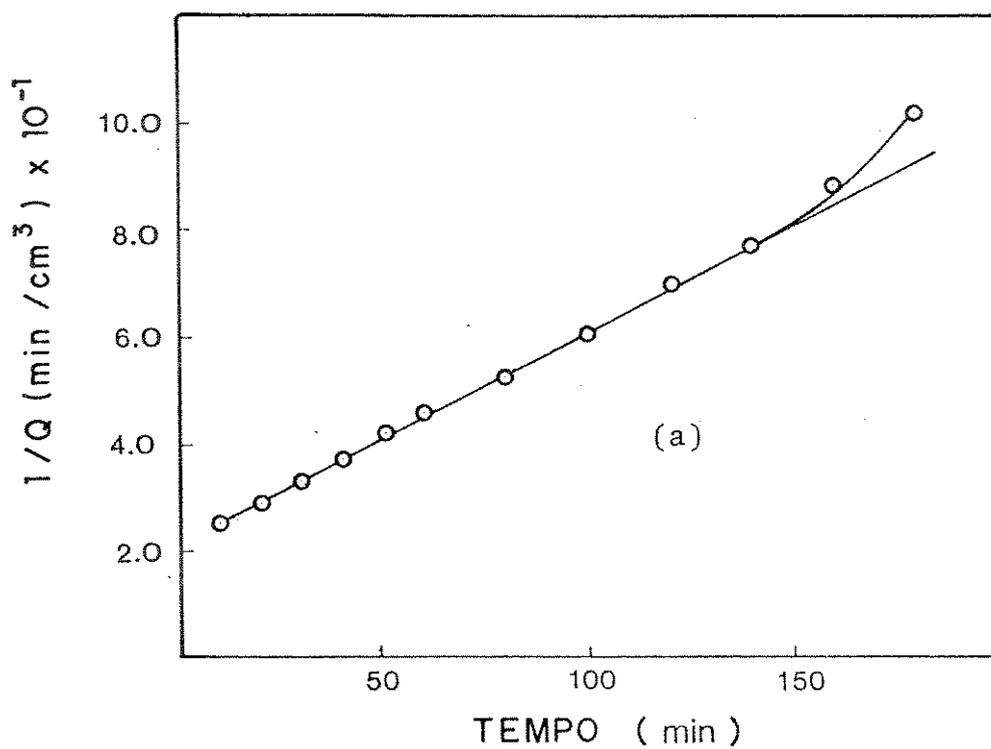


Figura 12 - Tratamentos dos resultados de ultrafiltração de proteínas, segundo as equações 2 e 3. (a) solução de albumina; (b) solução de gamaglobulina

Por outro lado, na ultrafiltração de soluções de gamaglobulina as retenções obtidas foram superiores a 30%. Os resultados destes experimentos podem ser melhor ajustados à equação 3 que corresponde ao mecanismo de acúmulo e formação de bolo. A figura 12 (b) apresenta a reta obtida a partir de resultados experimentais, segundo a equação 3. A resistência da camada acumulada (bolo) é maior que a resistência ao fluxo da própria membrana, pois o fluxo de água é, pelo menos, duas vezes superior ao fluxo da solução de proteína.

O mecanismo sugerido para a ultrafiltração de gamaglobulina é, portanto, o de formação e crescimento de um depósito do tipo bolo sobre a superfície da membrana. A partir de tempos mais longos do que o período investigado neste trabalho é possível atingir um regime estacionário onde o crescimento da camada acumulada seja equilibrado dinamicamente pela dissipação do soluto por agitação. A partir deste tempo o fluxo de solução através da membrana se torna constante.

Como os resultados anteriores sugerem, não é possível obter fracionamento destas proteínas apesar da membrana apresentar resultados iniciais de retenção bastante convenientes quando as proteínas são ultrafiltradas separadamente. Isto porque o mecanismo de entupimento de poros e acúmulo de solutos retidos sobre a membrana é desfavorável ao que seria desejável, ou seja, retenção de gamaglobulina e transferência de albumina para o filtrado.

A polarização em ultrafiltração é, portanto, o problema limitante do fracionamento de solutos que diferem em suas massas molares. Este problema será discutido mais detalhadamente no próximo capítulo.

## II - MÉTODOS DE FRACIONAMENTO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO

### II.1 - Introdução

É reconhecido que a purificação é a etapa economicamente mais importante no processamento de biomoléculas. Especialmente no caso de proteínas, existe a necessidade de separá-las de um material de partida complexo e purificá-las para aplicações farmacêuticas e alimentícias [34].

Os métodos iniciais de isolamento de proteínas eram empíricos, lentos e muito trabalhosos. Com o desenvolvimento de novos processos e o conhecimento mais definido de propriedades físico-químicas e biológicas foi possível avançar bastante nesta área. Porém, o isolamento de proteínas e outras moléculas biológicas continua sendo uma arte elaborada. Isto porque não existe um método único ou um conjunto de métodos aplicáveis a todas, indistintamente. Na maioria dos casos, a solução de um determinado problema requer a utilização de várias técnicas para que se obtenha o grau de purificação desejado.

Como proteínas são polieletrólitos com massa molar definida e funções biológicas específicas, os métodos de fracionamento existentes podem explorar suas propriedades macromoleculares, eletrolíticas ou biológicas. As propriedades citadas são: massa molar, solubilidade, carga elétrica, adsorção e afinidade por outras moléculas, biológicas ou não.

A técnica principal utilizada em escala de laboratório para fracionamento e purificação de proteínas é a cromatografia [35]. Frequentemente são utilizadas cromatografia de troca iônica, de permeação em gel e de afinidade, ou bioespecífica [36-38]. O princípio de cromatografia de afinidade é similar ao de outros tipos

de cromatografia em coluna, diferindo apenas no aspecto específico das interações entre as proteínas e o suporte.

Existem ainda outros métodos propostos na literatura para o fracionamento de proteínas de soro sanguíneo: eletroforese preparativa [39, 40]; ultracentrifugação [41-43]; focalização isoeétrica e partição em sistemas aquosos bifásicos [44]. Neste último são utilizados polímeros de alta massa molar, tais como dextrana e poli(etileno glicóis), como agentes de separação de fases.

O fracionamento de proteínas de soro objetiva a obtenção dos seguintes produtos de importância clínica: albumina; fração protéica do plasma (com concentração de albumina ao redor de 80%); globulinas; complexo de fotorrombina ( $\bar{M}_w = 63.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ); fator antihemofílico e fibrinogênio ( $\bar{M}_w = 330.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) [34]. Em escala industrial, alguns dos métodos citados, tais como filtração em gel, são utilizados em combinação com técnicas de precipitação para preparar proteínas de soro purificadas. Isto porque a maioria dos métodos são caros e difíceis de serem aplicados em larga escala, porém são convenientes quando utilizados em conjunto com os concentrados brutos obtidos por precipitação [45].

### II.1.1. Precipitação fracionada

Este método utiliza as diferenças de solubilidade de proteínas em solução, que são acentuadas através de variações na composição da solução. Na maioria dos casos, é necessário que a proteína desejada seja precipitada reversivelmente para garantir sua atividade biológica [36].

O método utilizado correntemente para o fracionamento de proteínas de soro foi inicialmente proposto por Cohn e colaboradores [46]. O procedimento de purificação envolve o ajuste apropriado de

pH, concentração de etanol, concentração de proteína, temperatura e força iônica da solução, de tal forma que as frações protéicas de interesse sejam precipitadas. Estes precipitados são, então, recuperados por centrifugação ou filtração e submetidos a outras etapas de precipitação, até que se atinja o grau de purificação desejado.

Por exemplo, a albumina é obtida na quinta fração precipitada, após redução do pH a 4,8 e em uma solução contendo 40% de etanol, à temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ . Para aplicações clínicas, é necessário reduzir a quantidade de eletrólito neste precipitado. A redução do excesso de sal, que corresponde aproximadamente a 85% de cloreto de sódio, é feita através da redissolução a quente do precipitado, em uma solução aquosa contendo 10% de etanol. Aumentando-se novamente a concentração de etanol para 40% e à temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ , obtem-se um novo precipitado com 2% de sal que é posteriormente liofilizado.

O método de Cohn é frequentemente utilizado em preparações de proteínas do soro em larga escala, devido ao seu menor custo em relação a outros métodos. Porém, é um método que envolve muitas etapas, cujo rendimento depende da qualidade de controle das condições de precipitação e de purificação dos precipitados obtidos.

Métodos alternativos para a separação de sais e etanol dos precipitados obtidos pelo método de Cohn incluem: filtração em gel [47], eletrodialise [48] e ultrafiltração [49]. Estes métodos são economicamente vantajosos em relação à purificação por reprecipitação e liofilização. Tanto a ultrafiltração como a eletrodialise apresentam uma vantagem adicional em relação à filtração em gel, pois a solução é concentrada à medida que são eliminados os contaminantes. Na filtração em gel, a solução final obtida é, pelo menos, duas vezes diluída em relação à inicial. Um problema adicional a este método é a

necessidade de grande quantidade de água ultrapura, para evitar a introdução de contaminantes no produto final.

Na tabela 3 o método clássico de diálise e liofilização é comparado com a ultrafiltração, mostrando um balanço favorável a esta última, em escala industrial.

Tabela 3 - Comparação entre os processos de liofilização e de ultrafiltração na produção de soluções concentradas de albumina de soro [49].

	Diálise / Liofilização	Ultrafiltração
Tempo de um ciclo de operação	48 hs	8 hs
Energia Elétrica	8 a 10 KVA	1 KVA
Rendimento	93 - 95%	95 - 97,5%
Custo estimado	US\$ 40.000 a 50.000	US\$ 10.000

#### II.1.2 - Cromatografia de permeação em gel

Um dos métodos mais úteis para a separação de proteínas em função de seu tamanho é a cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como filtração em gel. Neste método, a mistura de proteínas, dissolvidas em um tampão adequado, flui por gravidade através de uma coluna preenchida inicialmente por esferas microscópicas porosas de um material polimérico inerte e que se encontram equilibradas no mesmo tampão.

Quando uma solução de proteínas é introduzida na coluna, as proteínas de tamanhos moleculares diversos penetram os poros externos do gel, em diferentes graus. Moléculas muito grandes não podem penetrar os poros e são excluídas. Por outro lado, as moléculas pequenas conseguem penetrar os poros livremente e como consequência terão um maior percurso que as moléculas maiores.

Os tempos de retenção das diferentes espécies variam inversamente com os tamanhos moleculares. Desta forma, as moléculas maiores serão eluídas e coletadas em primeiro lugar na saída da coluna e as menores por último. A detecção das frações eluídas é geralmente feita por métodos espectrofotométricos [45].

Os materiais utilizados comercialmente para formação do gel são, por exemplo, dextranas reticuladas (Sephadex e Sephacryl), agarose (Sephacrose), poliacrilamida (Bio-gel), vidro poroso (Bio-glass) e géis de poliestireno (Styragel). Variando-se o material formador de gel e seu tamanho de poros, é possível separar e estudar por cromatografia solutos de massa molar entre algumas centenas até milhões de  $\text{g.mol}^{-1}$ . Por exemplo, os vários tipos comerciais de Sephacryl diferem no grau de reticulação interna da molécula de dextrana e, assim, em seu grau de entumescimento por solvente e sua faixa de fracionamento de solutos [50].

A cromatografia de permeação em gel tem papel importante na purificação e caracterização de milhares de proteínas, enzimas, polissacarídeos e outras moléculas biológicas. Esta técnica permite a determinação de massa molar e tamanho de proteínas nativas ou desnaturadas sob uma variedade de condições de pH, força iônica, temperatura, etc.

Os resultados de cromatografia de permeação em gel são obtidos através de um diagrama de eluição que indica a variação da

concentração de soluto em função do volume de eluente que flui através da coluna. Para proteínas, é utilizada frequentemente a detecção contínua, usando monitor de UV. Neste diagrama, o volume de eluição de uma dada proteína ( $V_e$ ) corresponde ao volume de eluição no ponto máximo do pico (figura 13).

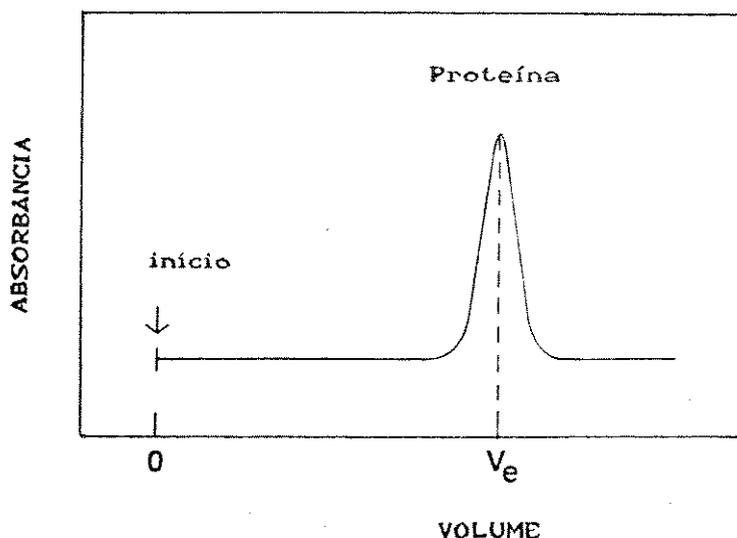


Figura 13 - Cromatograma de permeação em gel indicando o volume de eluição de uma amostra de proteína.

Normalmente, em filtração em gel com Sephadex, Sepharose ou Sephacryl, os solutos têm partição linear ao longo da coluna de gel e os picos obtidos são simétricos.

O volume de eluição não é suficiente para definir o comportamento de uma amostra, pois este parâmetro varia com o volume total da coluna ( $V_t$ ) e com a forma de empacotamento. A eluição de um

soluto é melhor caracterizada por um coeficiente de distribuição,  $K_d$ :

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_s} \quad (4)$$

$V_o$  é chamado de volume vazio e corresponde ao volume de eluição de moléculas de soluto maiores que os poros do gel, pois estas serão distribuídas somente na fase móvel (ou externa).  $V_s$  é o volume da fase estacionária que, neste caso, corresponde ao volume de solvente dentro do gel e pode ser obtido através do volume de eluição de moléculas de soluto suficientemente pequenas em relação aos poros do gel, subtraído do volume vazio. Assim,  $K_d$  representa a fração da fase estacionária disponível para a difusão de uma dada proteína. Na prática, é mais conveniente substituir  $V_s$  por  $V_t - V_o$ , então:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (5)$$

Como  $V_t - V_o$  inclui o volume de gel que é inacessível a todas as moléculas,  $K_{av}$  não é um coeficiente de partição real.

A partir da determinação dos volumes de eluição de proteínas puras com massas molares conhecidas e do volume vazio, com uma proteína de massa molar maior que o limite máximo de fracionamento do gel, é possível construir um gráfico de  $K_{av}$  em função de massa molar. Desta maneira, uma coluna empacotada com um determinado gel pode ser calibrada para caracterizar amostras de massas molares desconhecidas.

Este método é muito utilizado em escala de laboratório para separação e purificação de proteínas do plasma devido à sua eficiência e rendimento. O mesmo não ocorre de forma ampla em escala industrial, como foi discutido anteriormente. Além do problema de diluição

existem duas dificuldades principais que tornam o processo desvantajoso industrialmente. Em primeiro lugar, a cromatografia não é um processo contínuo e a taxa de transferência de massa através da matriz é muito baixa. O segundo problema está relacionado ao custo elevado de instalação e manutenção do equipamento [44].

### II.1.3 - Ultrafiltração

Ultrafiltração é um processo de separação por membrana que utiliza pressão hidrostática como força motriz. O princípio básico de ultrafiltração é mostrado esquematicamente na figura 14. Quando é aplicada pressão hidrostática no compartimento de alimentação, solvente e soluto de pequeno tamanho atravessam a membrana como filtrado, enquanto que solutos maiores são retidos pela membrana e concentrados [1].

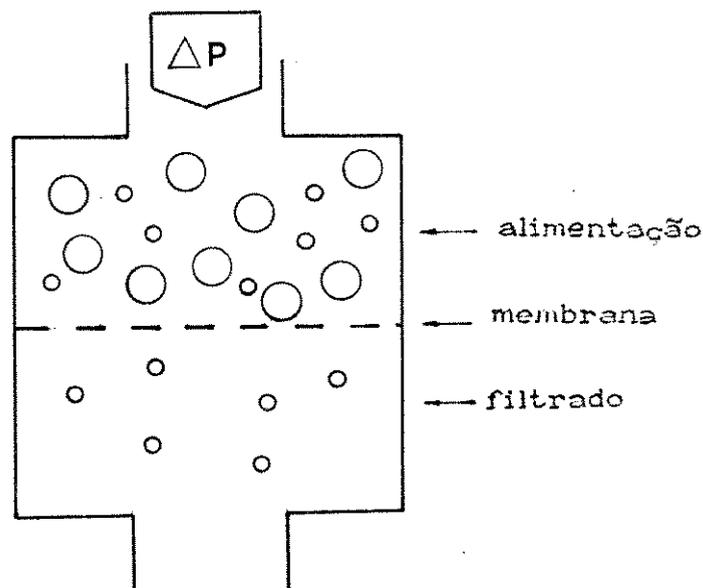


Figura 14 - Representação esquemática do princípio básico de operação de ultrafiltração [1].

O mecanismo de separação em ultrafiltração é, em princípio, governado apenas pela diferença de tamanho entre as moléculas de soluto e a membrana. O mesmo princípio é aplicado também em outros processos de membrana, tais como microfiltração e osmose-reversa. A diferença básica entre estes tres processos é dada pelo tamanho das partículas ou moléculas que podem ser retidas pelas várias membranas. Desta forma, a cada um dos processos está associada uma faixa de tamanho médio de poros da membrana utilizada [2]:

MICROFILTRAÇÃO: 0,2 a 10  $\mu\text{m}$  (i.é., 200 a 10.000 Å).

ULTRAFILTRAÇÃO: 0,001 a 0,02  $\mu\text{m}$  (i.é., 10 a 200 Å) ou 300 a 300.000  $\text{g.mol}^{-1}$ , em proteínas globulares.

OSMOSE-REVERSA: 0,0001 a 0,001  $\mu\text{m}$  (i.é., 1 a 10 Å).

A figura 15, mostra alguns exemplos de moléculas ou partículas que são retidas pela membrana e as que podem permeá-la em cada processo. Assim, proteínas, carboidratos ou polímeros podem ser concentrados, desidratados ou dessalinizados em ultrafiltração. Por outro lado, os sais que permeiam membranas de ultrafiltração podem ser retidos por membranas de osmose-reversa [5].

Outro aspecto que normalmente é considerado na distinção entre os tres processos é a faixa de pressão hidrostática utilizada. Quando as moléculas a serem concentradas são muito pequenas, por exemplo com massa molar abaixo de 1000  $\text{g.mol}^{-1}$ , a pressão osmótica da solução se torna significativa e, portanto, não pode ser negligenciada em relação à pressão hidrostática aplicada. Desta maneira, o incremento de pressão hidrostática utilizada em osmose-reversa é de 20 a 100 atms, em ultrafiltração é de 1 a 10 atms e em microfiltração de 0,1 a 1 atm [1, 2].

tamanho	massa molar	exemplo	processo de membrana
→ 100 $\mu$ m		Polem	microfiltração
→ 10 $\mu$ m		amido	
→ 1 $\mu$ m		células do sangue	
→ 1000Å		bactéria	
→ 100Å	100.000	DNA, vírus	ultrafiltração
→ 10Å	10.000	albumina	
→ 1Å	1.000	vitamina B-12	
→ 1Å		água Na <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	osmose-reversa

figura 15 - Espécies que podem ser retidas nos tres processos de separação por membranas [51].

O processo de ultrafiltração começou a se desenvolver como um processo prático de concentração e purificação de soluções macromoleculares e coloidais à partir de 1960. O crescente interesse neste processo foi acompanhado pelo desenvolvimento de membranas de alto fluxo e capazes de distinguir espécies macromoleculares de diferentes tamanhos.

Na prática, o processo passou a ser uma alternativa para um grande número de unidades de operação no processamento de alimentos, em indústrias químicas e farmacêuticas para a concentração, purificação e esterilização de soluções macromoleculares e coloidais, em escalas de laboratório e industrial [52]. O processo tem crescido muito e foi estimado que em 1982 atingia um mercado internacional de

50 milhões de dólares por ano, dos quais 75% são destinados à indústria e o restante a aplicações de laboratório [2].

Uma das maiores aplicações de ultrafiltração, em escala industrial, é na substituição de secagem por aquecimento e evaporação a vácuo. Na secagem convencional de alimentos, por exemplo, grande parte do aroma original, da textura, cor e mesmo valor nutritivo são perdidos por degradação térmica. A ultrafiltração evita grande parte dos riscos associados ao processo de secagem convencional que envolve mudança de fase [58]. O processo é atérmico e permite remoção de até 90% de água, evitando degradação térmica e oxidativa. Além disso, como não ocorre mudança de fase, sua aplicação evita ocorrência de colapso de géis, quebra de emulsões e danos mecânicos associados ao congelamento [53, 54].

As principais aplicações de ultrafiltração, em escala industrial, são: (i) recuperação de tintas; (ii) recuperação de látex; (iii) recuperação de álcool poli(vinílico); (iv) separação água/óleo e (v) purificação de fármacos e substâncias biológicas.

Muitas indústrias, principalmente as automobilísticas, utilizam atualmente ultrafiltros para remover o excesso de água e impurezas de tintas, durante o processo de deposição eletrolítica.

Outra aplicação econômica de ultrafiltração é na recuperação de látex de soluções residuais. Na produção de álcool polivinílico, o processo é utilizado para concentrar a solução e permitir sua reciclagem.

Emulsões água/óleo são resíduos industriais muito comuns e de difícil tratamento. As gotículas de óleo são raramente menores que  $0,1 \mu\text{m}$  e, portanto, podem ser retidas por uma membrana de ultrafiltração (por exemplo, acetato de celulose) [51].

Existem numerosas aplicações de ultrafiltração na indústria

farmacéutica [55]. A purificação de substâncias biologicamente ativas a partir de soluções diluídas é um processo frequentemente muito difícil. Materiais biológicos são muito sensíveis a variações térmicas e químicas do meio e isto limita as técnicas de purificação a serem empregadas. Neste sentido, o emprego de ultrafiltração é justificado pelas seguintes vantagens: o processo utiliza baixas pressões hidrostáticas; não ocorre mudança de fase; não utiliza reagentes químicos; mantém a força iônica e o pH da solução concentrada e, desta forma, evita a inativação de enzimas e a desnaturação de proteínas; concentra e purifica ao mesmo tempo. Todas estas vantagens somadas garantem também sua viabilidade econômica [51].

Em processamento de soro em larga escala, a ultrafiltração é utilizada basicamente na dessalinização e na concentração de soluções obtidas em processos clássicos de fracionamento por precipitação [34].

#### II.1.4 - Polarização em ultrafiltração

Existem dois fenômenos que normalmente estão associados ao processo de transferência de massa através de membrana e que alteram suas características intrínsecas de fluxo e retenção: (i) polarização e (ii) adsorção. No primeiro caso, existe uma tendência de solutos retidos a se acumularem próximos à superfície da membrana à medida que o solvente é transferido. Há um aumento da concentração de espécies retidas em função da diminuição da distância entre um ponto no interior da solução e a superfície da membrana. O segundo fenômeno é decorrente de uma interação específica do soluto com grupos superficiais da membrana. Há uma obstrução específica de poros, ocasionada pela deposição seguida de aderência de solutos macromoleculares sobre a superfície da membrana e as paredes dos

poros. Esta obstrução provoca uma redução da porosidade da membrana, ou seja, diminuição do tamanho médio de poros [56, 57].

Os tratamentos clássicos do fenômeno de polarização em transporte de massa seguem duas linhas que diferem na interpretação do fenômeno. No caso de solutos de baixa massa molar, a redução de fluxo é atribuída ao aumento da pressão osmótica da camada de solução concentrada e, portanto, à redução da pressão efetiva para o transporte de massa. Em sistemas de massa molar elevada a pressão osmótica é muito pequena e atribui-se a polarização à formação de uma camada gelificada sobre a superfície da membrana devida à alta concentração de soluto acumulado [58]. Neste caso, a redução de fluxo é consequência do incremento de resistência hidráulica fornecido pela camada de gel, que pode vir a ser dominante [61].

Kozenski e Lightfoot [62] estudaram a ultrafiltração de soluções de albumina e atribuíram a redução de fluxo de solvente ao aumento da pressão osmótica. Vilker [63] também estudou o comportamento destas soluções e obteve experimentalmente a distribuição de soluto acumulado próximo à superfície da membrana. Foi observado que a concentração de albumina retida pode chegar a 60% na superfície da membrana sem a evidência de formação de gel. Nestas condições, a pressão osmótica praticamente se iguala à pressão aplicada e, desta forma, limita o fluxo devido à diminuição da força propulsora do processo:  $\Delta P - \Delta \Pi$  [64, 65]. O desvio da relação entre fluxo de solução através da membrana e pressão hidrostática aplicada, ocasionado por polarização, é dado por [51]:

$$J_v = \frac{\Delta P - \Delta \Pi}{R_m + R_p} \quad (6)$$

onde  $R_m$  e  $R_p$  são as resistências de fluxo da membrana e da camada

polarizada, respectivamente e  $\Delta\pi$  é a diferença de pressão osmótica da solução nas duas interfaces membranas-solução.

Vários trabalhos teóricos e experimentais discutem a polarização por concentração e seu efeito sobre o fluxo de filtrado e sobre a retenção da membrana [66-71].

O modelo de camada de gel foi discutido inicialmente para dispositivos de ultrafiltração, onde se assume que a solução de alimentação flui em uma camada laminar adjacente à superfície da membrana (figura 16). Durante o processo, atinge-se um estado estacionário quando o transporte de soluto em direção à membrana for igual ao fluxo difusivo do material retido, em sentido contrário. Desta forma, o perfil de concentração do material retido se torna constante e sua concentração na superfície da membrana,  $C_g$ , será maior que no interior da solução,  $C$  [1].

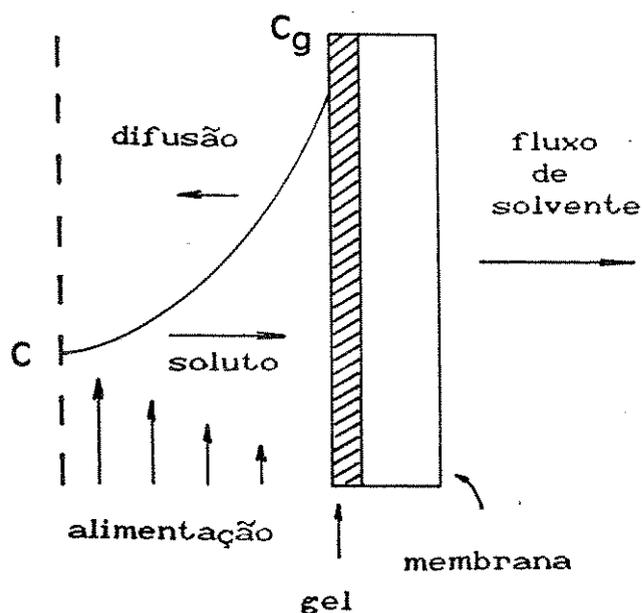


Figura 16 - Formação de camada de gel em ultrafiltração.

Geralmente, as expressões obtidas através de tratamentos matemáticos para a polarização mostram que a vazão de solvente é função dos seguintes parâmetros: (i) fluxo de solvente através da membrana; (ii) espessura da camada polarizada (ou gel); (iii) coeficiente de difusão do soluto e (iv) retenção de soluto pela membrana. A polarização pode ser controlada pela redução da espessura da camada polarizada. Isto pode ser conseguido através de altas taxas de cisalhamento da solução de alimentação, o que também aumenta o custo do processo [1, 51] e pode danificar os produtos. Porém, o desenvolvimento do processo de ultrafiltração depende do controle da camada de polarização. Em escala de laboratório isto é feito através de agitação da solução de alimentação logo acima da membrana. Em escala industrial, a solução de alimentação é bombeada paralelamente à superfície da membrana para arrastar parte do soluto acumulado. Neste caso, o fluxo de filtrado pode ser aumentado de 2 a 20 vezes em relação a celas com agitação mecânica [51].

Charm e Lai [72] fizeram comparação de vários dispositivos de ultrafiltração para uso em laboratório. Os resultados obtidos indicaram que o maior valor de fluxo de filtrado, utilizando-se como alimentação uma solução de catalase, foi através de fluxo laminar transversal, em comparação a fluxo turbulento e vibração da membrana.

Comercialmente existem vários tipos de dispositivos de ultrafiltração disponíveis: (i) módulo tipo filtro-prensa; (ii) módulo espiral; (iii) tubular e (iv) fibra ôca. Estes dispositivos diferem basicamente na configuração da membrana e na distribuição de fluxo da solução de alimentação, além da faixa de pressão aplicada e do custo de operação. Um parâmetro importante na escolha do módulo refere-se à facilidade de limpeza das membranas, ou em algumas aplicações, de sua esterilização [2]. Por exemplo, em módulos de

fibra-ôca podem ser utilizados dois tipos de limpeza: retrolavagem e recirculação com solvente. As operações de limpeza podem ainda ser mais eficientes se, para isto, for utilizada solução de hidróxido de sódio, desde que as membranas sejam suficientemente resistentes [73].

A vantagem do módulo tubular é que a velocidade de fluxo da solução de alimentação pode ser ajustada dentro de uma ampla faixa, para controle do efeito de polarização. Neste tipo de dispositivo a membrana é suportada em um tubo poroso de 0,4 a 10 cm de diâmetro. Isto garante sua resistência a pressões elevadas e possibilita limpeza mecânica quando ocorre polarização excessiva. A maioria das unidades de ultrafiltração industriais utilizam este tipo de módulo [1].

O desenvolvimento da camada de polarização sobre a membrana pode ser ainda acompanhado por adsorção específica das moléculas de soluto na superfície da membrana. Vários trabalhos nesta área discutem a extensão e o controle deste efeito, que geralmente é observado em ultrafiltração de soluções de proteínas [57, 74-76]. Foi verificado que a polarização é irreversível e ocorre através de interações intermoleculares fortes na camada de gel [56]. Estas interações dependem do tipo de membrana utilizada e das condições de pH e força iônica da solução de proteína [77]. Neste caso, o controle e redução da camada polarizada torna-se mais complicado. A retrolavagem da membrana não é suficiente para restaurar o fluxo de solvente. Porém, o tratamento com soluções contendo enzimas ou surfactantes pode ser conveniente em certos casos [55].

Radovich [40] utilizou o efeito de campo elétrico sobre proteínas carregadas para reduzir sua polarização. Em seu dispositivo, o fluxo eletroforético em sentido contrário à superfície da membrana garantiu a redução de proteína acumulada e a melhoria do fluxo de solvente.

A polarização também compromete as características de retenção da membrana. Supondo, por exemplo, que a solução de alimentação contenha dois solutos de massas molares bastante diferentes, favorecendo a transferência de um e a retenção de outro pela membrana, a polarização pode resultar em uma membrana secundária formada pelo soluto retido. Esta membrana secundária pode ainda possuir maior retenção que a real, evitando a passagem das moléculas menores. A característica de retenção, neste caso, depende principalmente do tipo de polarização resultante. Apenas com o controle da polarização, a capacidade de fracionamento da membrana pode ser explorada [1, 51].

#### II.1.5 - Ultrafiltração centrífuga

A ultrafiltração centrífuga é uma variação do processo convencional de ultrafiltração e foi desenvolvida recentemente em nosso laboratório [78]. Em trabalho anterior foi demonstrada a eficiência deste processo na redução da polarização para soluções de proteínas puras e algumas misturas de proteínas.

A redução da polarização em ultrafiltração centrífuga ocorre devido a uma peculiaridade simples deste processo. O dispositivo, que consiste de uma cela com dois compartimentos separados por uma membrana, é colocado em caçapa de centrífuga de tal maneira que a membrana seja posicionada paralelamente ao campo inercial. Durante a ultrafiltração centrífuga, a migração de solvente através da membrana deixa uma camada de solução mais concentrada na sua superfície. Forma-se, assim, um gradiente de concentração horizontal. Porém, sob a ação do campo inercial, a camada mais densa é deslocada para o fundo da cela enquanto a porção mais diluída (menos densa) é levada para cima, conforme a figura 17. Há, então, renovação contínua do líquido

na superfície da membrana, sem a necessidade de agitação adicional. O campo inercial atua de forma a impulsionar a solução através da membrana e, ao mesmo tempo, na despolarização do material acumulado em sua superfície.

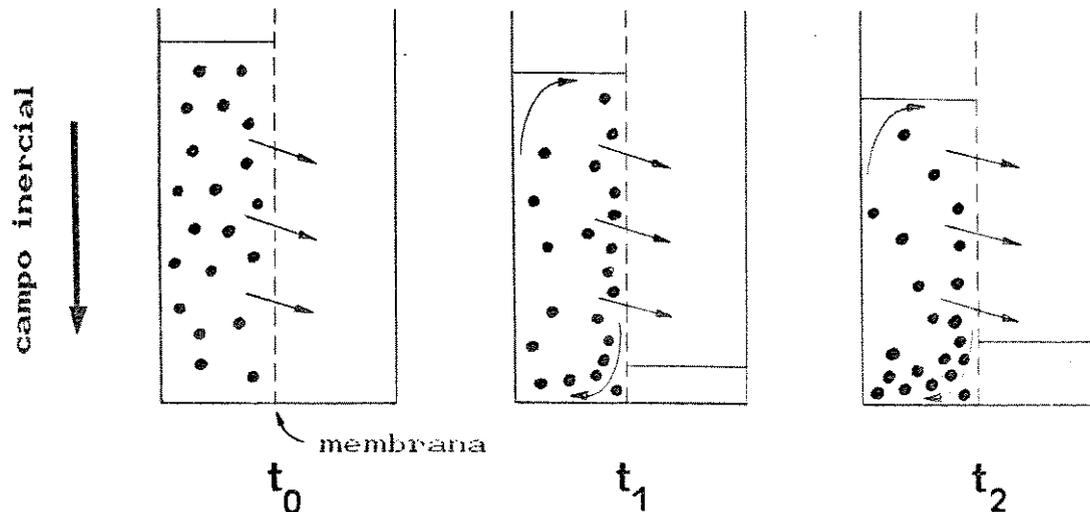


Figura 17 - Esquema de despolarização no processo de ultrafiltração centrífuga.

#### II.1.6 - Ultrafiltração centrífuga em múltiplo estágio

A ultrafiltração em múltiplo estágio utiliza o mesmo princípio básico da ultrafiltração centrífuga, diferindo apenas no tipo da montagem do dispositivo. Para isto, são posicionadas 3 membranas paralelamente e entre elas são formados 4 compartimentos: um destinado à solução de alimentação e 3 aos filtrados. Este tipo de arranjo permite obter ultrafiltração em cascata, pois a solução pode ser filtrada através das 3 membranas ao mesmo tempo, como é indicado na figura 18. Além disso, colocando-se membranas com tamanho de poros decrescentes à medida que se afastam do compartimento de alimentação, é possível obter fracionamentos sucessivos. Este tipo de arranjo de

membranas em dispositivo de ultrafiltração centrífuga é também utilizado neste capítulo da tese.

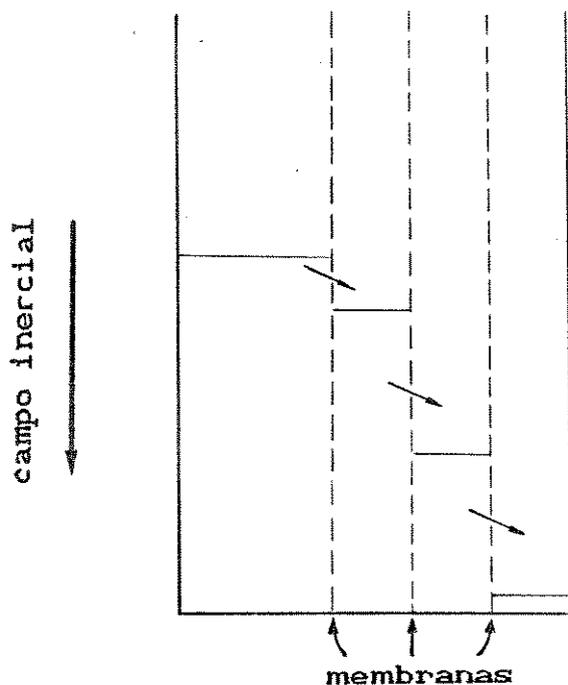


Figura 18 - Esquema do processo de ultrafiltração em múltiplo estágio.

#### II.1.7 - Osmossedimentação e osmocentrifugação

Galembeck e colaboradores [80-83] observaram que a velocidade de sedimentação de um macrosoluto é aumentada quando uma solução é colocada em contato com o solvente, através de uma membrana semi-permeável. Esta consequência do acoplamento de fluxos osmóticos a fluxos de sedimentação sob gravidade é chamada de osmossedimentação [84]. Quando o acoplamento de fluxos ocorre sob campo inercial, o processo é chamado de osmocentrifugação. A figura 19 ilustra um esquema dos fluxos que ocorrem em experimentos de osmossedimentação e osmocentrifugação. Nestes experimentos é utilizada uma cela de diálise com uma membrana vertical que separa dois compartimentos.

Assim, a solução em estudo fica em contato com o solvente através da membrana.

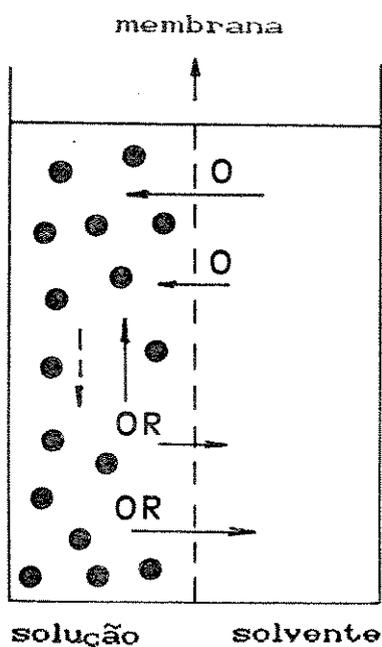


Figura 19 - Transporte de massa em processos de osmossedimentação ou osmocentrifugação. (O) osmose; (OR) osmose reversa.

No topo da cela ocorre fluxo de solvente para a solução devido a forças osmóticas. Por outro lado, o fluxo de solvente no fundo da cela ocorre em sentido contrário, ou seja, do compartimento da solução para o compartimento do solvente, por osmose reversa.

O movimento de líquido no interior do compartimento de solução arrasta o soluto para o fundo da cela até que se atinja um gradiente de concentração estacionário. Neste ponto, os potenciais químicos do soluto e do solvente serão uniformes em toda a cela e a variação da concentração de soluto com a profundidade da solução será dada pela equação barométrica (seção III.1.4.2).

A osmocentrifugação foi tratada teoricamente, utilizando-se formalismo de termodinâmica de não-equilíbrio. Foi determinado que o soluto sedimenta em uma cela de diálise com coeficientes de sedimentação aparente várias ordens de magnitude maiores que o coeficiente de sedimentação normal. Estes coeficientes de sedimentação aumentam com a concentração de soluto, com a altura da cela e com a área e a permeabilidade da membrana [85].

#### II.1.8 - Objetivo

Os desempenhos dos processos de separação por membranas serão avaliados em experimentos que objetivam fracionar e concentrar soro sanguíneo. Os processos que são utilizados neste capítulo incluem: osmocentrifugação, ultrafiltração centrífuga e em múltiplo estágio.

## II.2 - Parte experimental

### II.2.1 - Materiais e equipamentos

Soro bovino fetal e adulto, Cultilab (Campinas), lotes 1033 e 4001, respectivamente.

Dextrana azul 2000, lote KH3833, Pharmacia Fine Chemicals.

Citocromo-C (de cavalo), lote 91F-7050, Sigma n°.C-2506.

Inibidor de tripsina (soja), lote 91F-8110, Sigma n°.T-9003.

Albumina bovina, lote 41F-0059, Sigma n°.A-2153.

Gamablobulina humana, lote 102486, Immuno.

Gamablobulina bovina, lote 1012, Pentex-Miles Laboratories.

Beta-amilase, lote 105F-8035, Sigma n°. A-7005.

Ferritina (baço de cavalo), lote 38C-81002, Sigma n°. F-4503.

Acetato de celulose, Rhodia.

Sephacryl S-300 e S-400, Pharmacia Fine Chemicals.

Coluna LKB e acessórios, dimensões: altura = 95 cm; diâmetro = 1,6 mm.

Bomba peristáltica, Buchler Instruments.

Espectrofotômetro UV-visível, Micronal B382, com cela de fluxo de 0,25 ml e 1,00 mm de caminho ótico, Thomas.

Registrador ECB, modelo PB101.

Centrífuga refrigerada, de caçapas basculantes, RC-38, Sarvall Instruments.

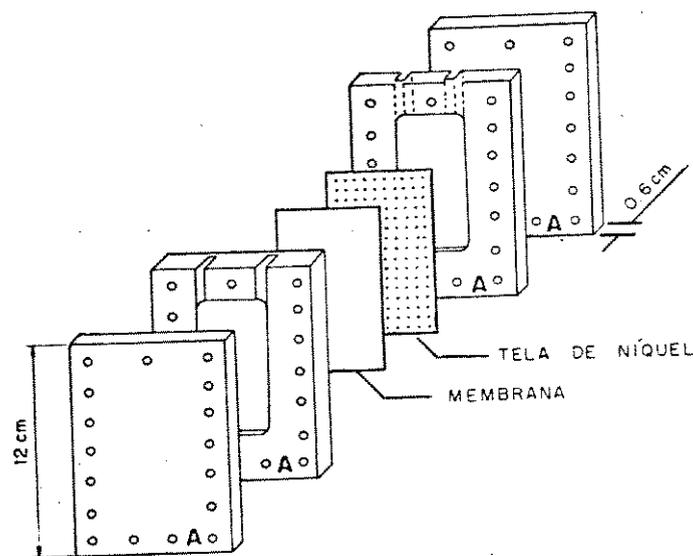
Planímetro Hruden.

Densímetro PAAR-DMA 60/602.

## II.2.2 - Cella de ultrafiltração centrífuga e osmocentrifugação

Nos experimentos de ultrafiltração e osmocentrifugação descritos neste capítulo foram utilizadas celas de acrílico (figura 20). Estas celas são formadas por quatro placas que são justapostas e parafusadas juntamente com uma membrana e um suporte. Entre as placas de acrílico foram também colocadas guarnições de PVC para evitar vazamentos. O suporte utilizado para acomodar a membrana consiste de um filme rígido de níquel, perfurado por eletroerosão (1444 furos por  $\text{cm}^2$ , sendo o diâmetro dos furos igual a 0,02 mm). Este suporte garante a resistência mecânica da membrana durante os experimentos em centrífuga.

A cela montada possui dois compartimentos separados entre si pela membrana e orifícios para alimentação e coleta de soluções. A área útil da membrana nestas celas é de  $24 \text{ cm}^2$  e a capacidade de cada compartimento é de 17 ml.



A = Acrílico

Figura 20 - Cella de ultrafiltração centrífuga e de osmocentrifugação.

### II.2.3 - Membranas

Nestes experimentos foram utilizadas membranas de acetato de celulose, preparadas a partir das seguintes soluções:

Solução A: 11% (m/m) de acetato de celulose.  
23% (m/m) de ácido acético.  
43% (m/m) de acetona.  
23% (m/m) de água destilada.

Solução B: 11% (m/m) de acetato de celulose.  
66% (m/m) de ácido acético.  
23% (m/m) de água destilada.

Foram escolhidas membranas de acetato de celulose, cujo método de preparação já era estabelecido há vários anos em nosso laboratório [86, 87] e que já haviam sido testadas satisfatoriamente em alguns experimentos anteriores de ultrafiltração centrífuga.

As membranas utilizadas nos experimentos que serão descritos a seguir, foram preparadas em uma máquina semi-automática de fabricação de membranas que é esquematizada na figura 21. Esta foi construída durante o desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

Nesta máquina, um êmbolo acoplado a um cilindro hidráulico impulsiona placas de vidro (20 x 30 cm), colocadas manualmente próximas ao êmbolo e apoiadas sobre trilhos. A cada impulso hidráulico temporizado, a placa se desloca uma unidade de seu comprimento e se coloca sob um espalhador preenchido com solução de membrana. O espalhador possui um desnível na parede da frente, que corresponde à espessura da camada de solução a ser espalhada sobre a

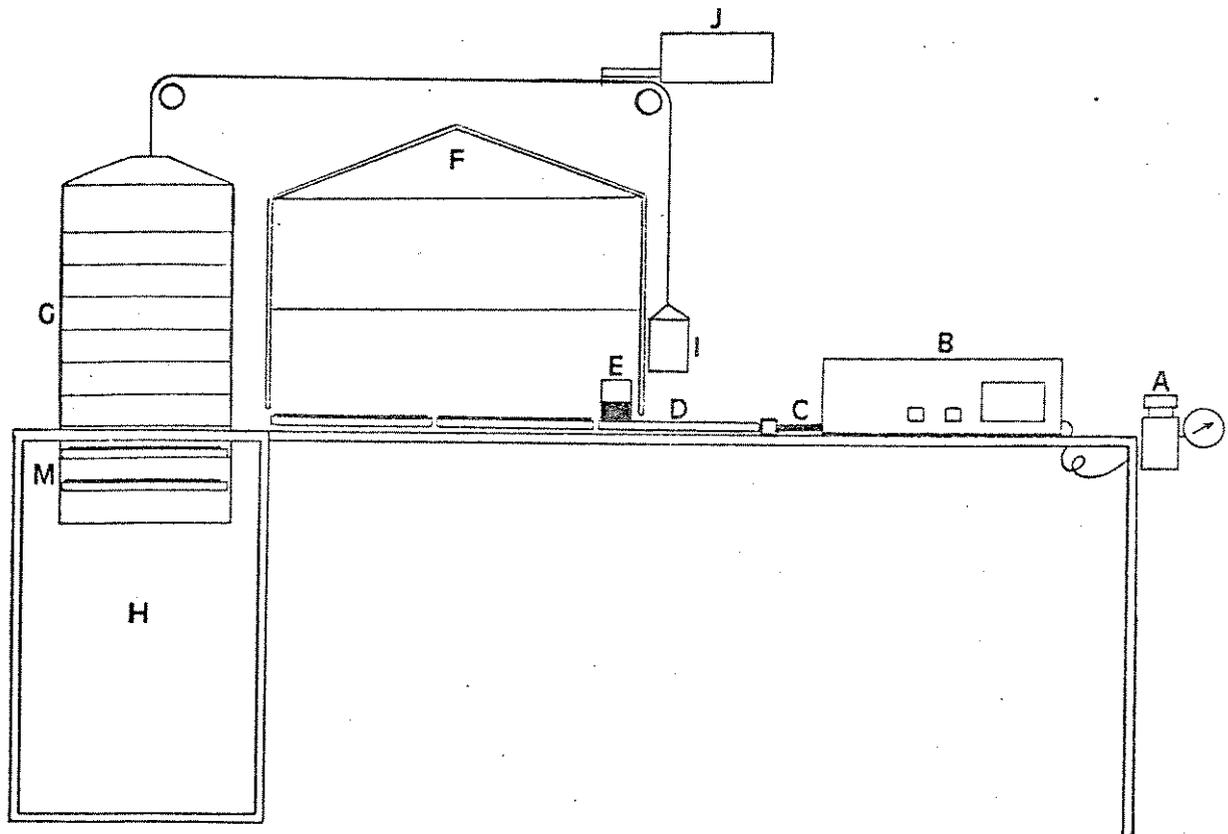


Figura 21 - Máquina de fabricação de membrana: A - regulador de pressão (ar comprimido); B - painel de controle; C - embôlo; D - placa de vidro; E - espalhador de solução; F - capela de evaporação; G - grade; H - banho de água; I - contra-peso; J - cilindro hidráulico; M - membrana assimétrica

placa. Em um outro impulso do cilindro hidráulico, a placa de vidro passa sob o espalhador, de onde sai com uma camada de solução de membrana, que é evaporada durante o período de tempo prefixado, até o próximo impulso. Neste caso, o período total de evaporação das soluções foi de 10 minutos.

Na última etapa de funcionamento da máquina, a placa de vidro com solução é impulsionada para dentro de uma grade que logo em seguida mergulha dentro de um banho de água. O processo é repetido até que toda a grade esteja preenchida com placas e totalmente mergulhada no banho. Neste estágio, as soluções sobre as placas são coaguladas dando origem a um lote de membranas assimétricas.

#### II.2.4 - Experimentos de ultrafiltração e de osmocentrifugação

Para a realização dos experimentos de ultrafiltração o compartimento da cela em contato com a membrana foi preenchido com a solução de alimentação e o outro foi mantido vazio. Nos experimentos de osmocentrifugação a solução de alimentação foi também colocada no mesmo compartimento, porém o outro foi preenchido com solvente.

As celas foram colocadas em caçapas de centrífuga, de maneira que a membrana ficasse perpendicular ao eixo de rotação durante a centrifugação.

#### II.2.5 - Experimentos de concentração

Inicialmente foram feitos experimentos de ultrafiltração de solução 30% (m/m) de soro fetal bovino em NaCl 0,1 M. Os compartimentos das celas foram preenchidos mantendo-se a altura da solução de alimentação igual a 7,0 cm. As celas foram colocadas nas caçapas da centrífuga e mantidas a 3000 rpm e 4°C, durante 4 horas.

Após a centrifugação foram retiradas aliquotas pelo topo da cela, com auxílio de uma seringa ligada a um capilar de vidro. No experimento de ultrafiltração centrífuga, a solução concentrada foi subdividida em 6 aliquotas, cada uma correspondendo a uma altura na cela, e o filtrado foi dividido em 2 aliquotas. No experimento de osmocentrifugação, a solução foi dividida em 7 aliquotas e o solvente em duas. Foram determinadas as densidades e as absorbâncias a 280 nm destas aliquotas. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 4 e 5. A altura,  $y$ , indicada na tabela para cada aliquota corresponde à distância do eixo de rotação a um ponto médio na coluna de solução dentro da cela.

Os gradientes de concentração de soluções de soro fetal bovino, obtidos em ultrafiltração centrífuga e em osmocentrifugação, fornecem gráficos de  $\ln C$  (ou  $\ln A$ )  $\times y^2$ , conforme figura 22.

Tabela 4 - Ultrafiltração centrífuga de solução 30% (m/m) de soro fetal bovino em NaCl 0,1 M ( $A_{280nm}^{30\%} = 0,825$ ,  $d^{4C} = 1,000868 \text{ g/cm}^3$ ), a 3000 rpm e 4°C, após 4 horas de centrifugação.

$y$ (cm)	Absorbâncias	Densidade 4°C ( $\text{g/cm}^3$ )
20,2	0,757	1,000832
20,7	0,869	1,000852
21,2	0,944	1,000883
21,7	1,172	1,000943
22,2	1,616	1,001173
22,7	2,760	1,001759
filtrado (média)	0,082	1,000551

Tabela 5 - Osmocentrifugação de solução 30% (m/m) de soro fetal bovino em NaCl 0,1 M ( $A_{280nm}^{30\%} = 0,825$ ,  $d^{4C} = 1,000868 \text{ g/cm}^3$ ), a 3000 rpm e 4°C, após 4 horas de centrifugação.

$y$ (cm)	Absorbâncias	Densidade 4°C ( $\text{g/cm}^3$ )
16,7	0,543	1,000638
17,7	0,647	1,000659
18,7	0,700	1,000689
19,7	0,761	1,000727
20,7	0,779	1,000764
21,7	0,864	1,000794
22,7	0,970	1,000837
solvente (média)	0,048	1,000453

As membranas utilizadas nestes experimentos foram preparadas a partir da solução A, com tempo de evaporação de 10 minutos. Estas membranas mostraram-se parcialmente permeáveis a proteínas de soro fetal bovino, o que pode ser observado nas absorbâncias do filtrado e do solvente (tabelas 4 e 5).

Para caracterizar a composição das alíquotas obtidas em experimentos de ultrafiltração e osmocentrifugação foi utilizada cromatografia de permeação em gel.

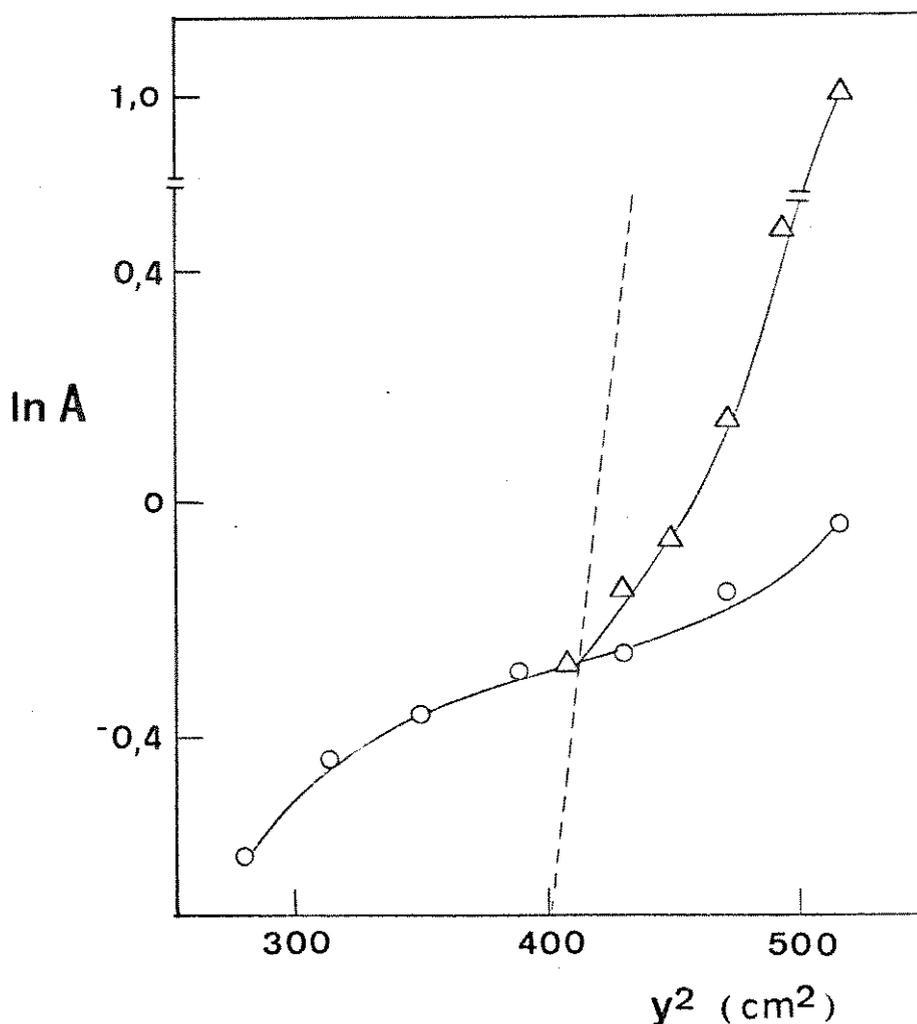


Figura 22 - Absorbância a 280 nm em função do quadrado da distância entre o eixo de rotação e o ponto considerado na cela. Solução 30% de soro fetal bovino em NaCl 0,1M, após 4 horas de centrifugação a 3000 rpm e 4°C em: (O) osmocentrifugação, (Δ) ultrafiltração centrífuga e (---) curva de equilíbrio de sedimentação de solução de albumina.

## II.2.6 - Caracterização das frações obtidas por cromatografia de permeação em gel.

Uma coluna de 95 cm de altura e 1,6 cm de diâmetro foi empacotada com Sephacryl S-400 (ou S-300), utilizando-se solução de NaCl 0,1 M como eluente. A altura da coluna de gel empacotado foi de

79,0 cm e o fluxo de empacotamento de 0,95 ml/min. A parte inferior da coluna foi conectada a uma célula de fluxo de quartzo (caminho ótico de 1,0 mm), que permitiu a leitura contínua de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Micronal B-362 e a obtenção do cromatograma em registrador. Na obtenção de cromatogramas de amostras de soro foi utilizado um fluxo constante de eluente de 0,57 ml/min. A partir destes cromatogramas é possível identificar os vários componentes do soro que diferem em suas massas molares. Como a maior parte das proteínas, neste caso, são globulares, a variação das massas molares será responsável pelos volumes de eluição obtidos. Assim, quanto maior for a massa molar de uma dada proteína, menor será o volume de eluição no qual ela será coletada na saída da coluna.

#### II.2.7 - Calibração da coluna

A tabela 6 mostra as várias proteínas utilizadas na calibração da coluna empacotada com o gel Shephacryl S-400 e seu volume de eluição. Estes volumes foram obtidos a partir da medida do tempo de retenção de cada proteína na coluna, sob fluxo de eluente constante. O eluente utilizado foi solução aquosa 0,1 M de NaCl. Cada uma das proteínas foi amostrada isoladamente, utilizando-se para isto 1,0 ml de solução 0,5% em massa.

O mesmo procedimento foi feito para uma outra coluna, contendo gel Sephacryl S-300 (tabela 7). A comparação entre os coeficientes de partição calculados para os dois géis é dada graficamente, em função do logarítimo da massa molar da proteína eluída, na figura 23.

Tabela 6 - Calibração da coluna de Shephacryl S-400.

PROTEÍNA	$\bar{M}_w$ [88] g.mol <sup>-1</sup>	ELUIÇÃO			K <sub>av</sub>
		Fluxo (ml/min)	Tempo (min)	Volume (ml)	
citocromo C inibidor de tripsina	15.600	0,59	265	158	0,985
albumina	67.000	0,58	256	149	0,884
ferritina	467.000	0,59	223	133	0,700
dextrana azul	2 x 10 <sup>6</sup>	0,57	207	118	0,532
		0,64	113	72,3(V <sub>0</sub> )	—

Tabela 7 - Calibração da coluna de Shephacryl S-300.

PROTEÍNA	$\bar{M}_w$ [88] g.mol <sup>-1</sup>	ELUIÇÃO			K <sub>av</sub>
		Fluxo (ml/min)	Tempo (min)	Volume (ml)	
citocromo C inibidor de tripsina	15.600	0,57	216	123	0,588
albumina	67.000	0,57	212	121	0,546
γ-globulina	169.000	0,57	187	107	0,397
dextrana azul	2 x 10 <sup>6</sup>	0,57	169	95,7	0,292
		0,57	119	67,5(V <sub>0</sub> )	—

onde:  $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$ , para  $V_t = 158,8$  ml

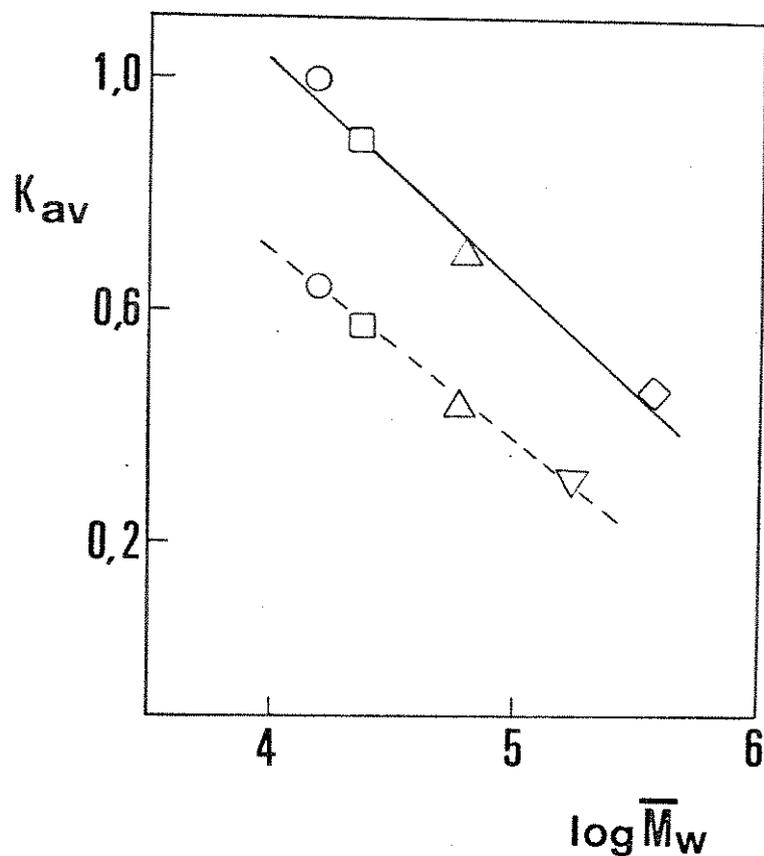


Figura 23 - Gráfico de  $K_{av}$  em função de  $\log M$ , em colunas empacotadas com sephacryl S-400 (—) e S-300 (--). Proteínas: (o) citocromo C; (□) inibidor de tripsina; (Δ) albumina; (▽) gamaglobulina e (◇) ferritina.

#### II.2.8 - Ultrafiltração centrífuga de soro fetal bovino

Um dos compartimentos da cela de acrílico, contendo a membrana A, foi preenchido com 17,0 ml de solução de soro fetal bovino diluído em NaCl 0,1 M. A solução foi centrifugada durante 2 horas a 3000 rpm e 4°C. Ao final da centrifugação, foram retirados 7,5 ml de filtrado. O compartimento da solução de alimentação foi completado com solução de NaCl 0,1 M e a cela foi centrifugada novamente durante

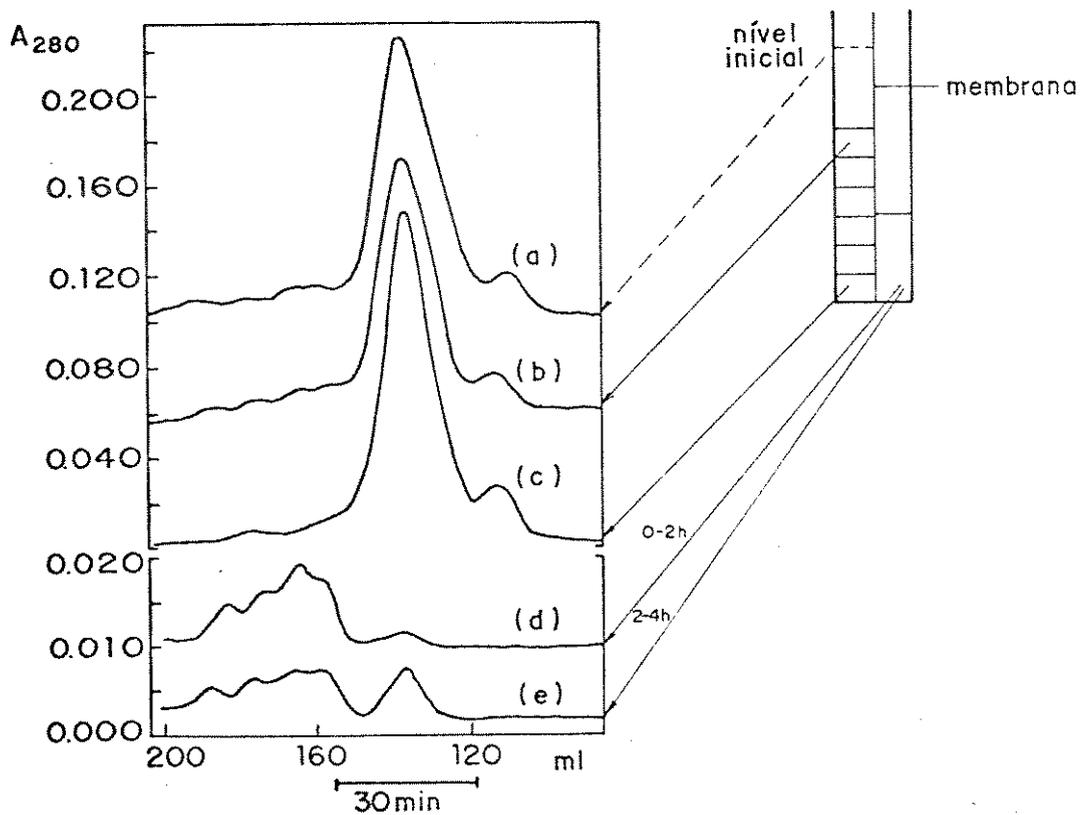
o mesmo tempo, rotação e temperatura. Foi coletado um segundo filtrado de 5,1 ml. A solução retida no compartimento de alimentação foi retirada e dividida em 6 frações, em função de sua altura na cela.

Os cromatogramas de permeação em gel da solução de alimentação, da primeira e sexta frações (ou topo e fundo), da solução retida e do dois filtrados são apresentados na figura 24. Nesta figura os cromatogramas foram deslocados verticalmente para facilitar comparações. Pode ser observado que os filtrados contêm concentrações consideráveis de componentes de baixa massa molar e muito pouco de alta massa molar. Comparando-se as frações do topo e do fundo da solução retida pode ser notada a diferença na proporção de componente de baixo peso molecular. Apesar da maior concentração total da fração do fundo, esta é mais pobre nestes componentes.

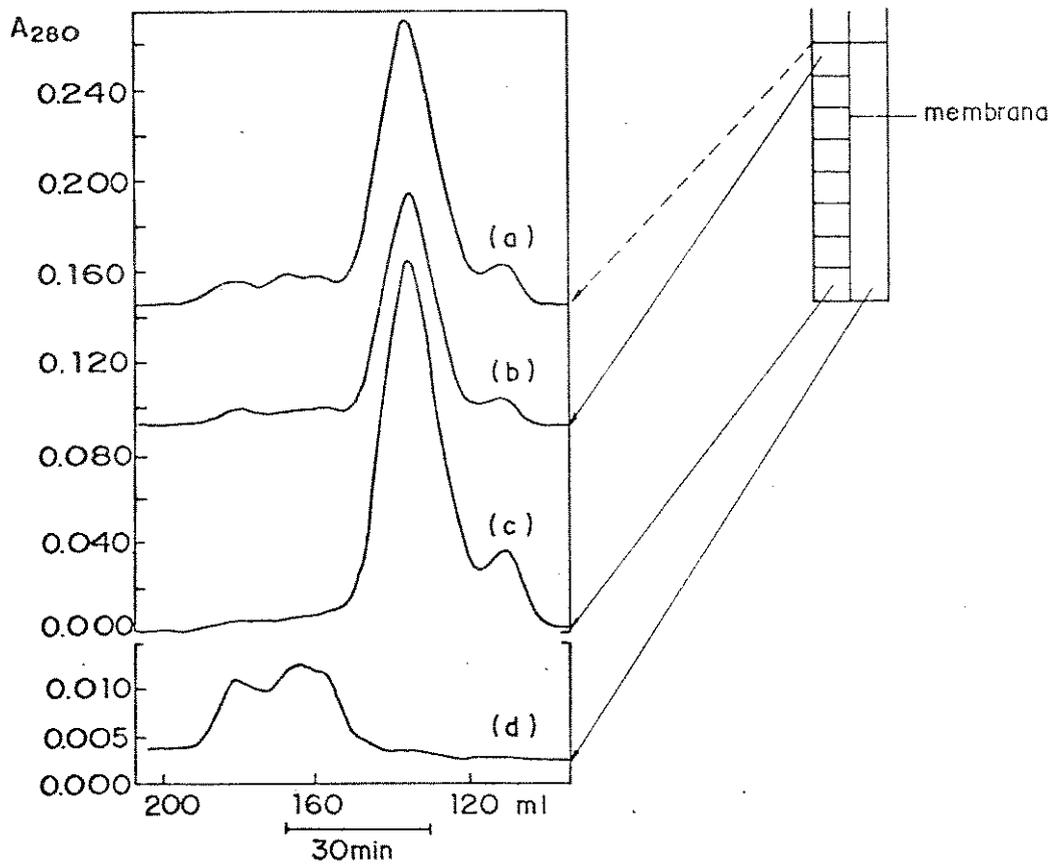
#### II.2.9 - Osmocentrifugação de soro fetal bovino

Foi preparada solução 30% de soro fetal bovino em NaCl 0,1 M, como no experimento anterior. Um dos compartimentos da cela foi preenchido com esta solução e o outro com solução 0,1 M de NaCl. A cela foi centrifugada durante 2 horas a 3000 rpm e 4°C. Foram, então, retiradas alíquotas dos dois compartimentos: uma do compartimento do solvente (mistura) e duas da solução retida (topo e fundo). São apresentados na figura 25 os cromatogramas destas alíquotas juntamente com a da solução de alimentação.

Os dados na figura 25 mostram que os componentes de baixa massa molar migram para o compartimento contendo solvente, o que também resulta na redução de sua concentração nas frações retidas. Novamente, a alíquota retirada do fundo da cela é mais concentrada que a solução de alimentação.



**Figura 24** - Cromatogramas de permeação em gel (Sephacryl S-400) de soro fetal bovino submetido a ultrafiltração centrífuga, durante 4h a 3000 rpm e 4°C. Cromatogramas: (a) 1,0 ml de solução 30% de soro em NaCl 0,1 M; (b) 1,0 ml da fração retida do topo; (c) 0,5 ml da fração retida do fundo; (d) 1,0 ml do primeiro filtrado e (e) 1,0 ml do segundo filtrado.

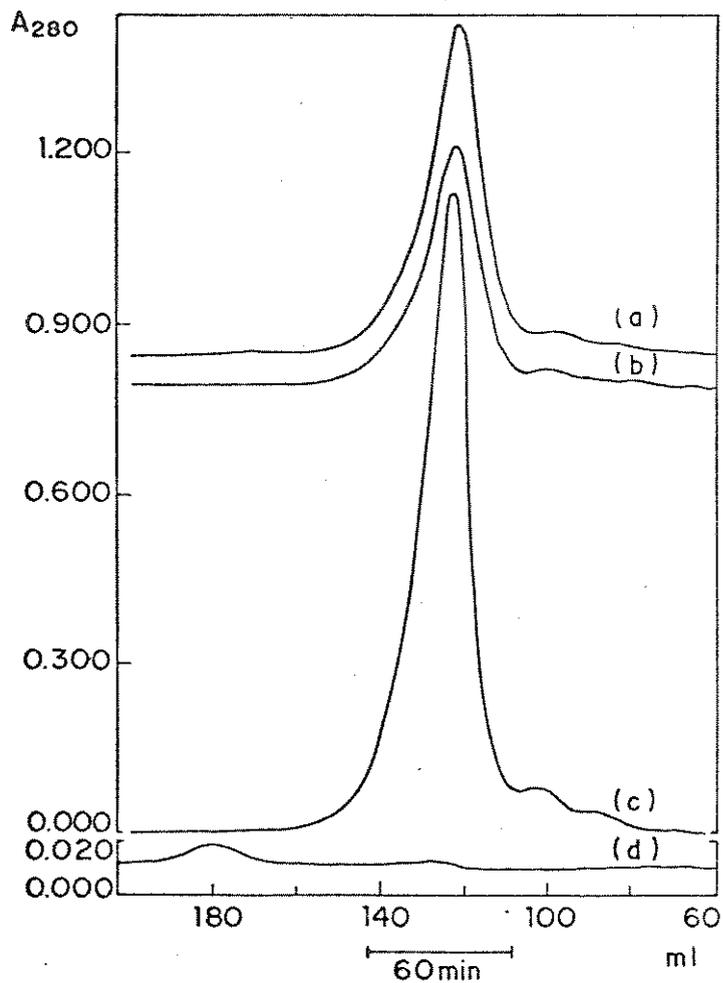


**Figura 25** - Cromatogramas de permeação em gel (Sephacryl S-400) de soro fetal bovino submetido a osmocentrifugação, durante 2 horas a 3000 rpm e 4°C. Cromatogramas: (a) 1,0 ml de solução 30% de soro em NaCl 0,1 M; (b) 1,0 ml da fração retida do topo; (c) 0,7 ml da fração retida do fundo; (d) 1,5 ml da solução coletada no compartimento inicialmente preenchido com solvente.

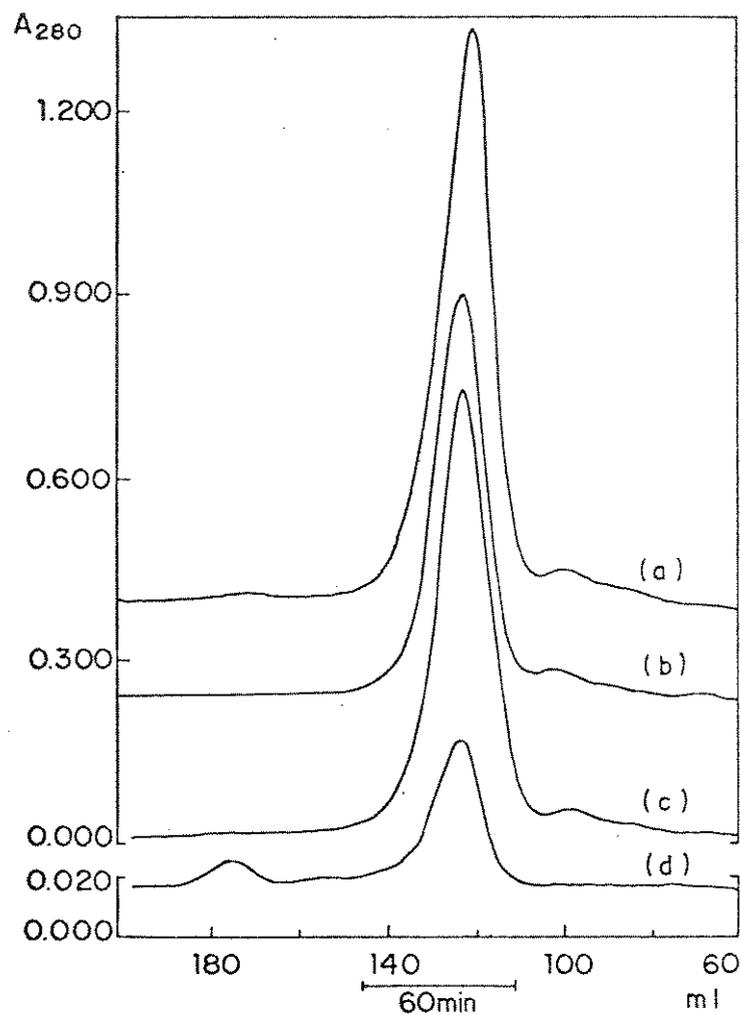
## II.2.10 - Ultrafiltração centrífuga de soro bovino adulto

Solução de soro bovino foi fracionada por ultrafiltração centrífuga, utilizando-se para isto duas membranas diferentes. A primeira delas foi preparada a partir da solução A, com tempo de evaporação, anterior à coagulação em água, de 10 minutos. A segunda foi obtida a partir da solução de composição B e deixada também evaporar por 10 minutos. Os experimentos foram análogos aos descritos anteriormente para soro fetal bovino. Após duas horas de centrifugação, foram coletados 7,0 ml de filtrado na cela com a membrana B. Nesta última cela foi observado nivelamento entre a solução retida e o filtrado.

Os resultados apresentados nas figuras 26 e 27 mostram que é possível obter diferentes graus de fracionamento através da utilização de membranas com diferentes características.



**Figura 26** - Cromatografia de permeação em gel (Sephacryl S-400) de soro bovino submetido a ultrafiltração centrífuga durante 2 horas a 3000 rpm e 4°C. Membrana A. Amostras: (a) 0,5 ml de soro bovino; (b) 0,7 ml da fração retida do topo; (c) 0,5 ml da fração retida do fundo da cela; (d) 1,0 ml do filtrado.



**Figura 27** - Cromatografia de permeação em gel (Sephacryl S-400) de soro bovino submetido a ultrafiltração centrífuga durante 2 horas a 3000 rpm e 4°C. Membrana B. Amostras: (a) 0,75 ml de soro bovino (alimentação); (b) 0,75 ml da fração retida do topo; (c) 0,25 ml da fração retida do fundo da cela; (d) 1,0 ml do filtrado.

## II.2.11 - Ultrafiltração centrífuga em múltiplo estágio

A partir dos resultados obtidos nos últimos experimentos foi construída uma cela de ultrafiltração contendo três membranas diferentes em série (figura 28). A montagem desta nova cela foi basicamente idêntica à anterior. As membranas foram posicionadas em função de suas características de fracionamento, ou seja, a membrana em contato com o compartimento de alimentação (membrana 1) é mais permeável que a seguinte (membrana 2) e esta também em relação à última (membrana 3). Isto significa que o tamanho médio de poros das membranas envolvidas deve diminuir na seguinte ordem: membrana 1 > membrana 2 > membrana 3. Este tipo de módulo permite que o efluente da membrana 1 seja filtrado pelas membranas 2 e 3, em uma única etapa.

Entre as tres membranas são formados quatro compartimentos. O primeiro compartimento, de volume duas vezes maior que os outros, foi destinado à alimentação, e os tres restantes aos filtrados. A área útil de cada uma das membranas foi de 24 cm<sup>2</sup>.

No primeiro experimento de ultrafiltração em múltiplo estágio, o compartimento destinado à alimentação foi preenchido com soro bovino não diluído, utilizando-se um volume de 30,0 ml. As membranas utilizadas na montagem da cela foram as seguintes:

Membrana 1: solução B, 5 minutos de evaporação.

Membrana 2: solução B, 10 minutos de evaporação.

Membrana 3: solução A, 10 minutos de evaporação.

A cela foi centrifugada durante 1 hora a 3000 rpm e 4°C. Os volumes obtidos ao final da centrifugação são apresentados na tabela 8, juntamente com o balanço de massa e os fatores de separação deste experimento. O balanço de massa foi feito com base nas áreas dos

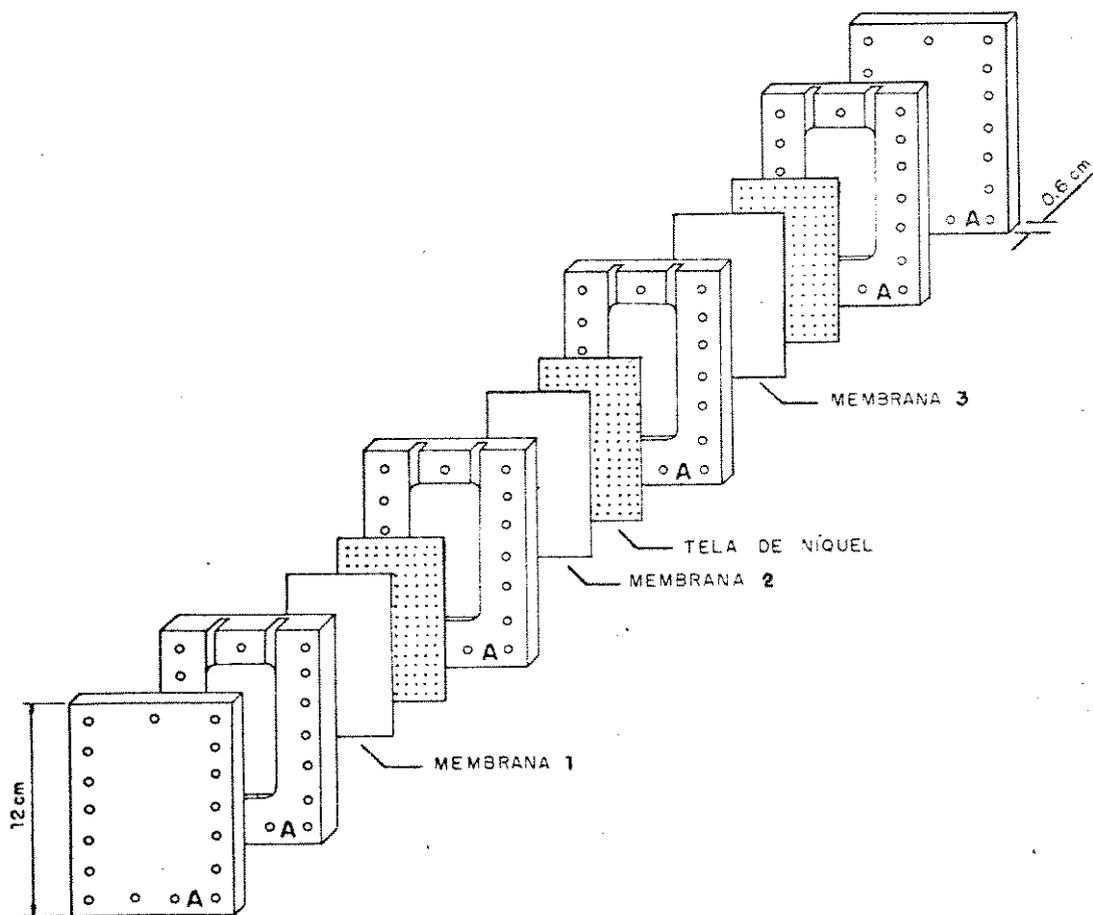
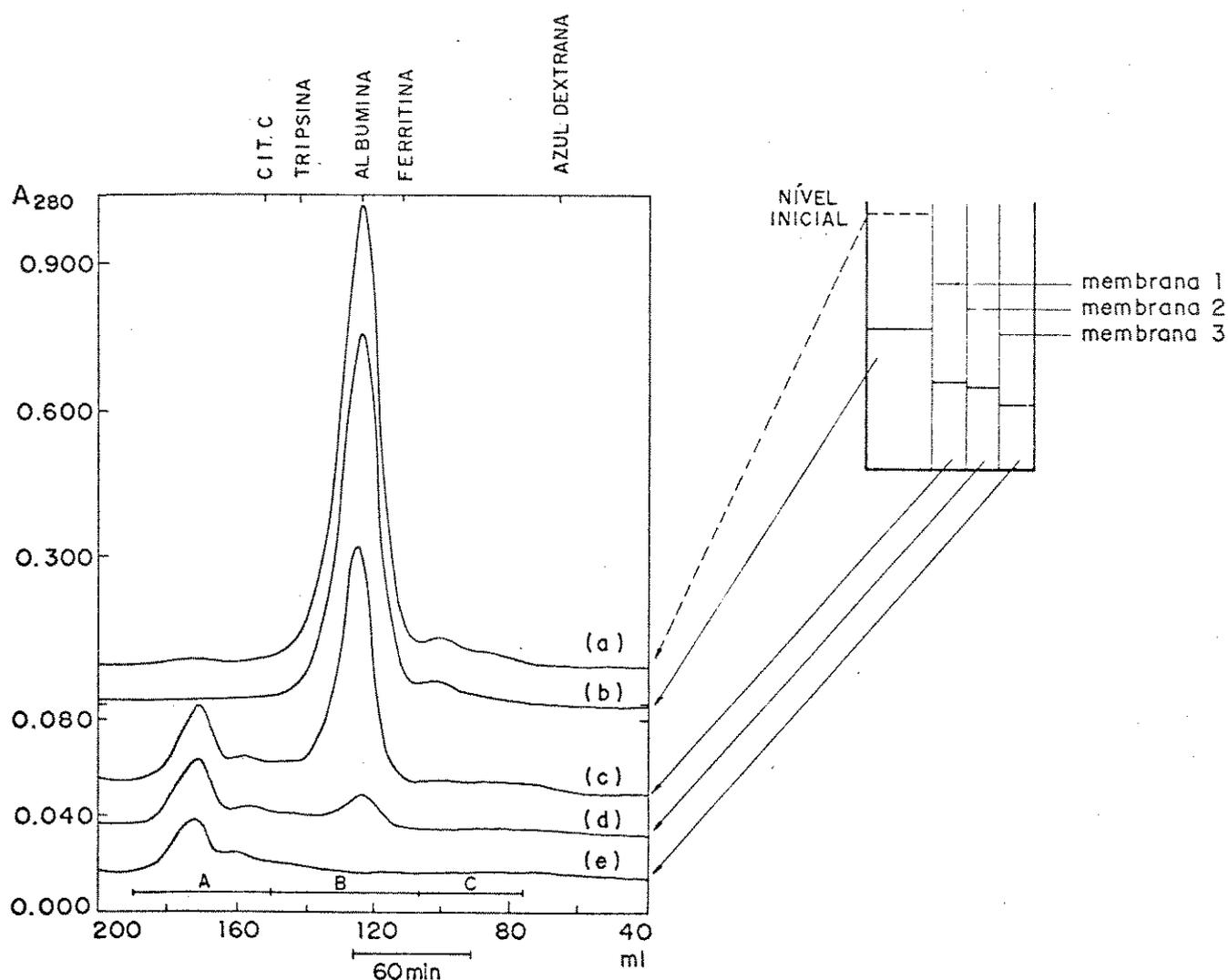


Figura 28 - Cella de ultrafiltração centrífuga em múltiplo estágio.

picos da figura 29, que são indicados com letras maiúsculas (componentes A, B e C). Esta figura apresenta os cromatogramas da solução de alimentação e das amostras coletadas nos quatro compartimentos, após a centrifugação.



**Figura 29** - Cromatogramas (Sephacryl S-400) de soro bovino submetido a ultrafiltração em múltiplo estágio durante 1 hora a 3000 rpm e 4°C. Amostras: (a) 0,75 ml da solução de alimentação; (b) 0,25 ml da solução retida; (c) 1,0 ml do primeiro filtrado; (d) 1,0 ml do segundo filtrado; (e) 1,0 ml do terceiro filtrado.

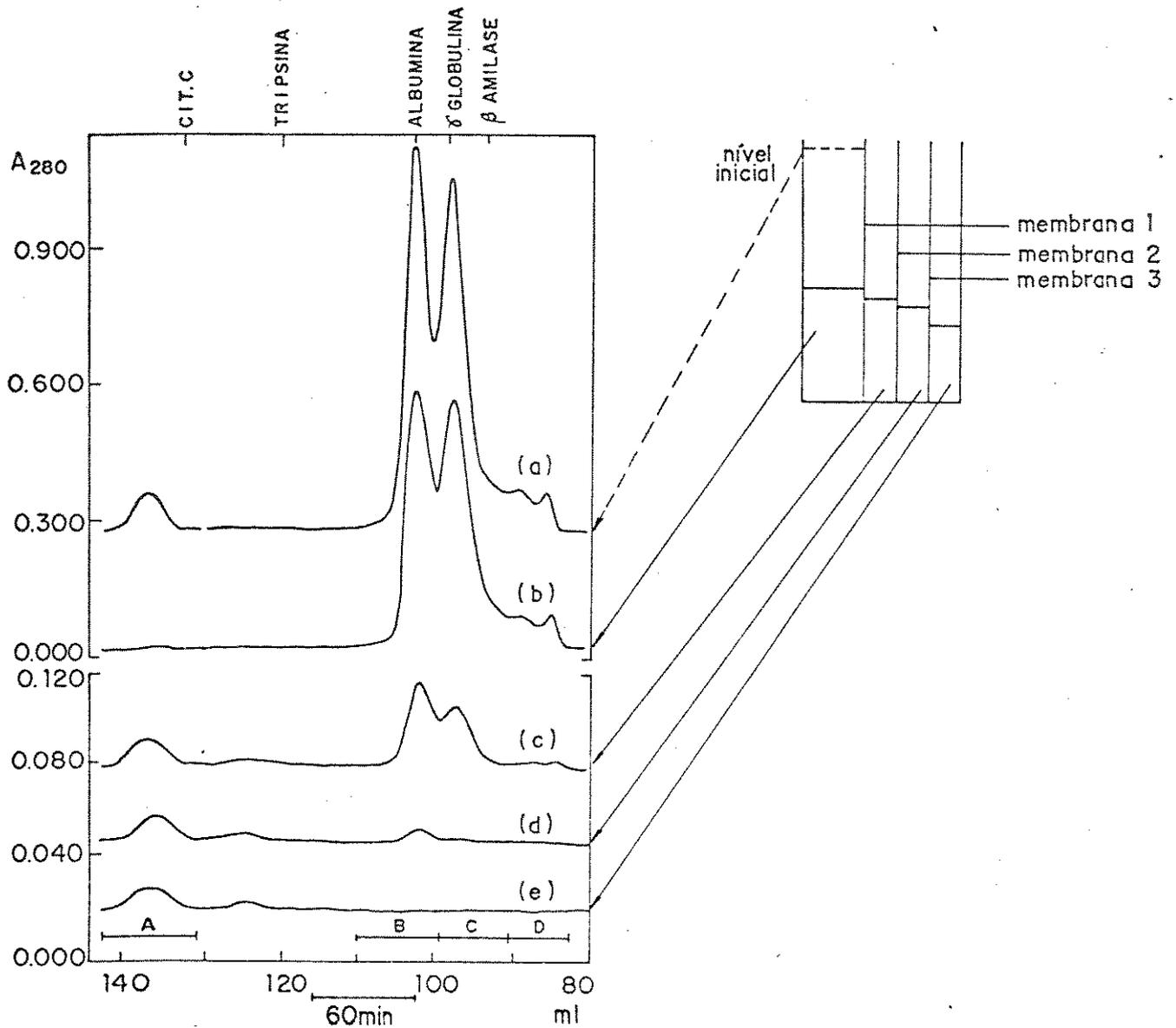
Tabela 8 - Balanço de massa e fatores de separação obtidos a partir da Figura 29, para a ultrafiltração em múltiplo estágio de soro bovino.

AMOSTRA	Volume (ml)	% de soluto (a)			B	C	C
		A	B	C	SF A	SF B	SF A
alimentação	30,0	100	100	100	—	—	—
retido	16,5	≈ 60	97	105	0,6	1,0	0,6
1º filtrado	4,8	15	1,7	—	9	>200	>3000
2º filtrado	5,0	16	0,3	—	53	—	—
3º filtrado	3,8	10	—	—	>2000	—	—

$$\text{onde } SF_j^i = \frac{(C_j/C_i)_{\text{filtrado ou retido}}}{(C_j/C_i)_{\text{alimentação}}}$$

(a) % de soluto foi obtida através das áreas dos picos da figura 29.

No segundo experimento de ultrafiltração centrífuga em múltiplo estágio foi utilizada, na alimentação, solução de soro bovino 30% diluída em solução 0,1 M de NaCl. Como no experimento anterior, a cela foi centrifugada durante 1 hora a 3000 rpm e 4°C. As amostras coletadas foram cromatografadas em uma coluna empacotada com o gel Sephacryl S-300, que permitiu melhor resolução das frações protéicas do soro (figura 30). A partir das áreas dos picos da figura 30 e dos volumes coletados nos vários compartimentos foram determinados o balanço de massa e os fatores de separação, deste experimento (tabela 9).



**Figura 30** - Cromatogramas de permeação em gel (Sephacryl S-300) de frações de soro bovino obtidas por ultrafiltração em múltiplo estágio durante 1 hora, 3000 rpm e 4°C. Amostras: (a) 0,75 ml da solução de alimentação (30% de soro bovino em NaCl 0,1 M); (b) 0,5 ml da solução retida; (c) 1,0 ml do primeiro filtrado; (d) 1,0 ml do segundo filtrado; (e) 1,0 ml do terceiro filtrado.

Tabela 9 - Balanço de massa e fatores de separação obtidos a partir da Figura 30, para a ultrafiltração em múltiplo estágio de solução 30% de soro bovino.

AMOSTRA	Volume (ml)	% de soluto				B	C	D
		A	B	C	D	SF A	SF B	SF C
Aliment.	30,0	100	100	100	100	—	—	—
Retido	12,8	≈ 60	95,5	97,5	102	0,6	1,0	1,0
1º Filt.	4,8	11,4	0,6	0,5	0,4	19	1,2	1,3
2º Filt.	6,2	12,8	0,1	—	—	130	> 100	—
3º Filt.	6,2	13,3	—	—	—	> 2000	—	—

#### II.2.12 - Efeito de condições de centrifugação nos fatores de separação

Os efeitos de velocidade e tempo de centrifugação foram avaliados em experimentos de ultrafiltração centrífuga de misturas 1:1 de gamaglobulina bovina ( $M_v = 169.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e albumina de soro ( $M_v = 67.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Para isto, foi preparada solução 0,25% (m/m) de gamaglobulina e 0,25% (m/m) de albumina em NaCl 0,1 M, que foi utilizada na alimentação de celas contendo uma única membrana (figura 20). A membrana foi preparada a partir da solução B, com 10 minutos de evaporação. As celas foram centrifugadas em velocidades de rotação e tempos diferentes. Em experimentos realizados a 1000 rpm, onde se retirou o filtrado após 30 minutos, recolheram-se 3,4 ml de filtrado e 14,6 ml de concentrado. Após o mesmo tempo, mas a 3000 rpm,

recolheram-se 7,0 ml de filtrado e 10 ml de concentrado. Deixando-se centrifugar durante mais 30 minutos, obtiveram-se 1,8 ml de filtrado a 1000 rpm e 3,9 a 3000 rpm. Estes quatro filtrados, juntamente com a solução de alimentação, foram cromatografados em coluna contendo Sephacryl S-300 e os resultados obtidos estão apresentados na figura 31. A tabela 10 mostra os fatores de separação calculados para a mistura em estudo.

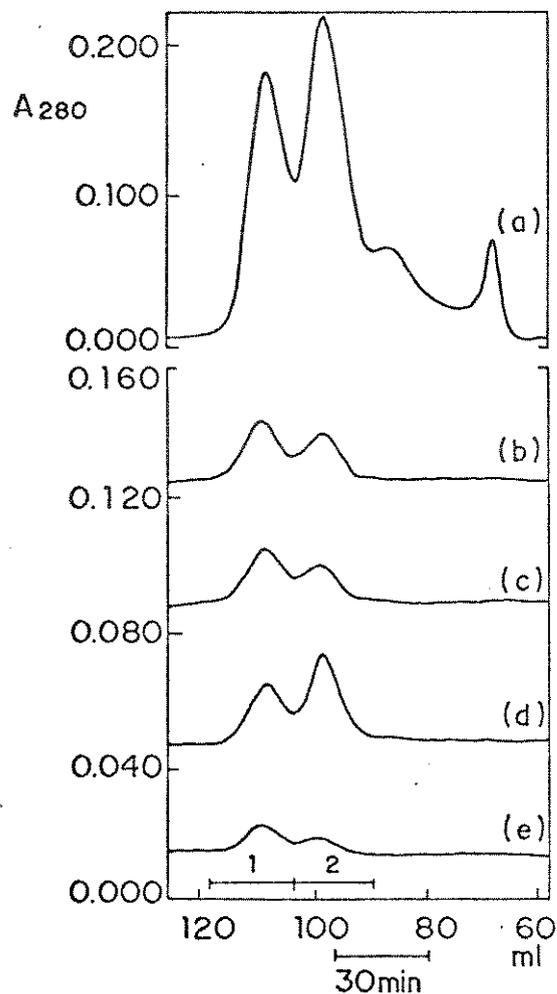
Tabela 10 - Fatores de separação de albumina -  $\gamma$ -globulina em função da velocidade e do tempo de centrifugação.

Velocidade/tempo	SF <sup>2</sup> (a) 1
1000 rpm/0,5 h	1,7
1000 rpm/1,0 h	2,0
3000 rpm/0,5 h	1,1
3000 rpm/1,0 h	2,4

(a) 1 = albumina, 2 = gamaglobulina.

#### II.2.13 - Gradientes de concentração e fatores de separação na solução retida em ultrafiltração centrífuga

Para avaliar o gradiente de concentração e os fatores de separação obtidos nas soluções retidas pela membrana semi-permeável, utilizaram-se as celas descritas na figura 20. O compartimento destinado à solução de alimentação foi preenchido com 17 ml de solução 0,25% (m/m) de gamaglobulina e 0,25% (m/m) de albumina em NaCl 0,1 M.



**Figura 31** - Efeito da velocidade e do tempo de centrifugação na separação de albumina e gamaglobulina por ultrafiltração centrífuga. Cromatogramas: (a) 1,0 ml da solução de alimentação (mistura 1:1 de albumina e  $\gamma$ -globulina, de concentração total 0,5%); (b) 1,0 ml do filtrado obtido após 0,5 h, a 1000 rpm; (c) 1,0 ml do filtrado, após 1 h a 1000 rpm; (d) 1,0 ml do filtrado após 0,5 h a 3000 rpm; (e) 1,0 ml do filtrado após 1 h a 3000 rpm.

Neste caso, foi utilizada membrana preparada a partir da solução A, com 10 minutos de evaporação.

Os experimentos de ultrafiltração centrífuga foram realizados a 2000 rpm, 4°C, durante 1,0 hora. O tempo de experimento é suficiente para que o nível do filtrado, praticamente se iguale ao nível da solução retida. A solução concentrada foi dividida em quatro frações de acordo com sua altura no compartimento da cela. Os resultados são apresentados na figura 32 e tabela 11.

Tabela 11 - Gradientes de concentração dos componentes da mistura de albumina e gamaglobulina e fatores de separação obtidos por ultrafiltração centrífuga.

AMOSTRA	Volume (ml)	% de soluto (a)			B SF A	C SF B	
		A	B	C			
Alimentação	17,0	100	100	100	—	—	
r e t i d o	1° (topo)	1,5	12,0	11,9	11,1	1,01	1,07
	2°	1,5	22,6	20,9	19,7	1,08	1,06
	3°	1,5	28,1	24,4	21,3	1,15	1,15
	4° (fundo)	1,5	37,3	42,8	47,9	0,87	0,89
1° filtrado	7,4	0	0	0	—	—	
2° filtrado	3,3	0	0	0	—	—	

(a) % soluto obtida a partir das áreas dos picos da figura 32.

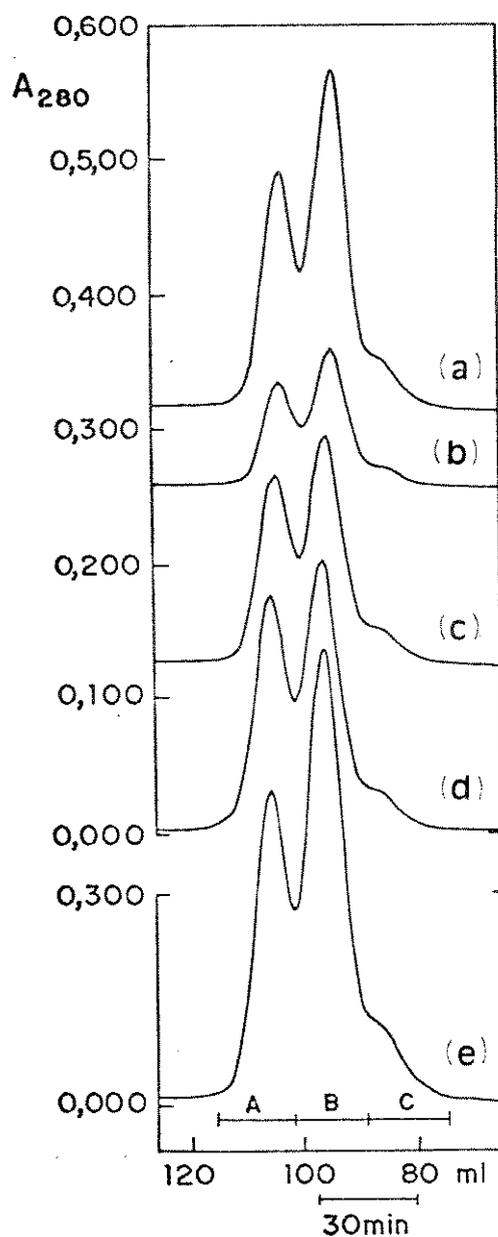


Figura 32 - Cromatogramas de permeação em gel (Sephacryl S-300) de solução de albumina e  $\gamma$ -globulina submetida a ultrafiltração centrífuga a 2000 rpm, 4°C, durante 1 hora. Amostras: (a) 1,0 ml da solução de alimentação (mistura 1:1 de albumina e  $\gamma$ -globulina, com concentração total 0,5% em NaCl 0,1 M); (b) 0,5 ml da fração do topo da solução retida; (c) 0,5 ml da fração abaixo do topo; (d) 0,5 ml da fração acima do fundo; (e) 0,25 ml do fundo da solução retida.

## II.3 - Discussão

As proteínas constituintes do soro bovino são basicamente de tres tipos: aproximadamente 70% são albuminas de soro, com massa molar ao redor de  $67.000 \text{ g.mol}^{-1}$  (coeficiente de sedimentação de 4S); 25% são globulinas que possuem massa molar igual a  $169.000 \text{ g.mol}^{-1}$  (7S); e cerca de 5% são macroglobulinas, com massa molar de aproximadamente  $860.000 \text{ g.mol}^{-1}$  (19S). Existem também no soro pequenas quantidades de microglobulinas (menores que a albumina), algumas globulinas, intermediárias em tamanho entre globulinas e macroglobulinas ( $\bar{M}_w = 300.000 \text{ g.mol}^{-1}$ , 10S), e macroglobulinas de massa molar de vários milhões [90]. O soro fetal bovino apresenta, principalmente, albumina ( $\bar{M}_w = 67.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), globulina ( $\bar{M}_w = 169.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), fetuina ( $\bar{M}_w = 46.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e pequenas quantidades de macroglobulinas e globulinas intermediárias [90]. Segundo especificação técnica do fornecedor dos soros, a concentração total de proteína no soro fetal é de 3,4 g/dl e no soro bovino adulto de 3,7 g/dl [91].

### II.3.1 - Membranas

Um aspecto geralmente levantado na discussão de fracionamento de macromoléculas por ultrafiltração relaciona-se às membranas e sua distribuição de tamanho de poros. A composição química das membranas disponíveis comercialmente não é muito variável; dentre elas pode-se citar membranas de acetato e nitrato de celulose, poli(acrilonitrila), poli(sulfona), e celulose regenerada, principalmente. Estas membranas são caracterizadas pelos respectivos cortes de massa molar, definidos empiricamente como sendo a massa molar de proteínas globulares que são 90% retidas pela membrana [51]. Recentemente, Mc Gregor [26] analisou uma grande variedade de membranas comerciais e mostrou que o corte

fornecido pelos fabricantes é muito diferente do corte real. Um exemplo típico é uma membrana apresentar corte experimental de 50.000 enquanto o corte do fabricante é de 10.000. Além da não definição de corte, a maioria das membranas comerciais apresenta ainda uma faixa muito ampla de distribuição de tamanho de poros. Apenas esta última observação feita pelo autor pode, em princípio, inviabilizar o fracionamento de solutos com pequena diferença de massa molar.

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de membranas de acetato de celulose. Membranas do tipo B possuem um tamanho médio de poros maior e retêm apenas macroglobulinas. Membranas de composição A são capazes de reter as principais proteínas do soro (figuras 24, 25, 26 30 e 32). Esta membrana é de muita utilidade pois permite a rápida reconcentração da grande parte das proteínas da solução original ou de frações provenientes de outros processos de separação ou purificação, tais como eletroforese preparativa, cromatografia de troca iônica ou permeação em gel, precipitação salina e alcoólica, ultracentrifugação em gradiente de densidade, ou mesmo fracionamento por ultrafiltração.

### II.3.2 - Fracionamento de proteínas

A membrana do tipo A permite também fracionamento do soro fetal bovino por ultrafiltração e osmocentrifugação, pois proteínas de massa molar igual ou superior à albumina são retidas, enquanto proteínas menores são recolhidas no filtrado. A partir das figuras 24 e 25 é possível obter o volume de eluição mínimo das proteínas recolhidas no filtrado ( $V_e \approx 157$  ml) que corresponde à massa molar máxima transferida através desta membrana. Pode-se dizer, portanto, que proteínas de massa molar abaixo de  $15.000 \text{ g.mol}^{-1}$  são efetivamente separadas de proteínas com massa molar igual ou superior a 67.000

$\text{g.mol}^{-1}$ , em experimentos de ultrafiltração centrífuga e osmocentrifugação de soro fetal bovino. Este resultado é bastante significativo, uma vez que o fracionamento de espécies diferindo em massa molar por um fator menor que 10 é raramente alcançado pela ultrafiltração convencional [2]. Esta limitação é normalmente justificada pela própria distribuição de poros da membrana e por problemas de polarização.

Com soluções de soro bovino também foram observados fracionamentos com esta membrana, sendo que a proteína recolhida no filtrado possui massa molar de aproximadamente  $5.500 \text{ g.mol}^{-1}$  (figura 26). Este valor, assim como o anterior, foi obtido através das curvas de calibração das colunas de gel, apresentadas na figura 23.

Os resultados de ultrafiltração em múltiplo estágio, apresentados na tabela 9, mostram um resultado bastante interessante: 41% do componente A pode ser recuperado como filtrado em um simples experimento de 1 hora, contaminado com apenas 2% do componente B.

Muitos fatores cardio-inibidores são peptídeos pequenos de massa molar menor que  $10.000 \text{ g.mol}^{-1}$  [34]. Se, por exemplo, estes fatores estiverem presentes no soro, é possível removê-los por ultrafiltração centrífuga, utilizando a membrana do tipo A.

Trabalhos recentes afirmam que o fracionamento de misturas macromoleculares, tais como proteínas, ainda não se tornou praticável [34, 92]. Este fato foi atribuído a vários fatores: efeito de polarização e obstrução de poros de membranas e limitações impostas por distribuição não uniforme de poros, assim como interações proteína-proteína.

Uma das separações mais investigadas é da mistura de albumina e gamaglobulina. Os resultados obtidos por Blatt [59] indicaram que

pequenas quantidades de gamaglobulina elevam a retenção de albumina significativamente em membranas que seriam totalmente permeáveis à albumina. Porter [51] utilizou membranas com aproximadamente 10% de retenção de albumina e 90% de gamaglobulina para as soluções ultrafiltradas separadamente. Porém, quando a mistura das proteínas é ultrafiltrada, a retenção de albumina aumenta a até 80%, o que foi justificado como um exemplo típico do efeito da camada de polarização que, neste caso, impõe restrição maior à permeação de albumina que a própria membrana.

Em relação à separação de misturas de proteínas de soro, Michaels [93] discute que durante a polarização da superfície da membrana há formação de um filme concentrado de macromoléculas, tais como globulinas, que possui estrutura porosa muito fina para permitir a passagem de moléculas de albumina.

Os resultados experimentais indicados na parte experimental desta tese mostram que o fracionamento de proteínas é bastante melhorado com a utilização de ultrafiltração centrífuga, onde o problema da polarização é minimizado. Porém, a separação não é completamente satisfatória quando ocorre adsorção. Isto está de acordo com a observação de Michaels sobre a ultrafiltração convencional, justificando a impossibilidade de separação da mistura albumina/gamaglobulina pela forte adsorção destas moléculas sobre a superfície e/ou poros da membrana, que impede a passagem de moléculas menores de soluto.

A adsorção de proteínas em membranas poliméricas é um tema bastante discutido na literatura. Lee e Merson [94] observaram camadas de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de espessura por microscopia eletrônica. Fane [57, 94] demonstrou que a adsorção ocorre em multicamadas, em

ultrafiltração de proteínas. Dillman [74] também caracterizou a adsorção de proteínas, mas a descreveu com sendo do tipo Langmuir, ou seja, em monocamada. Michaels [93] observou que membranas hidrofóbicas, por exemplo membranas de poli sulfona, adsorvem fortemente a albumina bovina. Já em membranas hidrofílicas (por exemplo, celulose regenerada) a camada de polarização pode ser removida por cisalhamento. Entretanto, membranas de celulose regenerada possuem poros muito pequenos para serem utilizadas na separação de misturas de proteínas [26].

Fane [95] avaliou os efeitos de pH e força iônica na ultrafiltração de soluções diluídas (0,1%) de albumina bovina através de membranas de alta retenção. A variação de fluxo com pH apresenta um mínimo em pH 5 (ponto isoelétrico da albumina). O fluxo pode ser aumentado de 100% quando se adiciona NaCl à solução. Estes resultados foram discutidos em termos de mudanças conformacionais e efeitos de carga que ocorrem na camada de proteína depositada sobre a membrana. No ponto isoelétrico a proteína é mais compacta e não possui carga, o que permite a disposição de uma camada mais densa e com baixa permeabilidade à água.

Como foi discutido na seção II.1.5, o desempenho de ultrafiltração centrífuga foi avaliado em trabalho anterior [78], quanto à despolarização das membranas por remoção de solutos acumulados sobre a sua superfície. Nesse trabalho foi também avaliado o desempenho da ultrafiltração no fracionamento de uma mistura de proteínas através de membrana de acetato de celulose, evidenciando que o problema de adsorção não pode ser desprezado [140].

Os experimentos de ultrafiltração com misturas de albumina ( $\bar{M}_w = 67.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e gamaglobulina ( $\bar{M}_w = 169.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) foram

realizados neste trabalho, variando-se o tempo e a velocidade de centrifugação. Nota-se através da figura 31 e tabela 10 que o fator de separação aumenta com o tempo do experimento. Seria esperado um fator de separação constante com o tempo, se não houvesse nenhuma alteração na membrana. Portanto pode estar havendo adsorção de proteína nas paredes dos poros, tornando-os efetivamente menores e dificultando a passagem da proteína de maior massa molar (gamaglobulina).

Na figura 32 e tabela 11 são apresentados os resultados referentes ao experimento de concentração da mesma mistura de proteínas, utilizando-se para isto uma membrana que retém as duas proteínas. Neste caso foi analisado o gradiente da solução retida, verificando-se que aproximadamente 50% do soluto retido é acumulado na quarta alíquota da solução, ou fração do fundo da cela. Além disso, foram obtidos diferentes gradientes de concentração das proteínas. Este resultado permitiu obter fatores de separação diferentes do valor unitário, evidenciando o fracionamento de proteínas ao longo da coluna de solução retida.

### II.3.3 - Um modelo para descrever a remoção convectiva da camada de polarização

Uma avaliação da quantidade de material acumulado por convecção no fundo de um ultrafiltro centrífugo pode ser feita através do modelo descrito a seguir. As premissas do modelo são:

(i) o fluxo de solvente através da membrana deixa atrás de si uma região de concentração mais elevada que a da solução de alimentação.

(ii) a espessura média desta região é da mesma ordem de

grandeza que a distância  $\bar{x}$  dada pela equação de Einstein:

$$\bar{x} = (2 D t)^{1/2} \quad (7)$$

onde  $t$  é o tempo em que houve acumulação de soluto na camada considerada e  $D$  é o coeficiente de difusão do soluto no meio.

Na figura 33, é apresentado um desenho mostrando as dimensões da região de concentração mais elevada (ou camada de soluto acumulado).

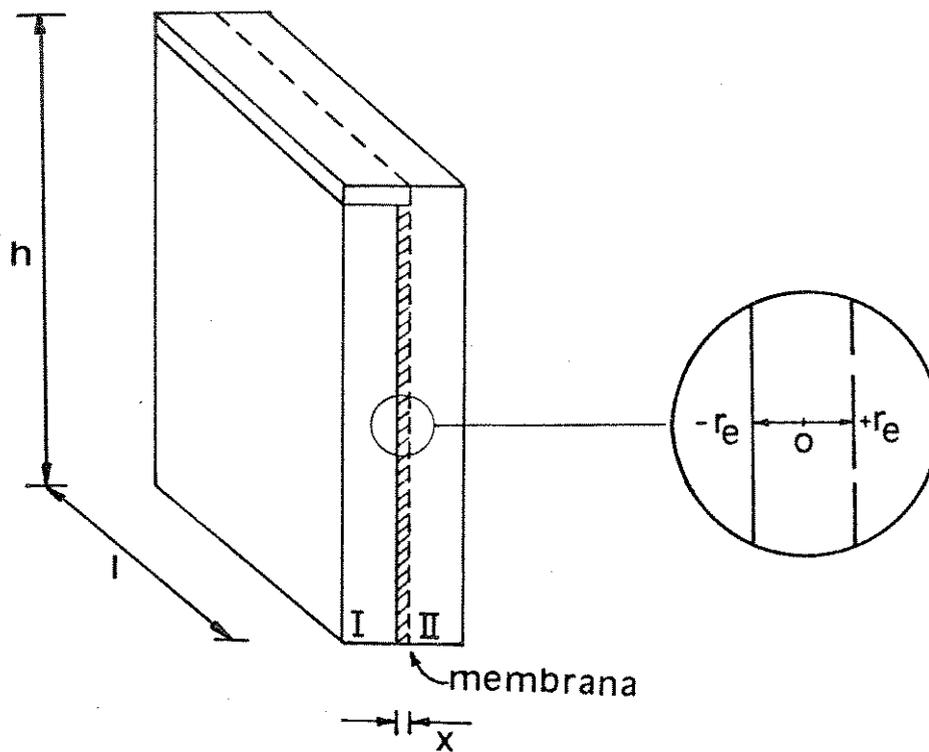


Figura 33 - Desenho esquemático mostrando a camada de solução acumulada na cela de ultrafiltração centrífuga. I: compartimento de alimentação; II: compartimento de filtrado. Destaque: coordenadas desta camada, com  $\bar{x} = 2 r_e$ .

(iii) à medida que a camada concentrada se torna mais espessa, a concentração e a pressão aumentam. A vazão desta camada aumenta até um tempo  $t$ , no qual o volume de líquido removido convectivamente é igual ao volume de líquido que chega às vizinhanças da membrana, menos o volume de líquido que atravessa a membrana. Deste momento em diante, a espessura e a concentração na camada adjacente à membrana se tornam estacionárias. Portanto, a massa de soluto que chega em um elemento de volume contíguo à membrana e a que sai por convecção são iguais:

$$Q_F \frac{f_s}{f_l} = Q_C \frac{f'_s}{f'_l} \quad (8)$$

onde  $Q_F$  e  $Q_C$  são as vazões de filtrado e de convecção,  $f'_s$  e  $f'_l$  são as frações de massa do soluto e do solvente na solução de concentração mais elevada que é transferida para o fundo da cela por convecção.

A estimativa da vazão convectiva  $Q_C$ , responsável pelo arraste da camada acumulada para o fundo da cela pode ser feita da seguinte maneira. A força propulsora para o escoamento de uma lâmina de um líquido Newtoniano é dada por:

$$F_p = 2 r l \Delta P \quad (9)$$

onde  $\Delta P$  é a diferença de pressão entre as colunas líquidas que é dada por:

$$\Delta P = \Delta \rho g h \quad (10)$$

onde  $\Delta \rho$  é a diferença de densidade entre a solução acumulada e a solução do interior da cela. A força de atrito entre as várias

lâminas da camada acumulada responsável pela resistência ao escoamento, é:

$$F_o = -2 l h \eta \frac{dv}{dr} \quad (11)$$

O escoamento irá ocorrer em regime estacionário quando estas forças se igualarem. Portanto:

$$2 r l \Delta P = -2 l h \eta \frac{dv}{dr} \quad (12)$$

ou

$$\frac{dv}{dr} = - \frac{\Delta P r}{h \eta} \quad (13)$$

A velocidade de escoamento da camada concentrada pode ser obtida através da integração desta última equação, utilizando-se para isto as coordenadas indicadas na figura 33, isto é:

$$\int_{v_o}^v dv = - \frac{\Delta P}{h \eta} \int_0^r r dr \quad (14)$$

Integrando obtém-se:

$$v = v_o - \frac{\Delta P}{h \eta} \frac{r^2}{2} \quad (15)$$

e

$$v_o = \frac{\Delta P}{h \eta} \frac{r_o^2}{2} \quad (16)$$

Substituindo,

$$v = \frac{\Delta P}{2 h \eta} (r_o^2 - r^2) \quad (17)$$

A vazão da camada acumulada, ou vazão convectiva  $Q_c$ , é dada pela seguinte integral:

$$Q_c = 2 \int_0^{r_0} v l dr \quad (18)$$

ou

$$Q_c = \frac{l \Delta P}{h \eta} \int_0^{r_0} (r_0^2 - r^2) dr \quad (19)$$

Resolvendo

$$Q_c = \frac{2 l \Delta P}{3 h \eta} r_0^3 \quad (20)$$

Substituindo a equação 10 e  $\bar{x} = 2 r_0$  na equação acima obtém-se:

$$Q_c = \frac{l \Delta \rho \varepsilon}{12 \eta} \bar{x}^3 \quad (21)$$

A expressão que relaciona a concentração de uma dada solução com sua densidade é

$$C_2 = \frac{\rho_{12} - \rho_1}{1 - \rho_1 \bar{v}_2} \quad (22)$$

onde  $\rho$  é a densidade,  $\bar{v}$  é o volume específico parcial e os índices 1 e 2 denotam solvente e soluto respectivamente. A partir desta expressão, pode ser obtida a relação entre a diferença de concentrações (da solução acumulada e solução de alimentação) e a

respectiva diferença de densidades, ou seja,

$$\Delta\rho = k \Delta C \quad (23)$$

onde  $k = 1 - \rho_1 \bar{v}_2$ . Substituindo a equação 23 na equação 21, finalmente resulta:

$$Q_c = \frac{l k \Delta C g}{12 \eta} \bar{x}^3 \quad (24)$$

A equação acima fornece, portanto, a vazão da camada acumulada, em regime estacionário, em função da sua espessura ( $\bar{x}$ ), da profundidade da cela ( $l$ ), da viscosidade da solução concentrada ( $\eta$ ), da sua concentração e do campo inercial aplicado. Uma estimativa de  $Q_c$  pode ser obtida a partir de dados experimentais, utilizando-se a equação 8.

Como exemplo, são apresentados os dados de um experimento de ultrafiltração centrífuga de solução  $5 \times 10^{-3}$  g/l de albumina em NaCl 0,1M. Para realização deste experimento, utilizou-se cela montada com membrana impermeável ao soluto. Após 1 hora, 3000 rpm ( $2000 \times g$ ) e  $4^\circ\text{C}$ , o volume de filtrado recolhido foi de  $7,9 \text{ cm}^3$  e a concentração da solução na quinta fração da cela, ou fração do fundo, foi de  $2,2 \times 10^{-2}$  g/l.

Assim, utilizando-se a equação 8 e admitindo-se que a concentração da fração do fundo da cela é aproximadamente igual à concentração da solução acumulada, que foi transferida por convecção para o fundo da cela, obtém-se:

$$\frac{Q_F}{Q_C} = \frac{2,2 \times 10^{-2}}{5 \times 10^{-3}} = 4,4$$

Supondo ainda que o volume de filtrado recolhido segue uma função linear com o tempo, a vazão convectiva pode ser calculada:

$$Q_c \approx \frac{Q_F}{Q_F / Q_c} = \frac{V_F}{t Q_F / Q_c}$$

onde  $V_F$  é o volume de filtrado recolhido no final do experimento de tempo  $t$ . Substituindo os valores experimentais citados, obtém-se:

$$Q_c \approx 5 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Conhecendo-se o coeficiente de difusão da albumina ( $D = 6,27 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ), seu volume específico parcial ( $\bar{v} = 0,734 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ) [88], as dimensões da cela ( $h = 7,0 \text{ cm}$ ,  $l = 3,4 \text{ cm}$ ) e a viscosidade da solução acumulada ( $\eta = 3,29 \times 10^{-2} \text{ gcm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), pode-se calcular a espessura da camada acumulada a partir da equação 24. O valor calculado é:

$$\bar{x} = 20 \mu\text{m}$$

que é a espessura da camada acumulada que escoar estacionariamente para o fundo da cela. O tempo necessário para que esta camada se forme, inicialmente, pode ser obtido através da equação (7), isto é:

$$t = 3 \text{ s}$$

A partir desse tempo a vazão convectiva é constante e igual a  $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ .

No modelo proposto, admite-se que a solução acumulada sobre a superfície da membrana tenha um comportamento Newtoniano. Esta aproximação é correta para soluções de proteínas globulares, mas não para outros sistemas poliméricos.

Experimentos de ultrafiltração centrífuga em que estão presentes dois solutos são apresentados na tabela 11. Os resultados mostram que a quantidade de albumina acumulada na fração do fundo da cela é menor que a quantidade de gamaglobulina. Uma justificativa para este resultado é que o coeficiente de difusão da albumina é maior que o da gamaglobulina. Portanto, uma fração maior de albumina difunde para o interior da solução se afastando da superfície da membrana e deixando uma fração maior de gamaglobulina na camada de soluto acumulado. Este fato não é previsto no modelo apresentado anteriormente.

## OSMOCENTRIFUGAÇÃO DE POLIELETRÓLITOS

### III.1 - Introdução

#### III.1.1 - Aspectos gerais

Polieletrólitos são compostos macromoleculares que possuem muitos grupos ionizáveis ligados à cadeia polimérica. Em solução, a ionização desses grupos origina um macro-íon contendo várias cargas fixas e um número equivalente de pequenos contra-íons. A combinação de massas molares grandes com densidades de carga elevadas fornece a esses compostos propriedades físico-químicas únicas. Esta peculiaridade de suas propriedades possibilita discutir polieletrólitos como um grupo especial de substâncias macromoleculares, apesar da grande diversidade de suas estruturas químicas [97]. Assim, são classificados como polieletrólitos importantes substâncias biológicas (proteínas, ácidos nucleicos, pectinas, polissacarídeos), compostos inorgânicos (polifosfatos, silicatos) e muitos polímeros sintéticos (ácido poliacrílico, poli(vinilpirrolidona) ).

Vários critérios são utilizados para a classificação de polieletrólitos, por exemplo: origem, constituição química e natureza do grupo ionizável fixo à cadeia polimérica. Para discutir propriedades físico-químicas, entretanto, a classificação mais adequada é a classificação segundo a rigidez de sua estrutura molecular. Um grande número de substâncias naturais possuem moléculas rígidas, ou seja, moléculas que mantem seu tamanho e forma em diferentes ambientes e somente são afetadas quando submetidas a condições drásticas (por exemplo, alta temperatura, valores de pH

extremos e altas concentrações de sal). Por outro lado, a maioria dos polieletrólitos sintéticos são moléculas de cadeias flexíveis, capazes de alterar suas formas e tamanhos sob a influência de pequenas alterações do meio [98].

Assim como os sais simples, polieletrólitos são solúveis em solventes polares, especialmente em água. A solubilidade de um polieletrólito depende, em um dado grau, do balanço entre a quantidade relativa de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos que constituem a macromolécula. Entretanto, este balanço não é o único determinante da solubilidade. Outros fatores também são importantes: conformação da molécula, massa molar e distribuição de cargas na cadeia. Um guia bastante útil é a comparação dos parâmetros de solubilidade de Hildebrand do polímero e do solvente, que é bastante utilizado na escolha de solventes para polímeros [99].

Como foi citado anteriormente, uma característica importante de soluções de polieletrólitos sintéticos é a alta flexibilidade de suas moléculas. Este fato se deve a um número variado de conformações que podem ser adquiridas por estas macromoléculas em função de mudanças nas características do solvente utilizado, ou mesmo do próprio polieletrólito. Um dado polieletrólito pode mostrar diferentes conformações em solução sob diferentes forças iônicas. O mesmo é válido quando ocorrer variação no número de cargas elementares por unidade de comprimento de cadeia de polieletrólito, ou seja, na densidade de carga. A conformação da cadeia muda bruscamente quando se passa de uma solução aquosa de polieletrólito para outra solução aquosa com excesso de sal. Neste caso, a cadeia inicialmente estirada passa a ser enovelada e o efeito torna-se mais acentuado quanto maior a densidade de carga da macromolécula [100]. Este comportamento de

moléculas de polieletrólito em solução afeta diretamente suas propriedades físico-químicas (por exemplo, viscosidade) e será discutido com mais detalhe ao longo da introdução.

### III.1.2 - Aplicações

Polieletrólitos são de grande importância na natureza e de grande interesse nas áreas científica e tecnológica por apresentarem propriedades muito peculiares e úteis. Polieletrólitos naturais, principalmente polissacarídeos, tem sido utilizados, desde muito tempo, como espessantes ou agentes de gelificação em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos [101]. A influência de polieletrólitos sobre as propriedades reológicas de soluções e suspensões é bastante explorada. Neste sentido, estes são usados para melhorar as características do solo em áreas de perfuração e extração de petróleo e em processo terciário de recuperação de óleos. São também amplas as aplicações de polieletrólitos como condicionadores de água, isto é, para reduzir a resistência hidrodinâmica de líquidos, e como agentes floculantes, para o tratamento de águas residuais. Polieletrólitos são também utilizados na forma reticulada, como resinas de troca iônica ou membranas eletroquimicamente ativas. Curiosamente, o conhecimento do comportamento de polieletrólitos e de suas propriedades em solução, na maioria das aplicações citadas, tem sido empírico. Em muitos casos a escolha do polieletrólito é feita com base na composição química da macromolécula e sua disponibilidade, simplesmente [98].

Em medicina e biologia são aplicados como substitutos de plasma [102], na purificação de proteínas e enzimas [103] e na liberação controlada de drogas [104]. Muitas pesquisas nesta área são

conduzidas no sentido de compreender melhor o comportamento de macromoléculas biológicas, através do estudo de propriedades e modelos ajustáveis a polieletrólitos mais simples.

### III.1.3 - Propriedades de equilíbrio de soluções de polieletrólitos

#### III.1.3.1 - Tratamentos teóricos

Atualmente, a compreensão de propriedades de polieletrólitos é semi-quantitativa apesar de nos últimos cinquenta anos muitos trabalhos teóricos tenham sido conduzidos nesta área. Além disso, o entendimento teórico está mais desenvolvido no caso de propriedades de equilíbrio do que de não equilíbrio, pois as de não equilíbrio envolvem considerações sobre a dinâmica de cadeias macromoleculares carregadas que, até o momento, são de difícil tratamento [100].

O estudo estatístico de cadeias macromoleculares carregadas e seus contra-íons em um solvente polar é muito complicado, na presença ou mesmo na ausência de eletrólito inerte de baixa massa molar. De um lado, a assimetria entre os íons pequenos e o poli-íon, de outro, as muitas conformações possíveis das cadeias, fortemente influenciadas por interações eletrostáticas e não eletrostáticas, associadas a interações intra e intermacromoleculares, tornam o tratamento estatístico de sistemas de polieletrólitos superior às atuais disponibilidades de recursos formais e computacionais.

Os tratamentos teóricos desenvolvidos para polieletrólitos em solução são, na maioria dos casos, baseados na teoria de Debye-Hückel para soluções eletrolíticas simples ou utilizam resultados obtidos a partir desta teoria. Nos modelos, são consideradas apenas interações puramente eletrostáticas e o solvente é tratado como um contínuo,

omitindo efeitos de solvatação específicos. Além disso, é admitida uma conformação fixa para a macromolécula e somente interações entre uma macromolécula simples e íons pequenos em solução. Com isto, nenhuma interação do tipo intermacromolecular é considerada e a solução é admitida infinitamente diluída. Nestes modelos o polieletrólito é representado por uma cadeia dentro de uma cela eletroneutra, cujo volume médio é muito maior que o volume ocupado pela própria macromolécula.

Os modelos teóricos discutidos a seguir, são utilizados para avaliar o potencial eletrostático médio ao redor da cadeia macromolecular de polieletrólito. Estes modelos foram extraídos das referências 98, 100, 105 e 106.

#### III.1.3.1.1 - Modelo de esfera permeável

Na primeira tentativa o poli-íon é representado por uma esfera permeável contendo densidade de carga distribuída uniformemente em todo o seu volume. Com isto, surge um potencial eletrostático constante e, conseqüentemente, uma concentração uniforme de íons móveis ao redor da esfera. Este modelo é essencialmente o mesmo que foi usado por Debye e Hückel na teoria clássica de eletrólitos simples (figura 34). Entretanto, existem várias razões para se acreditar que este não é um modelo que se ajuste a uma macromolécula carregada. A justificativa é que o potencial eletrostático irá variar consideravelmente de um elemento de volume a outro, dependendo da distância do segmento de cadeia carregado mais próximo em relação à distância de recobrimento de cargas. Esta última é definida por um comprimento característico, abaixo do qual correm interações eletrostáticas entre cargas.

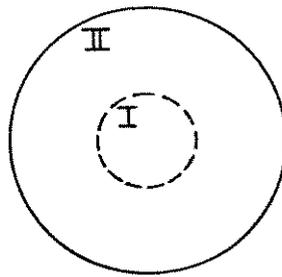


Figura 34 - Modelo da esfera permeável, usado para moléculas rígidas de polieletrólito onde o solvente e os íons pequenos podem penetrar no interior sem, entretanto, mudar suas dimensões.

I - Volume ocupado pelo polieletrólito.

II - Volume permeável a íons e solvente.

#### III.1.3.1.2 - Modelo de bastão

Um modelo mais apropriado, que leva em consideração o caráter específico da cadeia de um polieletrólito, é o modelo de bastão. O poli-íon é representado por um cilindro de raio  $a$  e de comprimento  $l$ , com  $l \gg a$ . Na realidade, a conformação da macromolécula carregada tende a se tornar cilíndrica na ausência de eletrólito de baixa massa molar e em baixas concentrações do poli-íon, o que não é necessariamente o caso de outras condições. Em geral, o modelo é válido nos casos em que o comprimento de recobrimento das forças eletrostáticas envolvidas for suficientemente grande em relação à distância média entre cargas sucessivas da cadeia. Neste caso, a repulsão entre cargas de mesmo sinal provoca o estiramento e o enrijecimento da cadeia.

A carga sobre a macromolécula é considerada uniformemente distribuída sobre sua superfície ou sobre o eixo do cilindro, determinando uma densidade de carga constante, de valor absoluto:

$$\sigma_m = q \frac{z}{l} \quad (25)$$

com  $l$  representando o comprimento máximo da cadeia real da macromolécula carregando  $z$  cargas de valor unitário  $q$ .

### III.1.3.1.3 - Modelo de associação

A aproximação teórica mais simples para soluções de polieletrólitos (sem outros eletrólitos) e baseada no modelo cilíndrico é o modelo de associação proposto por Oosawa [107, 108]. O cilindro macromolecular é posicionado dentro de uma cela cilíndrica coaxial de mesmo comprimento  $l$  e de raio  $R$  (figura 35).

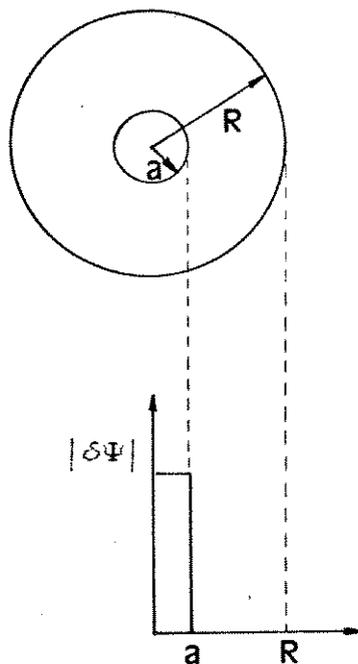


Figura 35 - Corte transversal de uma cela eletro-neutra de acordo com o modelo de Oosawa e sua dependência radial do potencial eletrostático.

A fração de volume ocupado pela macromolécula dentro do cilindro,  $x_v$ , é dada pela seguinte relação:

$$x_v = \frac{a^2}{R^2} \quad (26)$$

onde o volume ocupado pela macromolécula é  $v_m = \pi a^2 l$  e o volume total da cela cilíndrica é  $V_m = \pi R^2 l$ . Os contra-íons são distribuídos dentro do volume total da cela  $V_m$ , que é obtido através da relação:

$$V_m = \frac{V}{N_m} \quad (27)$$

onde  $V$  é o volume total do sistema e  $N_m$  o número total de macromoléculas.

O modelo assume uma posição dentro da cela com diferença de potencial  $\delta\Psi$ , dada pela seguinte expressão:

$$\delta\Psi = \frac{z^+ q}{2 \pi \epsilon \epsilon_0 l} \ln x_v \quad (28)$$

onde  $\frac{z^+ q}{l}$  é a densidade de carga linear distribuída uniformemente sobre a superfície do cilindro de raio  $a$  e em um meio de permissividade relativa  $\epsilon$ .  $\epsilon_0$  é a permissividade absoluta do vácuo. A carga efetiva,  $z^+ q$ , é dada pela carga total da macromolécula menos o número de contra-íons presentes na fase macromolecular,  $\nu'$ , ou seja:

$$z^+ q = (z - \nu') q \quad (29)$$

O potencial  $\delta\Psi$  determina a distribuição desigual de contra-íons ao longo do raio da cela cilíndrica.

A equação obtida para a carga elementar efetiva ( $z^+$ ) em função de  $z$ ,  $x_v$  e o parâmetro de carga  $\lambda$  é:

$$\ln \left( \frac{z - z^+}{z^+} \right) = -\ln (1 - x_v) + \left( z - \frac{z^+ \lambda}{z} \right) \ln x_v \quad (30)$$

onde

$$\lambda = \frac{q^2}{4 \pi \epsilon \epsilon_0 k T (l/z)} = \frac{Q}{A} \quad (31)$$

e

$$Q = \frac{q^2}{4 \pi \epsilon \epsilon_0 k T} \quad (32)$$

$Q$  é o comprimento de Bjerrum e representa a distância entre duas cargas idênticas em um meio de permissividade relativa  $\epsilon$ , cuja energia eletrostática é igual a  $kT$ . Este comprimento é de 7,15 Å quando o solvente utilizado for água e a temperatura for 25°C. O parâmetro  $A$  é a distância média entre duas projeções de grupos carregados sobre o eixo da cadeia. No limite de diluição infinita ( $x_v \rightarrow 0$ ) e quando  $A > Q$ , não existe contra-íon associado na fase macromolecular. Por outro lado, quando o parâmetro de carga for maior que 1, uma fração de contra-íons reside dentro da fase macromolecular, reduzindo a carga sobre a macromolécula; este fenômeno é denominado de condensação de contra-íons.

Com base no modelo de associação apresentado acima é possível avaliar coeficientes osmóticos e a atividade do contra-íon. A comparação de valores experimentais com as previsões teóricas é impedida devido a um problema que envolve estimativa de  $\alpha$  e portanto de  $x_v$ . O raio  $\alpha$  deve ser escolhido de tal forma que a fase

macromolecular deva conter tanto a macromolécula quanto os íons associados à mesma.

#### III.1.3.1.4 - Equação de Poisson-Boltzmann

Um tratamento teórico melhor, porém matematicamente mais difícil, é baseado na solução da equação de Poisson-Boltzmann para potenciais eletrostáticos ao redor do poli-íon. Neste tratamento, a natureza do solvente também é negligenciada e os contra-íons não podem penetrar dentro do espaço cilíndrico de raio  $a$ , em contraste com o que é admitido no modelo de Oosawa.

A equação de Poisson-Boltzmann é a seguinte:

$$r^{-1} \frac{d}{dr} \left( r \frac{d\bar{\Psi}}{dr} \right) = 4 \pi Q \sum z_k \rho_k(r_0) \exp(-z_k \bar{\Psi}) \quad r \geq a \quad (33)$$

sendo  $\bar{\Psi} = \frac{q \Psi}{k T}$ , o potencial eletrostático reduzido que depende somente da coordenada radial  $r$ . O somatório da equação acima é feito sobre todas as espécies de íons pequenos presentes na solução, com  $\rho_k(r_0)$  representando a concentração das espécies  $k$  (em íons por unidade de volume) a uma distância  $r_0$  do macro-íon onde o potencial  $\Psi$  se anula, e  $z_k$  é a valência dos íons envolvidos.

Lifson e Katchalsky obtiveram uma solução aproximada da equação de Poisson-Boltzmann para o cálculo do potencial eletrostático ao redor do poli-íon como função da distância  $r$ . No modelo descrito a seguir, o polieletrólito é posicionado em uma cela cilíndrica eletroneutra de raio  $R$  (figura 36). Assim, a equação 33 se torna:

$$-r^{-1} \frac{d}{dr} \left( r \frac{d\bar{\Psi}}{dr} \right) = X^2 \exp(-\bar{\Psi}) \quad r \geq a \quad (34)$$

$$X^2 \cong 4 \pi Q \rho_c (R) \quad (35)$$

onde  $\rho_c (R)$  é o número de contra-íons por unidade de volume na região próxima ao limite da cela cilíndrica. O fator de recobrimento  $X$  assemelha-se a constante de Debye-Hückel  $K$ .

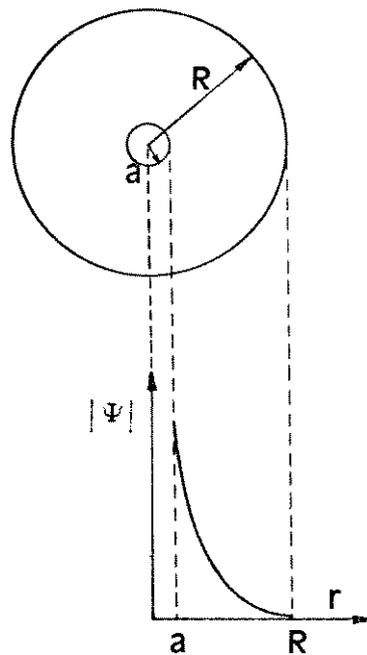


Figura 36 - Seção normal do eixo da cela eletroneutra no tratamento de Poisson-Boltzmann e a dependência radial do potencial eletrostático.

Um pré-requisito para o tratamento considerado é que o potencial  $\Psi$ , ou seu valor reduzido  $\bar{\Psi}$ , assim como o campo elétrico  $d\Psi/dr$  deve ser próximo de zero nas vizinhanças da superfície da cela. Este último, limita a aplicação do modelo a concentrações macromoleculares baixas.

A partir da solução da equação, a contribuição eletrostática

da energia livre pode ser avaliada e, portanto, pode-se avaliar contribuições a quantidades termodinâmicas tais como coeficiente osmótico, coeficiente de atividade médio, entalpia de diluição e outras [109]. Em geral e dentro do que foi testado, é satisfatória a concordância entre valores experimentais e teóricos, para soluções diluídas na ausência de sal [100].

### III.1.3.1.5 - Modelo de linha de carga

A ausência de uma solução analítica da equação de Poisson-Boltzmann aplicada a soluções de polieletrólitos, exceto em casos particulares como o anteriormente mencionado, reduz seriamente sua utilização.

Um novo tratamento proposto por Manning se tornou muito atrativo devido ao fato de introduzir conceitos aplicáveis que levam a expressões analíticas simples para várias quantidades e sob uma variedade de condições diferentes. O tratamento é válido apenas quando as interações intermacromoleculares são desprezíveis, i.e., no caso de soluções de polieletrólito infinitamente diluídas.

O modelo básico utilizado por Manning é uma linha de carga infinitamente longa de densidade de carga uniforme. Cada carga elementar no poli-ion fornece um potencial coulômbico de recobrimento do tipo Debye-Hückel:

$$r^{-1} \exp \frac{(-Kr)}{r} \quad (36)$$

que se somam às demais cargas para o cálculo do potencial eletrostático total  $\Psi$  a uma certa distância radial  $r$  do poli-ion. A constante de recobrimento de Debye  $K$  inclui contribuições dos contra-ions e co-ions do sal de baixa massa molar, assim como dos

contra-ions provenientes do polieletrólito.

Neste modelo admite-se que há condensação de contra-ions sempre que  $\lambda$  tender a valores maiores que 1. O potencial total reduzido  $\bar{\Psi}_m$  na direção transversal a uma cadeia carregada linear é dado pelas seguintes expressões:

$$\bar{\Psi}_m = 2 \lambda K_0(Kr) \quad \lambda \leq 1 \quad (37)$$

$$\bar{\Psi}_m = 2 \lambda K_0(Kr) \quad \lambda > 1 \quad (38)$$

com:

$$K^2 = 8 \pi Q [\rho_s + (z \rho_m / 2)] \quad \lambda \leq 1 \quad (39)$$

$$K^2 = 8 \pi Q [\rho_s + (z \rho_m / 2)] \quad \lambda > 1 \quad (40)$$

$K_0$  é uma função modificada de Bessel de ordem zero,  $\rho_s$  a concentração de sal e  $\rho_m$  é o número de macromoléculas por unidade de volume.

O potencial  $\bar{\Psi}_m$  e a componente eletrostática, a ele associada, da energia livre de interação entre o macro-íon e os íons de baixa massa molar são aplicáveis a soluções de polieletrólito sob várias condições.

Em geral, as leis limite para quantidades termodinâmicas, fornecidas pela teoria de Manning, estão dentro da mesma ordem de magnitude dos resultados experimentais, particularmente para  $\rho_s / z \rho_m \gg 1$ , isto é, soluções diluídas de polieletrólito na presença de excesso de sal [100].

### III.1.3.1.6 - Modelo de cadeia flexível

O modelo mais simples para polieletrólitos é chamado de cadeia flexível, um modelo de cadeia contínua proposto por Yamakawa. O interesse neste modelo reside no fato de que as dimensões médias, sob condições não perturbadas são determinadas por apenas 2 parâmetros: o comprimento de contorno  $l$  e o comprimento de persistência  $L$ . O último é uma medida para a distância de contorno dentro da qual existe correlação orientacional entre as unidades da cadeia e está relacionada com a energia livre de formação local da cadeia. No modelo, a macromolécula descrita como uma cadeia de unidades elementares de rotação livre, cada uma mantendo um ângulo  $\theta$  com uma vizinhança imediata, é substituída por uma curva espacial contínua. Uma característica interessante do modelo de cadeia flexível é a possibilidade que, dado seu comprimento de contorno, as dimensões médias podem variar continuamente de uma cadeia Gaussiana (se  $l/L \gg 1$ ) até um bastão ou uma cadeia totalmente estirada (se  $l/L \ll 1$ ). Deste ponto de vista a cadeia flexível pode ser adaptada como modelo para uma cadeia de polieletrólito isolada em solução.

As dimensões médias do modelo seguem a mesma tendência entre condições de baixa densidade de carga em forças iônicas altas e aquelas de alta densidade de carga em força iônica baixa. O modelo também permite discutir efeitos de concentração.

No caso de macromoléculas carregadas, a energia livre de curvatura pode consistir de duas partes, uma relacionada às propriedades intrínsecas da cadeia na ausência de interações de carga e outra resultante de repulsões eletrostáticas entre cargas fixas na macromolécula. Com um potencial de interação de Debye-Hückel para descrever quantitativamente esta repulsão e a suposição que a

distância média  $A$  entre duas cargas fixas é pequena em relação ao comprimento de recobrimento de Debye,

$$A \ll K^{-1}$$

o comprimento de persistência total  $L_t$  pode também ser decomposto em uma parte intrínseca  $L_p$  e uma parte eletrostática  $L_e$ , esta última dependente da densidade de carga da cadeia e da força iônica da solução:

$$L_t = L_p + L_e = \left( \frac{Q}{4 A^2 K^2} \right) \left( \frac{\lambda_+}{\lambda} \right)^2 F(Kl) \quad (41)$$

$F(Kl)$  é um fator de correção que difere da unidade somente para cadeias curtas. A razão  $(\lambda_+/\lambda)^2$  leva em consideração a possibilidade de redução da carga efetiva sobre a cadeia macromolecular através de associação de contra-ions.

A constante de recobrimento de Debye-Hückel,  $K$ , é definida por:

$$K^2 = 8 \pi Q \rho_s \quad (42)$$

onde  $\rho_s$  representa o número de ions do sal por unidade de volume.

A equação 42 é válida apenas para forças iônicas elevadas, onde  $L_t \gg K^{-1}$  mas pode ser uma boa aproximação em outras situações.

O modelo de cadeia flexível com comprimento de persistência variável tem conduzido a interpretações consistentes e satisfatórias de uma variedade de efeitos experimentais. Entretanto, não existem estudos experimentais sistemáticos e isto se deve à dificuldade na determinação de  $L_p$  [100].

Os vários modelos discutidos anteriormente descrevem propriedades de moléculas de polieletrólitos de modo semi-quantitativo e mostram inadequações quando são sujeitos a testes mais rigorosos. Em particular, estes modelos não são úteis para explicar diferenças consideráveis que são observadas nas propriedades da solução de um dado polieletrólito quando são trocados os contra-íons. Nem mesmo as teorias descrevem de maneira satisfatória a dependência das dimensões moleculares em função da densidade de carga. O maior problema dos vários modelos apresentados é admitir-se que o elemento estatístico de comprimento seja independente do grau de ionização e da expansão da cadeia polimérica. Na verdade, a rigidez da cadeia polimérica depende da presença ou ausência de cargas e, desta maneira, o comprimento do elemento estatístico varia com a extensão da ionização.

#### III.1.3.2 - Estrutura de soluções de polieletrólitos [100, 111]

O tratamento dos efeitos de concentração em soluções de polieletrólitos envolve a descrição qualitativa de conformações e arranjos de macromoléculas carregadas em diferentes condições de concentração. Este tipo de tratamento tem sido discutido atualmente no sentido de compreender melhor os resultados experimentais já obtidos para soluções de polieletrólito.

Trabalhos experimentais e teóricos estabelecem a existência de tres regimes de concentração para soluções de polímero neutro: diluído, semi-diluído e concentrado. Entre estes tres regimes são definidas duas concentrações críticas:  $C^*$  e  $C^{**}$ . Embora a transição de uma região para outra não ocorra abruptamente mas gradualmente, as concentrações de transição que separam os diferentes regimes de concentração podem ser estabelecidas. Cada regime de concentração

possui características próprias, ou seja, as grandezas medidas apresentam diferentes padrões de comportamento em função da faixa de concentração estudada [112].

No caso de polieletrólitos, as concentrações críticas não só dependem do comprimento de contorno da macromolécula carregada, como também, da sua densidade de carga e da força iônica da solução.

Macromoléculas carregadas na presença de excesso de sal apresentam conformação espiralada ao acaso. Neste caso, dois regimes de concentração são distinguidos. Em um dos extremos as macromoléculas na forma de espiral se comportam como partículas isoladas com simetria esférica e dimensões médias  $R_f$ , que é chamado raio de Flory. Nesta faixa, os efeitos de concentração não são pronunciados. No outro extremo, o número de macromoléculas por unidade de volume é suficientemente grande para que ocorra superposição das espiras e formação de uma rede transiente ou dinâmica, onde cada cadeia se entrelaça a outras. Uma cadeia é, então, descrita por sub-regiões de tamanho médio  $\xi$ , definido por uma distância média entre dois entrelaçamentos adjacentes. A concentração crítica é  $C^*$ , que separa as regiões nas quais  $C \ll C^*$  e  $C \gg C^*$ , correspondendo aos regimes diluído e semi-diluído, respectivamente.

O comprimento de correlação ou tamanho médio da sub-região pode ser estimado para cadeias que satisfaçam a seguinte condição:  $\xi \ll l \rightarrow \infty$ . Para isto, são feitas as seguintes suposições: i) para  $C \gg C^*$ , o comprimento de correlação é independente de  $l$  ou  $M$ ; ii)  $\xi$  é uma função decrescente de concentração e, iii) a parte da cadeia dentro da sub-região satisfaz as mesmas condições de uma cadeia completa no regime diluído. A concentração crítica  $C^*$  depende do comprimento de contorno da macromolécula carregada e também de sua

densidade de carga e da força iônica da solução.

As seguintes equações foram obtidas para a concentração crítica  $C^*$  (em gramas por unidade de volume) e o comprimento de correlação:

$$C^* = R_f^{-3} \left( \frac{M_n}{N_{AV}} \right) l/h \quad (43)$$

$$\xi = (L_t k^{-1})^{-1/4} \left( \frac{M_n}{h N_{AV}} \right)^{3/4} C^{-3/4} \quad (44)$$

$h$  e  $M_n$  são o comprimento e a massa molar da unidade monomérica.  $N_{AV}$  é o número de unidades monoméricas por macromolécula e  $R_f$  é o raio de Flory e se relaciona com a média quadrática do raio de giração da macromolécula:

$$\lim_{z \rightarrow \infty} \langle s^2 \rangle = R_f^2 \sim l^{6/5} (L_t K^{-1})^{2/5} \quad (45)$$

O fator  $(L_t K^{-1})$  leva em consideração, efeitos de densidade de carga e força iônica e é, portanto, específico para um dado sistema.  $C^*$  é uma função decrescente do comprimento de contorno e crescente da força iônica.

A situação de soluções de polieletrólito na ausência de eletrólito inerte é a mais complicada, tornando os efeitos de concentração ainda mais complexos. Uma extensão especulativa baseada na aproximação do modelo de cadeia flexível para soluções de polieletrólito na ausência de sal indica que as interações eletrostáticas são determinadas principalmente pelos contra-íons que são fornecidos pelos próprios polieletrólitos. Com a diminuição da

concentração macromolecular, o recobrimento de cargas da cadeia irá diminuir, com o subsequente aumento do comprimento de persistência total,  $L_t$ . Com isto, a cadeia macromolecular torna-se rígida e, em concentrações baixas, a conformação se aproxima a de um bastão rígido. Entretanto, o que ocorreria em concentrações elevadas seria dependente da maneira pela qual os efeitos eletrostáticos se relacionariam com o comprimento de persistência, um problema que ainda não foi tratado teoricamente para o caso de soluções de polieletrólito sem sal.

Com o aumento da concentração, pode ser atingida uma situação onde  $L_t$  permaneça suficientemente grande e as macromoléculas se mantenham estiradas. Neste caso é definida uma concentração crítica  $C_{m,o}^*$ , na qual ocorre um tipo de ordenamento originado por interações entre as macromoléculas,

$$C_{m,o}^* = (h l^2 N_{AV}) \quad (46)$$

$C_{m,o}^*$  é a concentração molar de unidades monoméricas por unidade de volume.

Através da equação acima, verifica-se que o regime diluído ( $C < C_{m,o}^*$ ) de soluções de polieletrólito na ausência de sal não é acessível quando a macromolécula apresenta um número de unidades monoméricas maior que  $10^3$ . Isto mostra que não há soluções "infinitamente diluídas" de polieletrólitos com  $n \geq 1000$ . Este resultado também mostra que em concentrações baixas a auto-dissociação da água, que normalmente é utilizada como solvente, não pode ser negligenciada e, portanto, o solvente pode atuar como eletrólito de baixa massa molar.

Quando a concentração da solução ultrapassa  $C_{m,o}^*$ , o

comprimento de persistência total diminui, conduzindo a outro regime de concentração que é caracterizado pelo aumento de flexibilidade da cadeia macromolecular. A concentração  $C_m^*$ , na qual  $L_e$  se iguala ao comprimento de contorno ( $l \approx L_e$ ), é usada para definir o atingimento deste novo regime.

$$C_m^* = \lambda^+ (16 \pi Q h l N_{av})^{-1} \quad (47)$$

Odijk [113], propôs a existência de pelo menos dois regimes de concentração para  $C > C_m^*$ . A primeira região de concentração, na qual  $C_m^* < C < C_m^{**}$ , é caracterizada por uma rede tridimensional que retem alguma anisotropia mas é continuamente deformada com o aumento de concentração. Quando o valor da concentração atinge  $C_m^{**}$  as macromoléculas dentro da rede adquirem flexibilidade pois o comprimento de correlação  $\xi$  passa a ser maior que o comprimento de persistência. A concentração que limita estes dois regimes é dada por:

$$C_m^{**} = 0,04 (4 \pi Q^2 h \lambda^+)^{-1} \quad (48)$$

Nota-se que este valor é independente do comprimento de contorno ou da massa molar do polieletrólito, mas dependente da natureza da macromolécula ( $h$ ) e sua carga efetiva ( $\lambda^+$ ), assim como, da natureza do solvente e da temperatura (comprimento de Bjerrum  $Q$ ).

Em água a 25°C, esta concentração crítica situa-se na região de  $4 \times 10^{-2}$  e  $2 \times 10^{-2}$  moles de monômeros por  $dm^3$ , para um polímero do tipo vinílico e um polissacarídeo simples, respectivamente.

Acima de  $C_m^{**}$ , a superposição de interações eletrostáticas já é considerável e devido ao recobrimento das cadeias, ocorre formação

de uma rede transiente característica de um regime semi-diluído de macromoléculas não carregadas ou de polieletrólito carregado na presença de excesso de sal. A figura 37 ilustra os quatro regimes de concentração discutidos acima.

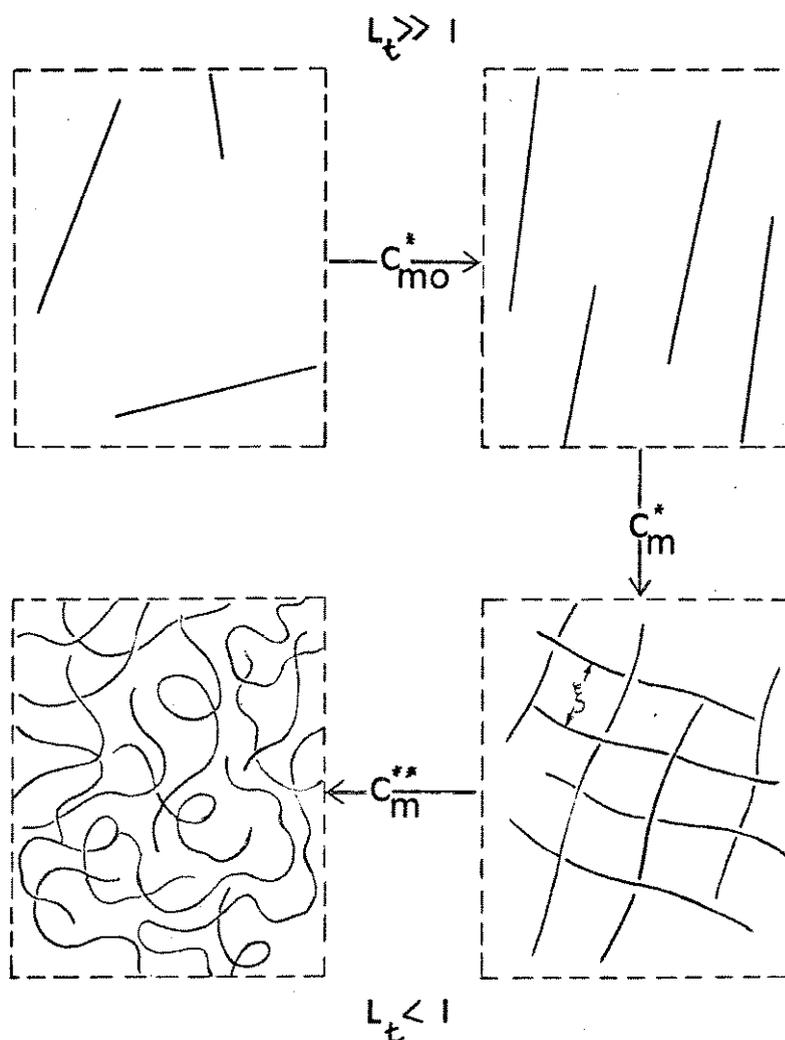


Figura 37 - Representação esquemática dos quatro regimes de concentração para soluções de polieletrólito sem sal, de acordo com Odijk [113].

Infelizmente, nenhuma investigação sistemática tem sido conduzida para testar as previsões teóricas do comportamento de soluções de polieletrólito na ausência de sal. Dentro do que é evidenciado experimentalmente através de propriedades de não equilíbrio, tais como viscosidade e difusão, os resultados confirmam a existência de um número maior de regimes de concentração em soluções de polieletrólito na ausência de sal, em comparação com soluções contendo sal de baixa massa molar. Além disso, experimentos em concentrações abaixo de  $C_{m,c}^*$  são dificilmente conduzidos devido a dificuldade de medida de pequenos efeitos. Por outro lado, medidas acima de  $C_m^{**}$  apresentam problemas por se tratarem de condições de alta viscosidade [100]. A maioria dos resultados descritos na literatura limitam-se a concentrações dentro da faixa de  $C_{m,c}^*$  a  $C_m^{**}$  [114, 115].

### III.1.3.3 - Interações com íons [98, 116]

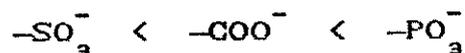
Soluções contendo macromoléculas carregadas apresentam grandes desvios de idealidade termodinâmica. Mesmo em soluções diluídas de polieletrólitos análogos a eletrólitos fortes, o coeficiente de atividade dos contra-íons é muito baixo quando comparado com o observado em solução aquosa do análogo micromolecular. Da mesma forma, as pressões osmóticas de soluções de polieletrólitos são muito mais baixas do que seria previsto com base na concentração estequiométrica de contra-íons. Estas não-idealidades são consequências dos elevados potenciais eletrostáticos que existem na vizinhança de macromoléculas com cargas múltiplas, que aprisionam os contra-íons e lhes tiram sua identidade como espécie de mobilidade independente.

A primeira evidência desta imobilização de contra-ions foi observada por Wall, em determinação de número de transporte [117]. Os resultados obtidos por este autor mostraram que cerca de 60% dos ions sódio de uma solução de poliacrilato de sódio se deslocam em direção ao ânodo, em oposição ao campo elétrico. Esta fração de ions sódio é caracterizada como parte integrante do macro-ion durante sua migração. Conclusões semelhantes foram obtidas por outros autores usando outras técnicas experimentais, tais como medidas de coeficiente de atividade e de difusão. Entretanto, a natureza das forças de interação entre contra-ions e macro-ions ainda não está detalhadamente esclarecida.

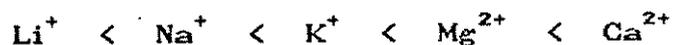
Porém, existe concordância em relação à imobilidade de uma fração de contra-ions e isto se reflete nos modelos teóricos existentes, por exemplo, no conceito de condensação. A imobilização de parte dos contra-ions é considerada como o aprisionamento dos mesmos dentro de barreiras potenciais, isto é, dentro do domínio do macro-ion, onde o campo eletrostático é suficientemente grande para evitar a remoção de contra-ions por movimento térmico.

Strauss e Ross observaram que a velocidade de migração eletroforética de polieletrólitos varia de acordo com a natureza do contra-ion usado e atribuíram estas mudanças à formação de complexos poli-ion/contra-ions. Estes autores mediram as variações de volume que ocorrem com a mudança de contra-ions para vários polieletrólitos, admitindo que as variações de volume são decorrentes de alterações na estrutura da água ao redor de grupos ionizados. De acordo com esta interpretação, a maior variação de volume é ocasionada por maior quantidade de água de hidratação liberada e, portanto, maior energia de associação contra-ion/macro-ion. A partir dos resultados experimentais foi obtido para uma dada espécie de contra-ion que a

energia de associação a grupos fixos na macromolécula aumenta segundo a ordem:



Da mesma forma, para um dado poli-ânion a energia de associação do grupo carregado da macromolécula com diferentes cátions, segue a ordem:



Ao contrário do que foi sugerido, alguns autores discordam da classificação de contra-ions associados em diferentes categorias. Isto porque não existe prova direta, por exemplo evidências espectroscópicas, e os argumentos utilizados são de natureza indireta. Estes argumentos são baseados em mudanças de propriedades macroscópicas, tais como o volume total de uma solução, e estas não podem ser interpretadas em termos de um fenômeno molecular, sem uma teoria estatística correspondente. Infelizmente, muito pouco é conhecido sobre a solvatação de cadeias macromoleculares e muito menos sobre as modificações que possam ocorrer nas camadas de solvatação quando íons pequenos se aproximam ou penetram na mesma [100].

#### III.1.3.4 - Equilíbrio Donnan [118]

O efeito do pH e da concentração de eletrólitos de baixa massa molar sobre as propriedades de polieletrólitos pode ser atribuído não somente à mudança da forma da macromolécula na solução, como também, ao Equilíbrio Donnan de membrana.

O Equilíbrio Donnan é a interpretação termodinâmica formal de um processo e não pode ser usado para concluir sobre mecanismos moleculares. Adicionalmente, este efeito, como qualquer interpretação termodinâmica de um processo, é aplicável somente se um dado sistema

estiver em equilíbrio.

Para entender melhor este equilíbrio, supõe-se que para determinar a pressão osmótica por meio de osmômetro simples, contendo uma membrana semipermeável, uma solução de polieletrólito é colocada em uma cela osmótica no início do experimento. O polieletrólito se dissocia completamente em íons macromoleculares  $R^{z-}$  que são incapazes de dialisar, e em íons pequenos, tais como  $Na^+$ , que atravessam a membrana. Se for considerado que a concentração  $R^{z-}$  na solução interna é  $c_1$ , então a concentração de íons  $Na^+$  na mesma solução será  $zc_1$ . Supondo que o líquido do outro lado da membrana contém eletrólito de baixa massa molar, por exemplo cloreto de sódio, e que ambos os íons ( $Na^+$  e  $Cl^-$ ) são capazes de atravessar a membrana. Considerando também que a concentração de  $NaCl$  na solução externa é  $c_2$  e, finalmente, que os volumes das soluções dos dois lados da membrana são iguais, resulta que os íons são distribuídos da seguinte maneira no início do experimento:

Líquido interno (i)

$$[R^{z-}]_i = c_1$$

$$[Na^+]_i = zc_1$$

Líquido externo (e)

$$[Na^+]_e = c_2$$

$$[Cl^-]_e = c_2$$

Donnan encontrou que o equilíbrio do sistema é atingido no seguinte estado:

Líquido interno (i)

$$[R^{z-}]_i = c_1$$

$$[Na^+]_i = zc_1 + x$$

$$[Cl^-]_i = x$$

Líquido externo (e)

$$[Na^+]_e = c_2 - x$$

$$[Cl^-]_e = c_2 - x$$

Quando o equilíbrio é estabelecido, íons do eletrólito de baixa massa molar não podem atravessar a membrana separadamente; caso contrário, campos elétricos seriam originados. O número de colisões simultâneas de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  por unidade de área da superfície interna da membrana dependem do produto de concentração de íons, isto é,  $[\text{Na}^+]_i \times [\text{Cl}^-]_i$ . Aparentemente, o equilíbrio será estabelecido no sistema quando o número de pares de íons que atravessam a membrana da direita para a esquerda por unidade de tempo for igual ao número de pares de íons passando da esquerda para a direita. Em outras palavras, uma condição de equilíbrio é a igualdade dos produtos de concentrações de íons que se encontram dentro e fora da membrana:

$$[\text{Na}^+]_i \times [\text{Cl}^-]_i = [\text{Na}^+]_e \times [\text{Cl}^-]_e$$

Substituindo os valores encontrados para  $[\text{Na}^+]_i$ ;  $[\text{Cl}^-]_i$ ;  $[\text{Na}^+]_e$  e  $[\text{Cl}^-]_e$  na equação acima, obtém-se:

$$x(2c_1 + x) = (c_2 - x)^2$$

$$2c_1 x = c_2^2 - 2c_2 x$$

$$x = \frac{c_2^2}{2c_1 + 2c_2} \quad (49)$$

Quando  $c_1 \gg c_2$ , isto é, quando um sistema tem uma quantidade pequena de eletrólito adicionado:

$$x = \frac{c_2^2}{2c_1} \quad \text{ou} \quad \frac{x}{c_2} = \frac{c_2}{2c_1} \quad (50)$$

A relação mostra que quando a quantidade de eletrólito de baixa massa molar é pequena, este se encontrará principalmente no líquido externo.

Quando  $c_1 \ll c_2$ , isto é, quando o sistema possuir grande quantidade de eletrólito,

$$x = \frac{c_2^2}{2c_2} = \frac{c_2}{2} \quad (51)$$

Em outras palavras, o eletrólito será distribuído uniformemente em ambos os lados da membrana.

O exemplo acima relata somente o caso em que o eletrólito de baixa massa molar é colocado no líquido externo, no início do experimento. O resultado não muda consideravelmente se este eletrólito estiver também presente na cela osmótica ou se o polieletrólito e os eletrólitos de baixa massa molar não possuírem um íon comum.

#### III.1.4 - Propriedades de transporte de soluções de polieletrólitos

Propriedades de não equilíbrio de soluções de polieletrólito, por exemplo viscosidade, tem sido investigadas desde os primeiros estudos de polieletrólitos. Contrariamente ao caso de equilíbrio, onde é esperado obter um tratamento teórico simples que corresponda aos efeitos observados, o comportamento de não equilíbrio depende fortemente da resposta do sistema a perturbações externas responsáveis pelo afastamento do equilíbrio. Até a presente data, a interpretação teórica de propriedades de não equilíbrio ainda não é disponível, e o comportamento dinâmico de cadeias mais ou menos flexíveis de polieletrólito continua sendo um problema longe de ser satisfatoriamente entendido. Em alguns casos, porém, o comportamento de soluções de polieletrólitos tem sido relacionado com macromoléculas não carregadas, considerados os efeitos específicos devido à presença de cargas na cadeia e o comportamento de íons pequenos, assim como suas interações mútuas [100]. Algumas propriedades de interesse serão

discutidas a seguir.

### III.1.4.1 - Viscosidade

A viscosidade de um polímero em solução depende diretamente do tamanho da macromolécula em solução e pode ser relacionada empiricamente à sua massa molar. Para um polímero não-iônico, a viscosidade reduzida da solução,  $\frac{\eta_{sp}}{c_p}$ , segue a equação de Huggins:

$$\frac{\eta_{sp}}{c_p} = [\eta] + K_H [\eta]^2 c_p \quad (52)$$

onde  $K_H$  é uma constante,  $c_p$  é a concentração da solução e  $\eta_{sp}$  é chamado de incremento específico de viscosidade que é dado por:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s} \quad (53)$$

$\eta$  e  $\eta_s$  são as viscosidades da solução e do solvente, respectivamente;  $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca do polímero:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c_p} = [\eta] \quad (54)$$

que é utilizada para determinar a massa molar do polímero, através da relação de Staudinger-Mark-Houwink:

$$[\eta] = K_\eta M^a \quad (55)$$

onde  $K_\eta$  e  $a$  são constantes para um determinado sistema polímero-solvente, determinadas experimentalmente por calibrações com amostras de massa molar conhecida.

O comportamento viscosimétrico típico de uma solução de polieletrólito é bastante diferente daquele de soluções de polímero não-iônico [119]. Este comportamento é ilustrado na figura 38.

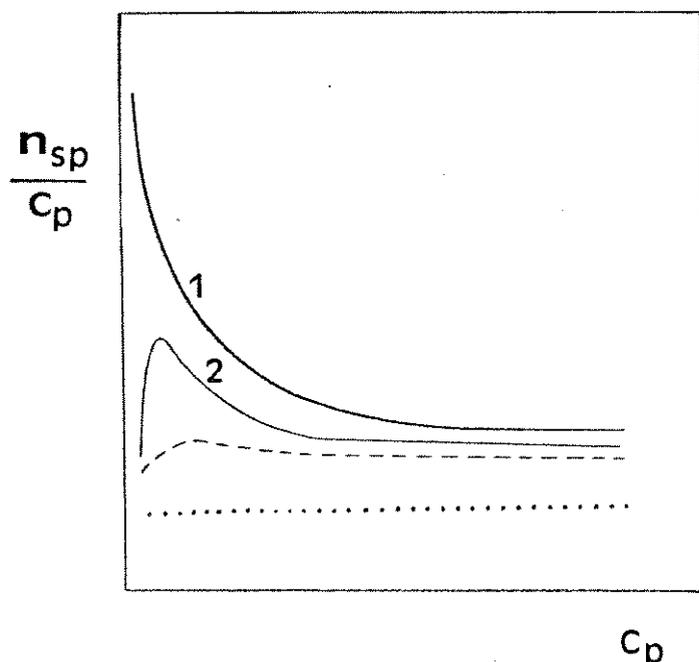


Figura 38 - Variação da viscosidade de soluções de polieletrólito em função de sua concentração: (—) ausência de sal; (--) quantidade moderada de sal adicionado e (...) solução com excesso de sal. A curva 1 corresponde ao comportamento previsto teoricamente e a curva 2 a resultados experimentais [119].

No primeiro caso a diluição produz contínuas mudanças na natureza do ambiente eletrostático ao redor do poli-íon isolado, que afetam interações inter e intra-moleculares. Estas mudanças originam curvas de viscosidade reduzida que diferem fundamentalmente daquelas obtidas com polímeros não-iônicos. Quando é adicionado sal na solução, as viscosidades são fortemente reduzidas e a variação da

viscosidade reduzida com a concentração de polieletrólito se aproxima do que ocorre com polímeros não-iônicos. O eletrólito adicionado à solução estabiliza a atmosfera eletrostática ao redor dos poli-íons de tal forma que impede mudanças nas dimensões dos mesmos e nas interações entre eles.

O incremento de viscosidade específica de um solução de polieletrólito depende, portanto, da natureza do solvente, temperatura, massa molar, concentração e densidade de carga do polieletrólito, assim como da força iônica da solução. A maioria dos trabalhos experimentais nesta área foram feitos com soluções aquosas de polieletrólito.

Mantendo-se a temperatura constante e também a concentração de solvente (água) e sal, o incremento de viscosidade causado por um dado polieletrólito em água aumenta com o aumento da densidade de carga sobre a cadeia macromolecular. Isto é normalmente observado em todas as concentrações de sal, inclusive na ausência do mesmo. Porém, a variação relativa é tanto menor quanto maior for a concentração de sal. Como o incremento de viscosidade está diretamente relacionado com as dimensões médias do polímero, este fato reflete a ocorrência de transição conformacional da macromolécula.

A interpretação de valores absolutos de  $\eta_{sp}$  ou  $\frac{\eta_{sp}}{c_p}$  para concentrações finitas de polieletrólito é bastante difícil devido à influência de interações eletrostáticas e hidrodinâmicas. Se o eletrólito inerte de baixa massa molar estiver em excesso, as viscosidades intrínsecas são obtidas a partir de extrapolação das retas para concentração zero de polieletrólito. As inclinações positivas das retas obtidas a partir de  $\frac{\eta_{sp}}{c_p} \times c_p$  fornecem as constantes de Huggins que geralmente diminuem com o aumento de  $c_e$ , o

que reflete a decrescente influência de interações inter-macromoleculares.

A viscosidade intrínseca também diminui com o aumento de  $c_p$ , além de depender da massa molar e da densidade de carga do polieletrólito (isto é, número de cargas elementares por unidade de comprimento de cadeia). Na figura 39 é mostrada a influência da concentração de sal e do grau de dissociação do ácido poliacrílico sobre a viscosidade intrínseca deste polieletrólito.

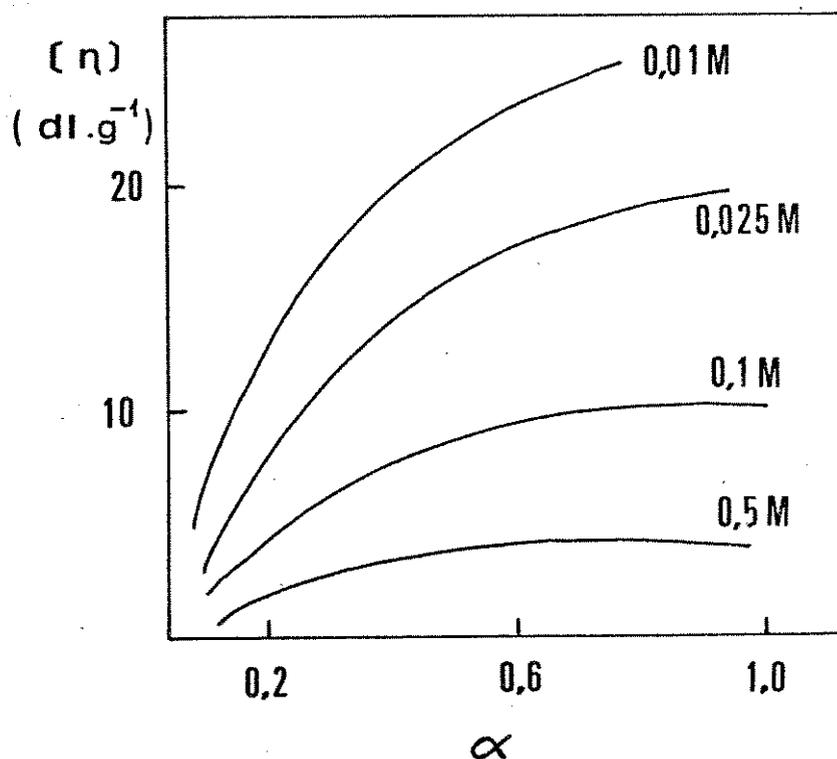


Figura 39 - Variação da viscosidade intrínseca de PAA em função do grau de ionização de grupos ácidos e na presença de diferentes concentrações de NaBr. (Massa Molar do polieletrólito de  $5,32 \times 10^5$  g/mol) [120].

É bem estabelecido que a viscosidade intrínseca de um polímero é diretamente relacionada com as dimensões médias, mais especificamente, com o volume hidrodinâmico da macromolécula em solução. Por esta razão, as variações de  $[\eta]$  com a densidade de carga de um polieletrólito a uma dada concentração de sal refletem mudanças nas dimensões médias da macromolécula. O forte efeito da densidade de carga e força iônica da solução sobre as dimensões médias de polieletrólitos foi também demonstrado usando-se outras propriedades, por exemplo, através da análise do raio médio de giração obtido por medidas de espalhamento de luz [121].

Existem várias teorias que tentam relacionar dados viscosimétricos às dimensões de um polieletrólito. A equação mais frequentemente usada e que relaciona a massa molar da macromolécula com a sua viscosidade intrínseca em solução é a equação de Stockmayer-Fixman:

$$\frac{[\eta]}{M^{1/2}} = K_{\theta} + 0,51 \Phi B M^{1/2} \quad (56)$$

onde  $\Phi$  é a constante de Flory,  $B$  é um parâmetro de interação de longa distância e  $K_{\theta}$  é uma constante que está relacionada com as dimensões não perturbadas do polímero e pode ser obtida através da viscosidade intrínseca sob condições  $\theta$ :

$$[\eta]_{\theta} = K_{\theta} M^{1/2} = \Phi \langle s^2 \rangle_{\theta}^{3/2} M^{-1} \quad (57)$$

O valor de  $K_{\theta}$  obtido por extrapolação de  $\frac{[\eta]_{\theta}}{M^{1/2}}$  é independente de  $C_s$  e apenas aumenta lentamente com a densidade de carga do polieletrólito.

Entretanto, a equação (56) tem sido questionada por não conter qualquer contribuição de efeitos eletrostáticos. Outras equações são sugeridas na literatura [122] tornando-se necessário, porém, investigações mais sistemáticas sobre sua adequação aos resultados experimentais.

Em resumo, o entendimento de propriedades viscosimétricas de soluções de polieletrólitos na presença de sais ainda não é completamente satisfatório. Por outro lado, a análise de resultados viscosimétricos de soluções de polieletrólitos na ausência de sal é ainda mais complexa. A viscosidade reduzida  $\frac{\eta_{sp}}{c_p}$  de soluções de polieletrólito em concentrações muito baixas de sal ou na ausência do mesmo apresenta, à temperatura e densidade de cargas constantes, um efeito peculiar de concentração que torna impossível a determinação de suas viscosidades intrínsecas.

Na figura 38 foi apresentada uma curva experimental (2) de medida viscosimétrica de uma solução de ácido poli(estireno sulfônico) na ausência de sal. O aparecimento de um máximo na curva de viscosidade reduzida em função da concentração de polieletrólito foi inicialmente justificado como o ponto de maior estiramento do macro-íon. A medida em que a concentração de polieletrólito fosse reduzida, a diluição atuaria somente no sentido de diminuir as interações hidrodinâmicas entre os macro-íons.

Existe, entretanto, indicação experimental [123] de que este valor máximo não seria obtido se fossem tomadas precauções para remover impurezas iônicas que poderiam estar presentes na solução, por exemplo, pequenas quantidades de dióxido de carbono atmosférico ou mesmo íons provenientes da auto-ionização da água. Estes íons poderiam fornecer suficiente força iônica para diminuir  $\eta_{sp}/c_p$ . Na

ausência completa de impurezas é muito provável que  $\eta_{sp}/c_p$  de soluções de polieletrólitos aumente ilimitadamente com a diluição, pois este tipo de comportamento é característico de eletrólitos simples em água.

Quando um sal simples é adicionado a uma solução de polieletrólito, alguns dos eletrólitos móveis atingem o macro-íon; o recobrimento eletrostático de cargas causa redução no potencial repulsivo entre segmentos e o macro-íon se contrai. Esta contração é manifestada na forma de uma diminuição da viscosidade da solução.

Um fator de complicação extra é a possibilidade de comportamento viscosimétrico não-newtoniano destes sistemas. Isto pode ser originado por orientação e deformação das cadeias sob gradiente de viscosidade e sua subsequente influência em interações hidrodinâmicas [100].

### III.1.4.2 - Sedimentação

Transferência de massa ocorre em qualquer sistema uniforme multi-componente quando submetido a um campo gravitacional ou inercial. O resultado desta transferência de massa é a formação de gradientes de concentração nos quais cada componente atinge um potencial químico uniforme. Em uma solução ideal, é válida a equação barométrica [124]:

$$\frac{d(\ln x_i)}{dr^2} = \frac{M_i (1 - \bar{v}_i \rho) \omega^2}{2 R T} \quad (58)$$

que descreve a variação da fração molar de um componente  $i$  ( $x_i$ ) em função do quadrado da distância de uma determinada altura dentro da solução ao eixo de centrifugação ( $r^2$ ).

A equação termodinâmica de equilíbrio de sedimentação é

válida para qualquer fluido e tem sido muito útil na determinação de parâmetros moleculares [125]. Entretanto, os gradientes de concentração previstos por esta equação são raramente observados devido a restrições cinéticas.

A primeira descrição da cinética de sedimentação é dada pela lei de Stokes: a velocidade de deslocamento vertical de uma partícula esférica em um campo inercial é dada pela razão entre seu peso de flutuação e seu atrito com o meio [126].

$$\frac{dr}{dt} = \frac{m_i (1 - \bar{v}_i \rho) \omega^2 r}{6 \pi \eta a_i} \quad (59)$$

Assim, a velocidade de sedimentação de uma substância com uma densidade  $\rho_i$  depende do raio da partícula  $a_i$  e da sua massa  $m_i$ , da densidade e viscosidade do meio. A velocidade de deslocamento por unidade de campo inercial, chamada de coeficiente de sedimentação, é usualmente medida em unidades de Svedberg, em que 1 Svedberg corresponde a  $10^{-13}$  segundos.

Utilizando a descrição geral feita anteriormente para sedimentação, a velocidade de um polímero neutro é determinada pelo balanço entre as forças de aceleração gravitacionais ou inerciais e as forças de retardamento devido ao atrito com o meio. No caso de polieletrólitos ocorre ainda uma complicação adicional. Devido a grande diferença de tamanho, o macro-ion sedimenta a uma velocidade maior que seus contra-ions e isto cria um gradiente de potencial eletrostático (potencial de sedimentação). Ao mesmo tempo, atuam as forças de atração eletrostática entre o macro-ion e seus contra-ions, que evitam a separação de cargas. Como o coeficiente de sedimentação do macro-ion é geralmente muito maior que o do contra-ion, o potencial

de sedimentação diminui a velocidade de sedimentação do macro-íon. Isto significa que o coeficiente de sedimentação final é geralmente muito menor que aquele da macromolécula neutra de mesmo tamanho, conformação e volume específico parcial [98].

Este fenômeno foi inicialmente estudado por Pedersen [127] e chamado de efeito primário de carga. De acordo com sua teoria foi mostrado que o coeficiente de sedimentação da macromolécula neutra correspondente poderia ser obtido através do aumento da força iônica da solução (adição de sal), que eliminaria o potencial de sedimentação. Embora a diferença entre os coeficientes de sedimentação entre cátion e ânion do sal adicionado possa também criar um gradiente de potencial eletrostático na solução, que por sua vez também afetaria a velocidade de sedimentação do macro-íon, este problema pode ser omitido se os íons possuírem velocidades de sedimentação próximas, como é o caso do sal NaCl. Este último problema é chamado de efeito secundário de carga.

Os procedimentos citados acima foram muito utilizados em química de proteínas com o propósito de determinar a massa molar dessas macromoléculas [128]. De fato, uma das verificações experimentais da Hipótese Macromolecular de Staudinger foi a determinação de massa molares de proteínas por ultracentrifugação analítica, feita por The Svedberg.

Vários trabalhos apresentam tratamentos teóricos dos efeitos de carga na sedimentação de polieletrólitos. No tratamento clássico [119, 127, 129, 130] a velocidade de sedimentação do macro-íon e seus contra-íons é vista como resultante de dois componentes: a contribuição do campo inercial e a contribuição do campo elétrico criado internamente por uma separação parcial de cargas. Tratamentos

mais rigorosos [131, 132] envolvem a aplicação de termodinâmica de processos irreversíveis e expressam o acoplamento entre os diferentes fluxos iônicos em termos de coeficientes fenomenológicos. Outros tratamentos consideram, além dos efeitos primários e secundários de carga, fatores tais como: expansão da cadeia, atmosfera iônica e drenagem do macro-ion. Estes fatores também afetam as propriedades de atrito do polieletrólito e, portanto, influenciam sua velocidade de sedimentação [133,134].

Segundo o tratamento apresentado por Alexandrowicz e Daniel [129], a equação obtida para o coeficiente de sedimentação tem como base as seguintes suposições:

(a) apenas uma fração dos contra-ions está associada firmemente ao macro-ion e esta fração é independente das concentrações de polieletrólito e eletrólitos adicionados;

(b) o coeficiente de atrito do macro-ion é independente da força iônica da solução e varia com a concentração da macromolécula segundo a seguinte equação:

$$f_p = f_p^0 (1 + K_p C_p) \quad (60)$$

onde  $C_p$  é a concentração em g/l,  $K_p$  é um coeficiente e  $f_p^0$  é o coeficiente de atrito intrínseco da molécula de polieletrólito.

Neste tratamento, o coeficiente de sedimentação do polieletrólito na presença de sal é dado por:

$$\frac{1}{S_p} = \left[ \frac{1 + c_p M}{S_p^0} + \frac{\theta^2 f^-}{\bar{M}m_+} \left( \frac{c_p}{c_+ + c_-} \right) \right] \times \left[ \frac{1 + \theta f^+ (c_- s_- - c_+ s_+)^{-1}}{\bar{M}m_+ (c_+ + c_-)} \right] \quad (61)$$

onde:

$S_p$  é o coeficiente de sedimentação aparente do polieletrólito contendo cargas fixas positivas.

$S_p^0$  é o coeficiente de sedimentação intrínseco:

$$\lim_{(c_+ + c_-) \rightarrow \infty} S_p = S_p^0 \quad (62)$$

$c_p$ ,  $c_-$  e  $c_+$  são as concentrações molares do polieletrólito, do contra-íon e do co-íon, respectivamente.

$f^-$  é o coeficiente de atrito médio do contra-íon e do co-íon.

$\bar{M}m_+$  é a massa molar corrigida da unidade monomérica ionizada que é dada por:

$$\bar{M}m_+ = Mm_+ (1 - \bar{v}_{m_+} \rho) \quad (63)$$

onde  $Mm_+$  é a massa molar do monômero ionizado,  $\bar{v}_{m_+}$  o volume específico parcial da unidade monomérica ionizada e  $\rho$  a densidade da solução.

$s_-$  e  $s_+$  são os coeficientes de sedimentação do contra-íon e do co-íon, respectivamente.

A expressão geral acima é simplificada quando a solução de polieletrólito se aproxima dos seguintes limites: (i) excesso de sal e (ii) ausência de sal adicionado. As curvas teóricas obtidas são apresentadas na figura 40. Quando a razão polímero/sal é baixa são obtidas várias retas, cada uma correspondendo a uma concentração diferente de sal. Quando esta razão é mais elevada, a relação linear deixa de ser obedecida e surge uma curva côncava ascendente. Finalmente, a ascensão máxima é atingida quando a concentração de sal é muito baixa em relação a concentração de polieletrólito, predominando o efeito primário de carga.

Apesar do tratamento proposto para o coeficiente de sedimentação ter sido testado experimentalmente [135], o mesmo foi criticado quanto a suposição de que o coeficiente de atrito do polieletrólito não dependeria da força iônica da solução [136]. Como a variação da força iônica da solução provoca alterações conformacionais na cadeia de polieletrólito, não deve ser esperado que

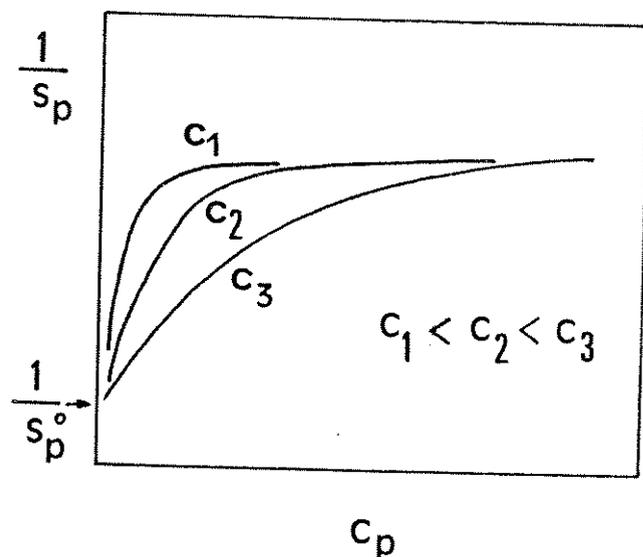


Figura 40 - Representação esquemática ilustrando a dependência entre o inverso do coeficiente de sedimentação polieletrólito e sua concentração na solução ( $c_p$ ) a diferentes concentrações de sal ( $m_s$ ), segundo a referência [129].

o coeficiente de atrito se mantenha constante. Além disso, foi sugerido que o efeito primário de carga seria eliminado em solução infinitamente diluída de polieletrólito na presença de sal.

Entretanto, o efeito de carga não é desprezível com relação a distribuição de íons ao redor do polieletrólito e isto influencia as propriedades de transporte nestas condições [137]. Este último aspecto foi demonstrado experimentalmente no trabalho de Nagasawa e Eguchi [133].

Mais recentemente Roots e Nystrom [114] estudaram o efeito da concentração sobre o coeficiente de sedimentação de soluções de polieletrólito semi-diluídas, em várias forças iônicas. A previsão teórica para o coeficiente de sedimentação foi obtida com base em relações desenvolvidas por Odijk [113]. Deste modo, o coeficiente de sedimentação de polieletrólito em soluções semi-diluídas e na presença de sal seria proporcional a  $c_p^{-0,5}$ . Entretanto, resultados experimentais obtidos a partir de medidas de velocidade de sedimentação em ultracentrífuga analítica, com soluções de poli(estireno sulfonato de sódio), mostraram discordância com relação ao resultado teórico. O coeficiente de sedimentação é proporcional a  $c_p^{-0,64}$ , neste caso. Os autores associaram esta discrepância a uma má adequação de parâmetros teóricos às propriedades hidrodinâmicas [138].

Por outro lado, soluções de polieletrólito na ausência de sal apresentaram comportamento bastante complexo e isto foi observado através do gráfico  $S_p \times c_p$ , apresentado na figura 41. Inicialmente  $S_p$  diminui com a concentração até atingir um platô e novamente decrescer. Este comportamento peculiar foi discutido da seguinte maneira: a primeira parte da curva representa uma situação na qual as moléculas de polieletrólito se encontram rígidas e alinhadas. Na região central aparecem entrelaçamentos de cadeias e em altas concentrações estes efeitos crescem progressivamente e as cadeias de polieletrólito adquirem flexibilidade [114]. Em contraste com o resultado

experimental, a previsão teórica nestas condições mostra que o coeficiente de sedimentação deveria ser independente da concentração.

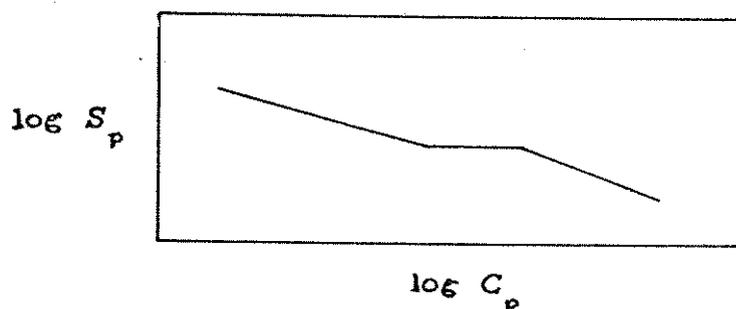


Figura 41 - Gráfico do logaritmo do coeficiente de sedimentação do polieletrólito versus o logaritmo da sua concentração, para soluções de poli(estireno sulfonato de sódio) na ausência de sal [114].

Vários outros trabalhos podem ser encontrados na literatura sobre este tema. Alguns deles apresentam novos tratamentos teóricos, utilizando métodos computacionais sofisticados [134]. Outros tentam adequar resultados experimentais obtidos com macromoléculas cujos parâmetros moleculares são bem definidos, aos tratamentos teóricos existentes.

De fato, o estudo de sedimentação de polieletrólitos é dificultado tanto pela complexidade das abordagens teóricas quanto pela dificuldade de se obter bons modelos experimentais.

### III.1.5 - Osmocentrifugação

O processo de osmocentrifugação foi discutido no capítulo anterior (Seção II.1.7). A eficiência analítica da osmocentrifugação foi comprovada através da determinação das massas molares e de coeficientes viriais de dextranas e proteínas [139, 140]. A osmossedimentação e a osmocentrifugação mostraram-se úteis também para finalidades preparativas, tais como concentração e fracionamento de dextrana polidispersa ( $\bar{M}_w = 2 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Neste caso, foi verificado que as alíquotas retiradas do fundo da cela são mais ricas em componentes de massa molar média elevada que as alíquotas de solução do topo da cela.

A osmocentrifugação poderia ser utilizada também no fracionamento de solutos de massa molar pequena, desde que se utilizasse membranas de osmose reversa. Outra possibilidade, que está descrita neste capítulo da tese, é o fracionamento de contra-íons de um polieletrólito, contido por uma membrana de ultrafiltração.

### III.1.6 - Plano fatorial [141]

Foram utilizados planos fatoriais para avaliar o comportamento de gradientes de concentração dos polieletrólitos e íons sódio e potássio, em experimentos de osmocentrifugação. Entre as variáveis que afetariam principalmente estes gradientes de concentração, foram considerados: concentração de polieletrólito, concentração total de contra-íons sódio e potássio e tempo de osmocentrifugação. Outras variáveis, tais como velocidade e temperatura de centrifugação, foram mantidas constantes. A utilização de planos fatoriais, neste caso, tem como vantagem a aplicação de um número relativamente reduzido de experimentos para obter resultados dos quais se possa concluir sobre a

influência dos vários efeitos. Embora este número de experimentos seja incapaz de explorar completamente uma grande região no espaço de variáveis, o plano fatorial pode ser utilizado também para indicar a melhor área de exploração em futuros experimentos.

Para a avaliação do efeito das 3 variáveis citadas nos gradientes de concentração, foram tomados dois valores (ou níveis) para cada uma das 3 variáveis. Foi realizado um total de 8 experimentos, resultantes de todas as combinações possíveis. Na tabela 12 é indicado o formato de montagem dos experimentos.

Tabela 12 - Notações comuns utilizadas para a matriz do plano fatorial de três variáveis em dois níveis ( $2^3$ ).

Experimento	Variáveis			Resposta
	A	B	C	
1	-	-	-	$R_1$
2	-	-	+	$R_2$
3	-	+	-	$R_3$
4	-	+	+	$R_4$
5	+	-	-	$R_5$
6	+	-	+	$R_6$
7	+	+	-	$R_7$
8	+	+	+	$R_8$

A notação +/- na tabela é usada para indicar os níveis superior e inferior de cada variável e facilitar a apresentação dos cálculos. Como resposta é colocado o resultado final do experimento

na forma de um parâmetro de interesse. Neste caso, são utilizados 3 parâmetros: os gradientes de concentração de polieletrólito e os de íons sódio e potássio. Os gradientes obtidos experimentalmente são apresentados segundo a relação:

$$\frac{\Delta C}{C_m}$$

onde  $\Delta C$  é a diferença de concentração entre a fração do fundo e a do topo do compartimento da solução e  $C_m$  é a concentração média das 5 frações, deste mesmo compartimento.

É chamado de efeito principal a influência de uma variável no resultado final, ou seja, a mudança na resposta quando se desloca de um nível a outro, em ordem crescente desta variável. Comparando-se os dois primeiros experimentos da tabela 12, a diferença no valor da resposta é resultante da mudança no valor da variável C, já que as outras duas (A e B) são mantidas constantes. Desta forma, o planejamento total fornece quatro medidas do efeito de C relativos às quatro combinações entre as outras variáveis. A média da diferença do valor da resposta para estas quatro medidas fornece o valor do efeito principal desta variável:

$$\text{EFEITO PRINCIPAL DA VARIÁVEL } \underline{C} = \frac{(R_2 - R_1) + (R_4 - R_3) + (R_6 - R_5) + (R_8 - R_7)}{4}$$

(64)

Portanto, o valor obtido no cálculo acima indica o efeito médio da variável C em todas as condições das outras variáveis.

Este plano é também útil na estimativa de interações entre as variáveis. Interações ocorrem quando duas variáveis não atuam aditivamente na resposta. Por exemplo, para calcular a interação

entre as variáveis A e C, toma-se a metade da diferença entre dois efeitos parciais médios da variável A nos dois níveis da variável C, ou seja:

$$\begin{aligned} \text{INTERAÇÃO} &= \left( \frac{[(R_6 - R_5) + (R_8 - R_7)]/2 - [(R_2 - R_1) + (R_4 - R_3)]/2}{2} \right) \\ \text{A x C} &= \left( \frac{R_1 + R_3 + R_6 + R_8}{4} \right) - \left( \frac{R_2 + R_4 + R_5 + R_7}{4} \right) \end{aligned} \quad (65)$$

Assim como cada efeito principal, a interação é dada por uma diferença entre duas médias, sendo metade das oito respostas incluídas em uma média e metade em outra. As interações A x B e B x C são obtidas de modo similar.

Devido à simetria do plano um método rápido de cálculo de efeitos e interações pode ser utilizado. Para isto, é feita a multiplicação direta dos sinais das variáveis, segundo a tabela 12, e este sinal adicionado à resposta correspondente. Tanto os efeitos e as interações são obtidos pela soma de todas as respostas, com seu sinal respectivo, e divisão por 4. No caso de interações, os sinais das variáveis são multiplicados entre si e o resultado desta multiplicação é transferido como o sinal da resposta. Na tabela 13 são apresentados os sinais resultantes deste método para o cálculo dos efeitos e das interações.

Tabela 13 - Sinais para o cálculo dos efeitos e interações do plano fatorial  $2^3$ .

Exp.	Média	Efeito			Interação			Resposta
		A	B	C	A x B	A x C	B x C	
1	+	-	-	+	+	+	+	R <sub>1</sub>
2	+	-	-	+	+	-	-	R <sub>2</sub>
3	+	-	+	-	-	+	-	R <sub>3</sub>
4	+	-	+	-	-	-	+	R <sub>4</sub>
5	+	+	-	-	-	-	+	R <sub>5</sub>
6	+	+	-	-	-	+	-	R <sub>6</sub>
7	+	+	+	+	+	-	-	R <sub>7</sub>
8	+	+	+	+	+	+	+	R <sub>8</sub>
divisor	8	4	4	4	4	4	4	

### III.1.7 - Objetivo

O objetivo deste capítulo da tese é investigar o desempenho do processo de osmocentrifugação na sedimentação de soluções de polieletrólitos e no fracionamento de contra-íons a eles associados.

## III.2 - Parte experimental e resultados

### III.2.1 - Materiais e equipamentos

Acetato de celulose Rhodia.

Ácido acético glacial Merck.

Acetona, p.a. Merck.

Dextrana azul 2000, Pharmacia Fine Chemicals, código n.º. 17-0360-01, lote KH 38333.

Poli(estireno sulfonato de sódio), Aldrich Chemical Comp., código n.º. 24,305-1, lote 0201355.

Ácido poliacrílico ( $\bar{M}_w = 50.000$ ) Polysciences Inc., código n.º. 0627, lote 65134

Centrífuga refrigerada, de caçapas basculantes, RC-3B, Sorvall Instruments.

Espectrofotômetro UV-visível, Micronal B 382.

Densímetro PAAR-DMA 60/602, acoplado a um registrador da Instrumentos Científicos CG. Ltda.

Fotômetro de chama Micronal.

### III.2.2 - Membranas

As membranas utilizadas em celas de diálise nos experimentos de osmocentrifugação, que serão descritos a seguir, são membranas assimétricas de acetato de celulose. As membranas foram preparadas a partir das seguintes soluções, conforme procedimento desenvolvido em nosso laboratório [86, 87].

Solução A: 11% (m/m) de acetato de celulose;  
53% (m/m) de ácido acético;

13% (m/m) de acetona e  
23% (m/m) de água bidestilada.

Solução B: 11% (m/m) de acetato de celulose;  
23% (m/m) de ácido acético;  
43% (m/m) de acetona e  
23% (m/m) de água bidestilada.

O acetato de celulose foi inicialmente dissolvido em ácido acético e acetona. Sobre a solução homogênea obtida adicionou-se água bidestilada e a mistura foi deixada com agitação até completa dissolução do material precipitado.

Grande parte das membranas utilizadas em osmocentrifugação de polieletrólitos foram preparadas na máquina semi-automática de fabricação de membranas, cuja descrição se encontra na seção II.2.3.

### III.2.3 - Celas de osmocentrifugação

Inicialmente, foram utilizadas celas construídas em poliéster reforçado com fibra de vidro, esquematizadas na figura 42. Estas celas foram utilizadas nos experimentos de osmocentrifugação de Dextrana azul. Para os experimentos com poli(estireno sulfonato) e poli(acrilato de sódio e potássio), as celas em poliéster se tornaram inadequadas na amostragem das frações, já que o material da cela é quase opaco e as soluções são incolores. Para solucionar este problema foram construídas celas em acrílico idênticas às de poli(éster).

Cada cela de osmocentrifugação possui 2 compartimentos de 4,5 cm<sup>3</sup> cada, separados entre si por 15 cm<sup>2</sup> de área útil de membrana. Na

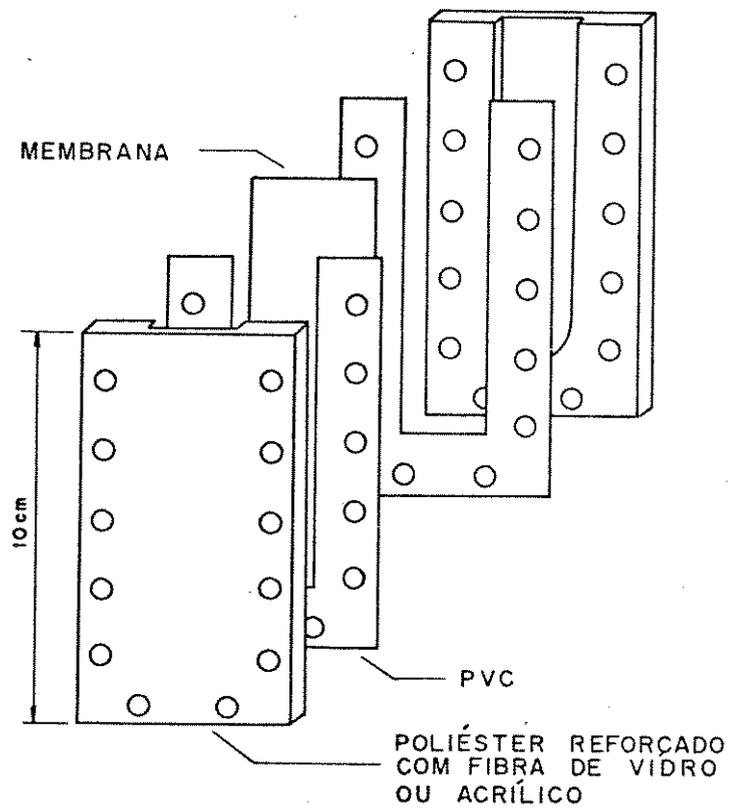


Figura 42 - Cella de osmocentrifugação

montagem da cela as placas de poli(éster) ou acrílico são parafusadas, colocando-se entre elas a membrana suportada por uma tela de níquel perfurada e guarnições de PVC.

### III.2.4 - Neutralização de ácido poliacrílico

As soluções de poli(acrilato de sódio e potássio) utilizadas nos experimentos de osmocentrifugação foram preparadas a partir de solução 25% de ácido poliacrílico ( $\bar{M}_w = 50.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Esta solução foi inicialmente padronizada por titulação potenciométrica com solução 0,0978 M de hidróxido de sódio. A massa de ácido poli(acrílico) utilizada foi de 0,5661 g e a medida de pH tomada a cada 0,5 ml de base adicionada. A curva de titulação obtida é mostrada na figura 43. Com base neste resultado foi determinado o pH de neutralização do ácido poliacrílico que se situa a pH 9,5 e também a quantidade de ácido presente na solução estoque, que corresponde a 24,53% em massa.

As soluções de ácido poliacrílico utilizadas em experimentos de osmocentrifugação foram preparadas por pesagem e diluição em água e neutralizadas com uma mistura 1:1 de NaOH e KOH de concentração total de 0,70 M.

### III.2.5 - Experimentos de osmocentrifugação

Para a realização de experimentos de osmocentrifugação de íons sódio e potássio, foram utilizados os seguintes polieletrólitos: dextrana azul ( $\bar{M}_w = 2 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ ), poli(estireno sulfonato de sódio) e poli(acrilato de sódio e potássio) ( $\bar{M}_w = 50.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Este último foi obtido a partir da neutralização de ácido poliacrílico.

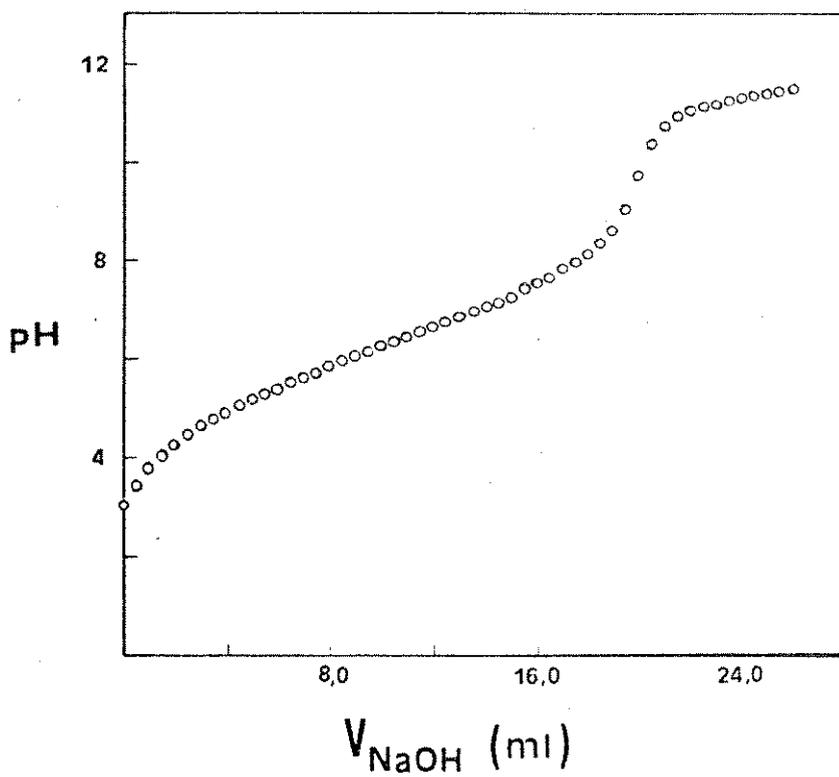


Figura 43 - Curva de titulação de ácido poliacrílico com solução de NaOH 0.0978 M.

Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas de cada um dos polieletrólitos e estas soluções foram dialisadas contra soluções contendo cloretos de sódio e potássio, na proporção de 1:1 (em moles/l), durante 24 horas. Os experimentos foram feitos em dois níveis de concentração de cada um dos polieletrólitos e de concentração total de contra-íons sódio e potássio.

As celas de osmocentrifugação foram preenchidas com as soluções da seguinte maneira: em um dos compartimentos foi colocada a solução de polieletrólito dialisada e, no outro, a solução contendo os cloretos de sódio e potássio, utilizada na diálise.

No caso das soluções de dextrana azul as celas foram montadas com membranas do tipo A, que apresentaram retenção superior a 99,7%. Por outro lado, membranas do tipo B foram utilizadas em experimentos de osmocentrifugação de soluções de poli(estireno sulfonato de sódio e potássio) e poli(acrilato de sódio e potássio), cujas retenções foram de 98,2% e 99,9% respectivamente.

As celas preenchidas com cada um dos pares de soluções foram colocadas em caçapas de centrífuga e centrifugadas a 3000 rpm e 20°C, durante dois tempos diferentes. Para cada polieletrólito utilizado, as tres variáveis combinadas (i.e., concentração de polieletrólito, concentração total de contra-íons e tempo de osmocentrifugação) resultaram em um total de 8 experimentos, que foram montados seguindo plano fatorial (seção III.1.6).

Depois de centrifugadas, as celas foram fixadas em um suporte e as soluções retiradas com o auxílio de uma seringa conectada a uma haste de vidro. A solução de polieletrólito, contida em um dos compartimentos da cela, foi dividida em cinco frações, cada uma correspondendo a uma dada faixa de altura da coluna de solução. Parte

de cada fração foi diluída para análise do conteúdo de sódio e potássio e o restante utilizado para análise da concentração de polieletrólito. A solução de cloretos de sódio e potássio, contida no outro compartimento da cela, foi retirada sem fracionar, utilizando-se o mesmo procedimento para sua análise.

A determinação da concentração de sódio e potássio em cada fração foi feita simultaneamente por fotometria de chama, a partir da curva de calibração de cada íon em cada meio. Desta forma, foi possível corrigir interferências causadas pelos polieletrólitos no sinal fotométrico de cada íon. Por outro lado, as concentrações dos polieletrólitos dextrana azul e poli(estireno sulfonato de sódio e potássio) foram obtidas por medidas de absorção, em comprimentos de onda de 640 e 280 nm, respectivamente. As concentrações das soluções de poli(acrilato de sódio e potássio) foram determinadas através de medidas de densidade. Os gradientes de concentração obtidos são apresentados segundo a relação:

$$\frac{\Delta C}{C_m}$$

onde  $\Delta C$  é a diferença de concentração entre a fração do fundo e do topo da solução de polieletrólito e  $C_m$  é a média das concentrações das cinco frações recolhidas neste mesmo compartimento.

Os resultados obtidos nos experimentos de osmocentrifugação dos tres polieletrólitos estudados são apresentados nas tabelas 14, 15 e 16. Nas tabelas, os gradientes indicados são valores médios obtidos a partir de duplicatas de cada experimento. Estes resultados são também apresentados nas figuras 44, 45 e 46.

Tabela 14 - Experimentos de osmocentrifugação de soluções de dextrana azul (DA), em presença de contra-íons sódio e potássio, a 3000 rpm e 20°C.

EXP.	CONCENTRAÇÃO DE POLIELETRÓLITO (g/dl)	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CONTRA-ÍON (moles/l) x 10 <sup>3</sup>	TEMPO DE CENTRIF. (h)	FOLIELETRÓLITO (DA)	ΔC / C <sub>m</sub> *		Na SF	K
					SÓDIO	POTÁSSIO		
1	0,80	2,5	20	2,25 ± 0,05	0,66 ± 0,01	0,70 ± 0,01	1,02	1,02
2	0,80	2,5	45	2,49 ± 0,03	0,68 ± 0,02	0,74 ± 0,01	1,02	1,02
3	0,80	3,3	20	2,34 ± 0,06	0,46 ± 0,01	0,52 ± 0,01	1,03	—
4	0,80	3,3	45	2,62 ± 0,01	0,60 ± 0,05	0,66 ± 0,05	—	—
5	1,20	2,5	20	2,00 ± 0,05	0,64 ± 0,01	0,70 ± 0,03	1,04	1,03
6	1,20	2,5	45	2,17 ± 0,05	0,63 ± 0,02	0,71 ± 0,01	1,03	1,02
7	1,20	3,3	20	2,17 ± 0,03	0,55 ± 0,01	0,60 ± 0,02	1,02	1,03
8	1,20	3,3	45	2,35 ± 0,06	0,59 ± 0,01	0,67 ± 0,01	1,03	1,03

\*  $\frac{\Delta C}{C_m}$ , obtido a partir de absorbância a 640 nm.

$$SF = \frac{Na}{K} = \frac{1 + (\Delta C/2 C_m) K}{1 + (\Delta C/2 C_m) Na}$$

Tabela 15 - Experimentos de osmocentrifugação de soluções de poli(estireno sulfonato de sódio e potássio) a 3000 rpm e 20°C.

EXP.	CONCENTRAÇÃO DE POLIELETRÓLITO (g/dl)	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CONTRA-ÍON (moles/l) x 10 <sup>3</sup>	Solução de diálise	solução de polieletrólito após a diálise	TEMPO DE CENTRIF. (h)	POLIELETRÓLITO (PSSK)	* $\frac{\Delta C}{C_m}$		Na SF K
							SÓDIO	POTÁSSIO	
1	0,90	1,1		2,8	20	0,33 ± 0,03	0,32 ± 0,01	0,39 ± 0,04	1,03
2	0,90	1,1		2,8	60	0,47 ± 0,01	0,34 ± 0,03	0,38 ± 0,01	—
3	0,90	2,5		3,0	20	0,51 ± 0,05	0,42 ± 0,02	0,51 ± 0,03	1,04
4	0,90	2,5		3,0	60	0,89 ± 0,05	0,60 ± 0,05	0,69 ± 0,01	1,04
5	2,50	1,1		5,3	20	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	—
6	2,50	1,1		5,3	60	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,07	0,24 ± 0,07	—
7	2,50	2,5		6,9	20	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,02	—
8	2,50	2,5		6,9	60	0,39 ± 0,02	0,34 ± 0,04	0,36 ± 0,04	—
9	4,00	2,5		7,8	60	0,24 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,26 ± 0,02	—

\*  $\frac{\Delta C}{C_m}$ , obtido a partir de absorbância a 280 nm.

Tabela 16 - Experimentos de osmocentrifugação de soluções de poli(acrilato de sódio e potássio) a 3000 rpm e 20°C.

EXP.	CONCENTRAÇÃO DE POLIELETRÓLITO (g/dl)	CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CONTRA-ION (moles/l) x 10 <sup>3</sup>	TEMPO DE CENTRIF. (h)	POLIELETRÓLITO (PASK)		* $\frac{\Delta C}{C_m}$
				SÓDIO	POTÁSSIO	
1	0,51	3,2	20	0,46 ± 0,05	0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,06
2	0,51	3,2	90	0,74 ± 0,01	0,55 ± 0,07	0,57 ± 0,06
3	0,51	5,6	20	0,35 ± 0,05	0,32 ± 0,05	0,33 ± 0,05
4	0,51	5,6	90	0,69 ± 0,03	0,54 ± 0,06	0,54 ± 0,06
5	1,00	3,2	20	0,43 ± 0,03	0,38 ± 0,08	0,40 ± 0,08
6	1,00	3,2	90	0,53 ± 0,05	0,40 ± 0,07	0,42 ± 0,07
7	1,00	5,6	20	0,46 ± 0,03	0,22 ± 0,05	0,23 ± 0,05
8	1,00	5,6	90	0,61 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,48 ± 0,01
9	0,51	1,7	20	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,09	0,33 ± 0,09
10	0,51	1,7	90	0,51 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,41 ± 0,01

\*  $\frac{\Delta C}{C_m} \equiv \frac{\Delta \rho}{\rho_m - \rho_{H_2O}}$ , onde  $\rho$  é a densidade da solução.

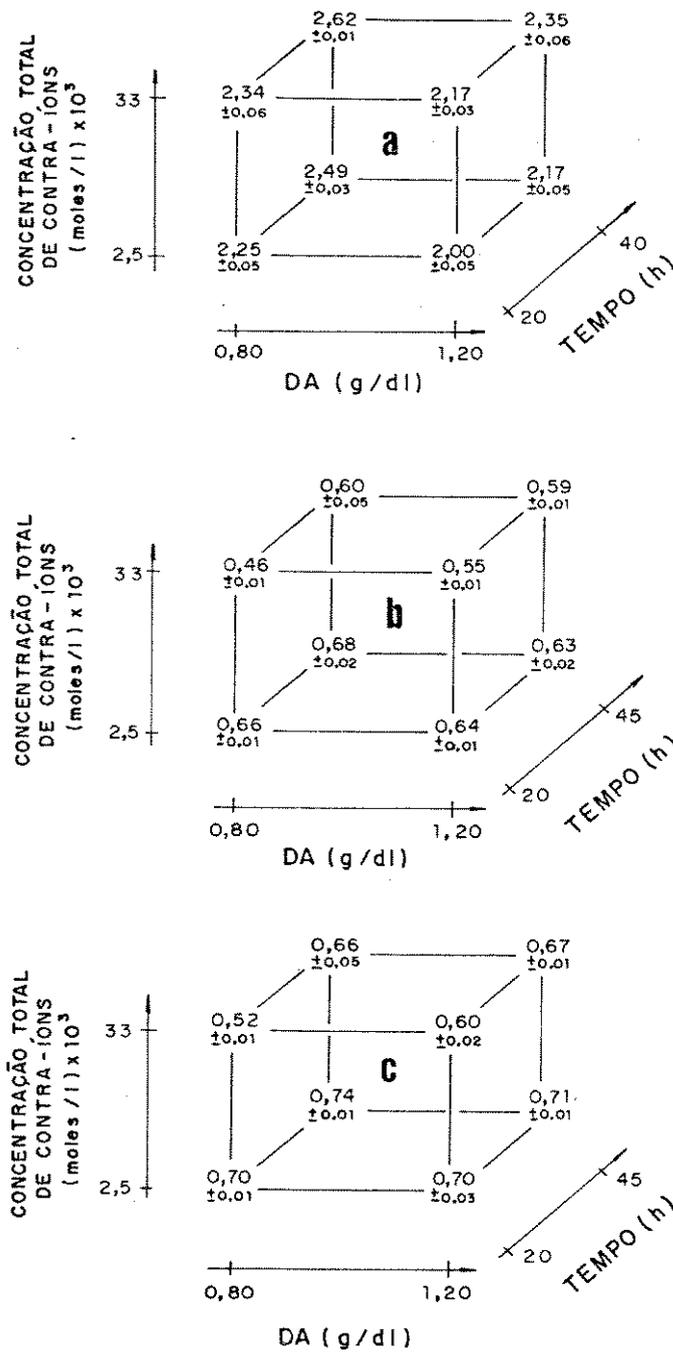


Figura 44 - Gradientes de concentração obtidos em experimentos de osmocentrifugação de soluções de dextrana azul em presença ions sódio e potássio. (a) dextrana azul; (b) sódio e (c) potássio.

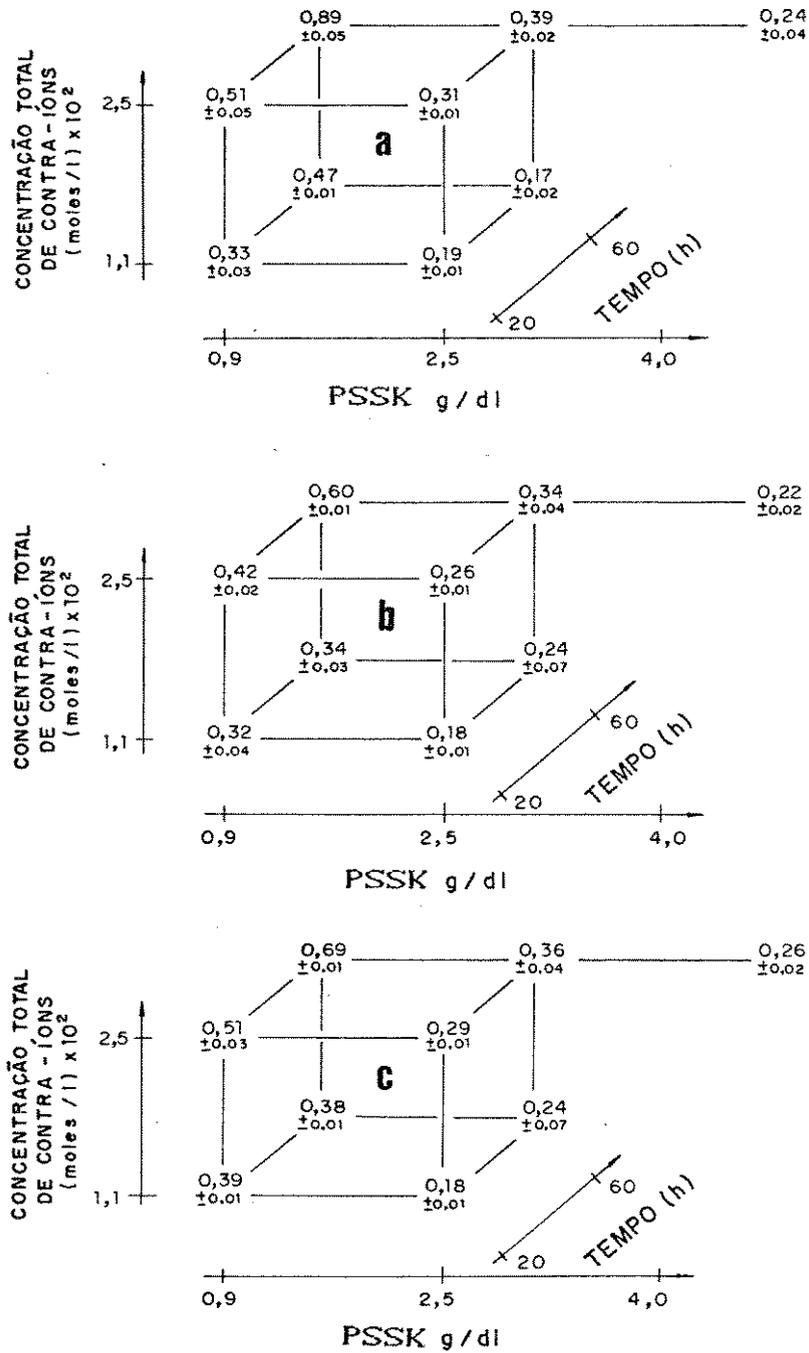


Figura 45 - Gradientes de concentração obtidos em experimentos de osmocentrifugação de soluções de poli(estireno sulfonato de sódio e potássio). (a) poli(estireno sulfonato de sódio e potássio); (b) sódio e (c) potássio.

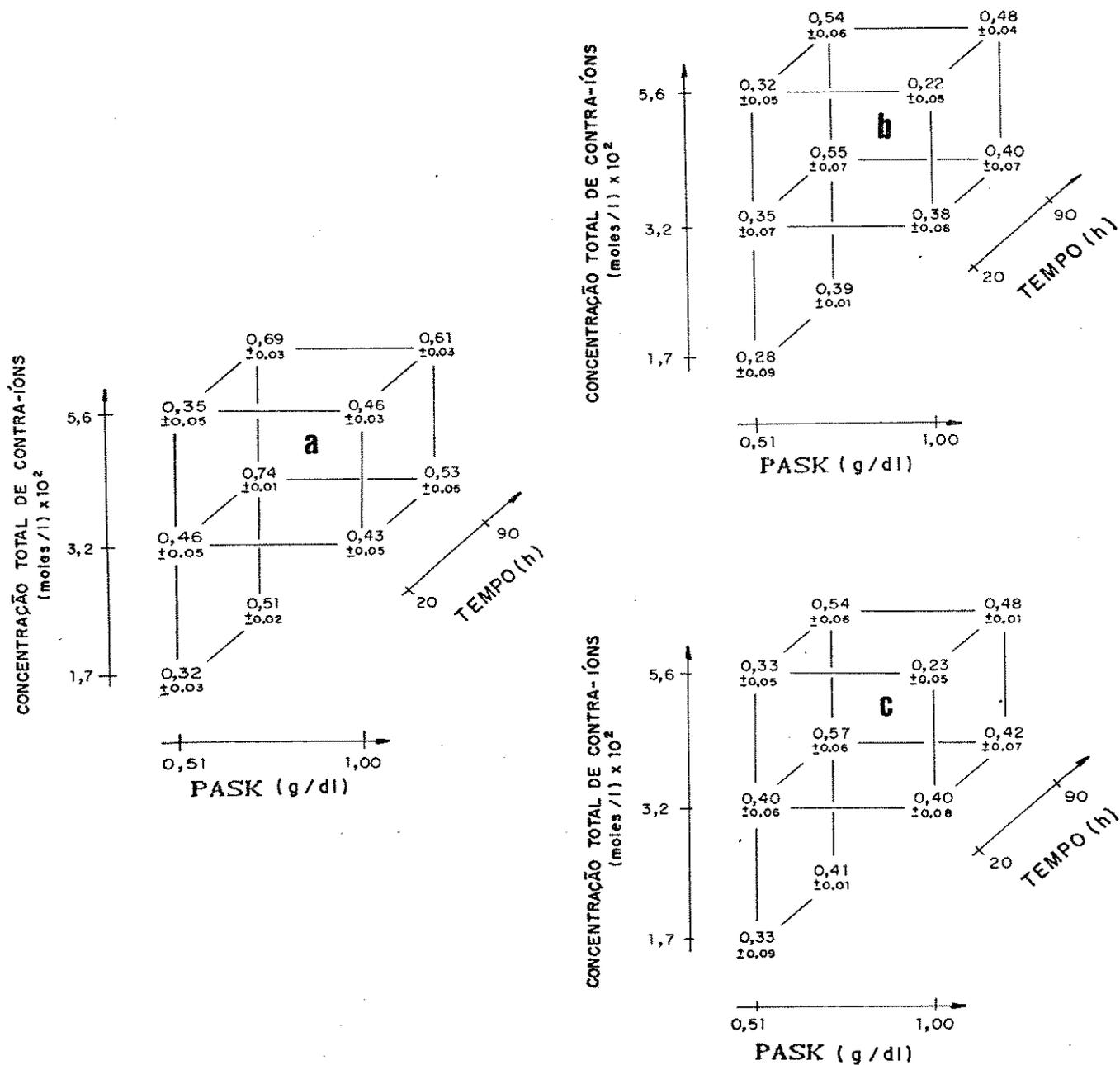


Figura 46 - Gradientes de concentração obtidos em experimentos de osmocentrifugação de soluções de poli(acrilato de sódio e potássio). (a) poli(acrilato de sódio e potássio); (b) sódio e (c) potássio.

A partir destes resultados foram determinados os efeitos principais de cada variável estudada sobre os gradientes de concentração obtidos experimentalmente. Foram também determinadas as interações entre duplas de variáveis, para cada conjunto de gradientes de concentração. Os cálculos efetuados seguiram também o método indicado pelo plano fatorial. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 17, 18, 19 e 20. As variáveis indicadas nas tabelas são: concentração de polieletrólito (CP), concentração total de contra-íons na solução de diálise (CI) e tempo de centrifugação (TC).

Tabela 17 - Efeitos principais das variáveis: concentração de polieletrólito (CP), concentração de contra-íons na solução de diálise (CI) e tempo de centrifugação (TC), sobre os gradientes de concentração obtidos em experimentos de osmocentrifugação de soluções de dextrana azul em presença de íons sódio e potássio.

Gradientes de concentração		Efeitos principais das variáveis		
		CP	CI	TC
DA	Polieletrólito	- 0,25 ± 0,04	+ 0,14 ± 0,04	+ 0,22 ± 0,04
	Sódio	0,01 ± 0,01	- 0,10 ± 0,01	+ 0,05 ± 0,01
	Potássio	+ 0,02 ± 0,01	- 0,10 ± 0,01	+ 0,06 ± 0,01

Tabela 18 - Efeitos principais das variáveis: concentração de polieletrólito (CP), concentração de contra-íons na solução de diálise (CI) e tempo de centrifugação (TC), sobre os gradientes de concentração obtidos em experimentos de osmocentrifugação de soluções de poli(estireno sulfonato de sódio e potássio).

Gradientes de concentração		Efeitos principais das variáveis		
		CP	CI	TC
PSSK	Polieletrólito	- 0,29 ± 0,02	+ 0,23 ± 0,02	+ 0,16 ± 0,02
	Sódio	- 0,16 ± 0,03	+ 0,11 ± 0,03	+ 0,06 ± 0,03
	Potássio	- 0,20 ± 0,03	+ 0,13 ± 0,03	+ 0,06 ± 0,03

Tabela 19 - Efeitos principais das variáveis: concentração de polieletrólito (CP), concentração de contra-íons na solução de diálise (CI) e tempo de centrifugação (TC), sobre os gradientes de concentração obtidos em experimentos de osmocentrifugação de soluções de poli(acrilatos de sódio e potássio).

Gradientes de concentração		Efeitos principais das variáveis		
		CP	CI	TC
PASK	Polieletrólito	- 0,05 ± 0,02	+ 0,01 ± 0,02	+ 0,22 ± 0,02
	Sódio	- 0,07 ± 0,03	- 0,03 ± 0,03	+ 0,18 ± 0,03
	Potássio	- 0,08 ± 0,03	- 0,05 ± 0,03	+ 0,17 ± 0,03

Tabela 20 - Interações entre as variáveis CP, CI e TC, nos gradientes de concentração obtidos em experimentos de osmocentrifugação de dextrana azul (DA), poli(estireno sulfonatos de sódio e potássio) (PSSK) e poli(acrilatos de sódio e potássio) (PASK).

Gradientes de concentração		Interações		
		CP x CI	CP x TC	CI x TC
DA	Poli eletrólito	+ 0,03 ± 0,04	- 0,04 ± 0,04	+ 0,01 ± 0,04
	Sódio	+ 0,04 ± 0,01	- 0,03 ± 0,01	+ 0,04 ± 0,01
	Potássio	+ 0,03 ± 0,01	- 0,03 ± 0,01	+ 0,04 ± 0,01
PSSK	Poli eletrólito	+ 0,06 ± 0,02	- 0,11 ± 0,02	+ 0,08 ± 0,02
	Sódio	- 0,03 ± 0,03	- 0,01 ± 0,03	+ 0,02 ± 0,03
	Potássio	- 0,03 ± 0,03	+ 0,01 ± 0,03	+ 0,03 ± 0,03
PASK	Poli eletrólito	+ 0,07 ± 0,02	- 0,09 ± 0,02	+ 0,03 ± 0,02
	Sódio	- 0,01 ± 0,03	- 0,04 ± 0,03	+ 0,07 ± 0,03
	Potássio	- 0,01 ± 0,03	- 0,03 ± 0,03	+ 0,07 ± 0,03

### III.3 - Discussão

Os gradientes de concentração previstos pela equação barométrica para soluções aquosas de NaCl 0,1% m/m ( $1,71 \times 10^{-2}$  moles/l) e KCl 0,1% m/m ( $1,34 \times 10^{-2}$  moles/l) centrifugadas a 3000 rpm e 20°C, separadamente, são:

$$\frac{d(\ln x)}{d(r^2)} = 8,35 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-2} \quad (\text{para NaCl 0,1\%})$$

$$\frac{d(\ln x)}{d(r^2)} = 9,12 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-2} \quad (\text{para KCl 0,1\%})$$

o que indica que apenas um excesso inferior a 0,01% de soluto será obtido na quinta fração (fundo) de uma coluna de solução de 5 cm de altura, em ambos os casos. A partir desses valores é possível obter a mesma relação empregada na parte experimental deste capítulo para os dois solutos:

$$\frac{\Delta C}{C_m} = 7,1 \times 10^{-4} \quad (\text{para NaCl 0,1\%})$$

$$\frac{\Delta C}{C_m} = 8,0 \times 10^{-4} \quad (\text{para KCl 0,1\%})$$

Apesar da diferença entre os gradientes de densidade, os valores previstos não são úteis para fracionamento de solutos de massa molar reduzida, através de experimentos de equilíbrio de sedimentação. Estes valores seriam também esperados em experimentos de equilíbrio de osmocentrifugação onde a membrana fosse impermeável aos íons mas permeável ao solvente, e os compartimentos fossem preenchidos, de um lado pela solução aquosa do sal e do outro pela água. A maior diferença entre um experimento de centrifugação normal e o de

osmocentrifugação, seria apenas no tempo requerido para atingimento de equilíbrio [142].

Os resultados descritos acima justificam a escolha do sistema utilizado neste trabalho, pois este possibilita a obtenção de gradientes de concentração de solutos de massa molar baixa. A principal vantagem da associação de íons a moléculas de polieletrólitos, neste caso, é permitir a obtenção de gradientes mais acentuados de íons. Por exemplo, o gradiente de concentração de uma solução aquosa de albumina ( $\bar{M}_w = 67.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) centrifugada a 3000 rpm e  $4^\circ\text{C}$  em NaCl 0,1M é [142]:

$$\frac{d(\ln x)}{d(r^2)} = 0,036 \text{ cm}^{-2}$$

ou seja, 400 vezes maior que o gradiente esperado para NaCl e KCl em água. Para soluções contendo polieletrólitos e contra-íons deve-se esperar que uma fração dos íons seja transportada juntamente com a macromolécula e, portanto, origem gradientes mais acentuados de íons.

### III.3.1 - Concentração total de contra-íons.

As concentrações totais de sódio e potássio (contra-íons) utilizadas na diálise não foram muito superiores à concentração estequiométrica do contra-íon sódio, originalmente presente nos tres polieletrólitos estudados. Dextrana azul é um polissacarídeo que contém grupos cromóforos -SO<sub>3</sub>Na, ligados covalentemente à macromolécula. As quantidades originais de contra-íons presentes em soluções de dextrana azul e poli(estireno sulfonato de sódio) foram determinadas através de análise elementar. Para o ácido

poliacrílico esta quantidade foi obtida através da curva de titulação (seção III.2.4). Experimentos preliminares mostraram que a utilização de soluções de diálise muito concentradas em contra-íons não permitiam a obtenção de gradientes de concentração de íons, mensuráveis. Foi observado, por exemplo, que aumentando-se 10 vezes a concentração de contra-íons na solução de diálise em relação ao que foi descrito nesta tese, os gradientes de concentração de íons em soluções de azul de dextrana eram praticamente nulos.

### III.3.2 - Efeito das variáveis

Em todos os experimentos o efeito do tempo de centrifugação foi positivo. Este resultado é concordante com o que seria esperado pois tempos de centrifugação menores estão mais distantes do gradiente de equilíbrio de sedimentação que tempos mais longos. Os gradientes obtidos são, portanto, mais acentuados à medida que se aumenta o tempo de centrifugação.

A velocidade de sedimentação de um dado polieletrólito é, portanto, influenciada pelos seguintes fatores: i) concentração de polieletrólito; ii) massa molar e iii) concentração de íons presentes na solução.

Aumentando-se a concentração de polieletrólito, os gradientes de concentração do polímero diminuem devido ao aumento da viscosidade da solução. O valor negativo obtido para este efeito indica este resultado. O mesmo resultado também foi observado para os gradientes de contra-íons, em soluções de dextrana azul e poli(estireno sulfonato de sódio e potássio). Isto seria também esperado uma vez que mudanças na velocidade de sedimentação de polieletrólito devem ser acompanhadas pelos contra-íons.

O efeito da massa molar de polieletrólito pode ser observado comparando-se os valores dos gradientes das tabelas 14, 15 e 16. Apesar das condições experimentais não serem as mesmas nos 3 casos, é nítida a diferença entre os valores dos gradientes de concentração de polieletrólito. Azul de dextrana, por apresentar massa molar maior, é o polieletrólito que apresenta os maiores gradientes. O mesmo não poderia ser estendido aos gradientes de íons, uma vez que este polieletrólito apresenta a menor densidade de carga.

O efeito da concentração total de contra-íons sobre os gradientes de concentração de polieletrólitos foi positivo nos tres casos. Este resultado seria também esperado pois o aumento da quantidade de íons presentes em soluções com pequena quantidade inicial de íons é acompanhado por alterações conformacionais da macromolécula. Assim, as macromoléculas se tornam mais compactamente enoveladas e sedimentam com maior velocidade.

O efeito da concentração de contra-íons sobre os gradientes de concentração de íons foi negativo no caso da dextrana azul e foi positivo no caso do poli(estireno sulfonato de sódio e potássio).

### III.3.3 - Fracionamento de íons

O fracionamento de íons sódio e potássio obtido em experimentos de osmocentrifugação pode ser justificado segundo os seguintes dados: (i) a velocidade de sedimentação de moléculas de polieletrólito é maior que a de íons devido a sua maior massa molar; (ii) apenas uma fração do número estequiométrico de contra-íons se encontra fixa à cadeia de polieletrólito; (iii) durante a sedimentação de polieletrólitos e seus contra-íons ocorre separação de cargas, criando um dado potencial de sedimentação; (iv) a mobilidade (ou

difusão) de íons potássio é cerca de 50% maior que a de íons sódio [143]. Estes dados reunidos justificam os resultados experimentais que mostram gradientes de concentração mais acentuados para íons potássio do que para íons sódio segundo argumentos dados a seguir.

A separação de cargas durante a sedimentação resulta em um excesso de cargas negativas, no fundo da cela, e excesso positivo no topo. A maior mobilidade de íons potássio que de íons sódio favorece a migração mais rápida destes para o fundo da cela. A neutralização pode também ser obtida por migração dos íons através da membrana, ou seja, através do equilíbrio Donnan. Da mesma forma, a maior mobilidade de íons potássio favorece a maior concentração dos mesmos no fundo da cela. Além disso, existem evidências experimentais de que a afinidade de grupos sulfonatos (neste caso, dextrana azul e poli(estireno sulfonato de sódio)) é maior para íons potássio do que para íons sódio [116], o que também justifica os resultados obtidos. Ao contrário do que é observado para grupos sulfonatos, poliacrilatos apresentam grupos carboxílicos que possuem maior afinidade por íons sódio. Neste caso, os gradientes de concentração de íons sódio e potássio não são significativamente diferentes.

Concluindo, poli(estireno sulfonatos) e dextrana azul mostraram-se úteis no fracionamento de íons sódio e potássio em osmocentrifugação. De acordo com os resultados experimentais, pode ainda haver uma futura otimização dos fatores de separação.

### III.3.4 - Implicações deste trabalho

O fracionamento de solutos que apresentam pequena diferença de massa molar é bastante desejável. Separação isotópica, por exemplo, pode ser conduzida em fase gasosa e em centrífugas de alta

velocidade de rotação. Este tipo de fracionamento não pode ser feito em solução, uma vez que os coeficientes de sedimentação de solutos de baixa massa molar são muito pequenos. Além disso, o tempo de atingimento do equilíbrio de sedimentação é dependente da altura da cela. No caso de íons ou micro-moléculas em solução, não há aproximação significativa ao equilíbrio de sedimentação, em colunas com poucos centímetros de altura, senão em tempos de ordem de grandeza de vários dias. Estes fatores impediram, até aqui, a separação de substâncias de pequena massa molar através de centrifugação em fase líquida.

Este trabalho demonstra um método de fracionamento de solutos de baixa massa molar, que pode ser realizado em solução e em centrífugas de baixa velocidade.

### III.4 - Apêndice - Lista de Símbolos

- $A$  - distância média entre duas projeções de grupos carregados sobre o eixo da cadeia.
- $a$  - raio do cilindro que envolve a macromolécula.
- $a$  - expoente da equação de Staudinger-Mark-Houwink.
- $a_i$  - raio da partícula  $i$ .
- $B$  - parâmetro de interação.
- $C^*$  - concentração crítica de polieletrólito na presença de excesso de sal (grama por unidade de volume)
- $C_{m,o}^*$ ;  $C_m^*$ ;  $C_m^{**}$  - concentrações críticas de polietrólitos na ausência de sal.
- $\Delta C$  - diferença de concentração entre a fração do fundo e a do topo da cela
- $C_m$  - concentração média.
- $c_p$  - concentração de polímero ou polietrólito.
- $c^-$  - concentração do contra-íon.
- $c^+$  - concentração do co-íon.
- $f_p$  - coeficiente de atrito.
- $f_p^0$  - coeficiente de atrito intrínseco.
- $f_p^+$  - coeficiente de atrito médio.
- $h$  - comprimento da unidade monomérica.
- $K_H$  - constante de Huggins.
- $K_0$  - função de Bessel de ordem zero.
- $K_\eta$  - constante da equação de Staudinger-Mark-Houwink.
- $K_\theta$  - constante de dimensões não perturbadas da macromolécula.
- $k$  - constante de Boltzmann.

- $L$  - comprimento de persistência.  
 $L_e$  - comprimento de persistência eletrostático.  
 $L_p$  - comprimento de persistência intrínseco.  
 $L_t$  - comprimento de persistência total.  
 $l$  - comprimento do cilindro que envolve a macromolécula.  
 $M$  - massa molar do polímero ou polieletrólito.  
 $\bar{M}$  - massa molar corrigida.  
 $M_m$  - massa molecular da unidade monomérica.  
 $\bar{M}_w$  - massa molar média em peso.  
 $m_i$  - massa da partícula  $i$ .  
 $N_{AV}$  - número de unidades monoméricas por macromolécula.  
 $N_m$  - número total de macromoléculas.  
 $Q$  - comprimento de Bjerrum.  
 $q$  - valor da carga elementar  
 $R$  - raio externo do cilindro.  
 $R_f$  - raio de Flory.  
 $r$  - distância ao eixo de rotação.  
 $S_p$  - coeficiente de sedimentação aparente.  
 $S_p^0$  - coeficiente de sedimentação intrínseco.  
 $s^-$  - coeficiente de sedimentação do co-íon.  
 $s^+$  - coeficiente de sedimentação do contra-íon.  
 $\langle s^2 \rangle^{1/2}$  - média quadrática do raio de giração.  
 $T$  - temperatura.  
 $t$  - tempo.  
 $V$  - volume.  
 $V_m$  - volume total da cela cilíndrica.  
 $v_m$  - volume ocupado pela macromolécula.  
 $\bar{v}_m$  - volume específico parcial.

- $x_i$  - fração molar do componente  $i$ .  
 $x_v$  - fração do volume ocupado pela macromolécula.  
 $z$  - número de cargas elementares.  
 $z+$  - carga efetiva.  
 $\epsilon$  - permissividade relativa do meio.  
 $\epsilon_0$  - permissividade absoluta do vácuo.  
 $\sigma_m$  - densidade de carga.  
 $\eta$  - viscosidade da solução.  
 $\eta_s$  - viscosidade do solvente.  
 $\frac{\eta_{sp}}{c}$  - viscosidade reduzida de uma solução macromolecular.  
 $[\eta]$  - viscosidade intrínseca.  
 $[\eta]_e$  - viscosidade intrínseca na condição  $e$ .  
 $\chi$  - fator de recobrimento.  
 $\lambda$  - parâmetro de densidade de carga.  
 $\lambda+$  - parâmetro de densidade de carga efetiva.  
 $\Phi$  - constante de Flory.  
 $K$  - constante de recobrimento de Debye-Hückel.  
 $\rho$  - densidade.  
 $\rho_c$  - número de contra-íons por unidade de volume.  
 $\rho_k$  - número de íons por unidade de volume.  
 $\rho_m$  - número de moléculas por unidade de volume.  
 $\rho_s$  - número de moléculas de sal por unidade de volume.  
 $\Psi$  - potencial eletrostático.  
 $\bar{\Psi}$  - potencial eletrostático reduzido.  
 $\bar{\Psi}_m$  - potencial eletrostático reduzido de Manning.  
 $\delta\Psi$  - diferença de potencial eletrostático.  
 $\omega$  - velocidade angular do rotor.

## CONCLUSÃO

A aplicação de processos de membrana como alternativa prática de processos de concentração, purificação e fracionamento depende da disponibilidade de membranas adequadas e de controle de transporte de massa no processo. Neste sentido, este trabalho contribuiu nos seguintes aspectos:

É possível obter membranas de polisulfona -poli(vinilpirrolidona) com características úteis para uso em ultrafiltração de diferentes tipos de soluções macromoleculares, controlando-se a permeabilidade por fatores tais como a composição e a massa molar de poli(vinilpirrolidona).

A separação de misturas de proteínas, que tem se mostrado insatisfatória por métodos usuais de membrana, foi obtida com sucesso por ultrafiltração em múltiplo estágio.

É possível fracionar íons de metais alcalinos por osmocentrifugação de soluções de polieletrólitos. Este resultado permite prever a extensão da osmocentrifugação ao fracionamento de outros íons e moléculas, e à separação isotópica.

V - Bibliografia

- [1] - STRATHMANN, H.. Membrane separation processes. Journal of Membrane Science, 9: 121-189, 1981.
- [2] - LONSDALE, H. K.. The growth of membrane technology. Journal of Membrane Science, 10: 81-181, 1982.
- [3] - PUSCH, W. & WALCH, A.. Membrane structure and its correlation with membrane permeability. Desalination, 35: 5, 1980.
- [4] - PUSCH, W. & WALCH, A.. Synthetic membranes-preparation, structure and application, Angewandte Chemie, 21: 660, 1982.
- [5] - PUSCH, W. & WALCH, A.. Synthetic membranes: state of the art, Journal of Membrane Science, 10: 325, 1982.
- [6] - CABASSO, I.. Membranes. In: KROSCWITZ, J. I. (editor) Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. John Wiley & Sons, Inc. USA., v.9, 1987, p. 509-579.
- [7] - FROMMER, M. A. & LANCET, D.. The mechanism of membrane formation: membrane structures and their relation to preparation conditions. In: LONSDALE, H. K. AND PONDALL, H. E. (editores). Reverse Osmosis Membrane Research. Plenum Press, N.Y., 1972, p. 85-110.
- [8] - SAIER, H. D. & STRATHMANN, H.. Assymetric membranes:

- preparation and applications. Angewandte Chemie, 14: 452, 1975.
- [9] - WIJMANS, J. G., BAAIJ, J. P. B. & SMOLDERS, C. A. The mechanism of formation of microporous or skinned membranes produced by immersion precipitation. Journal of Membrane Science, 14: 263, 1983.
- [10] - STRATHMANN, H. & KOCK, K.. The formation mechanism of phase inversion membranes. Desalination, 21: 241, 1977.
- [11] - STRATHMANN, H.. Preparation of microporous membranes by phase inversion processes. In: DRIOLI, E. & NAKAGAKI, M. (editores). Membrane and Membrane Processes. Plenum Press, New York, 1986. p.115-135.
- [12] - CABASSO, I. & TAMVAKIS, A. P.. Composite hollow fiber membranes. Journal of Applied Polymer Science, 23: 1509-1525, 1979.
- [13] - CABASSO, I.. Practical aspects in the development of a polymer matrix for ultrafiltration. In: COOPER A. (editor). Ultrafiltration Membranes and Applications. Plenum Publishing Corp., New York, v.13. 1980. p.57-78.
- [14] - PAUL, D. R.. Background and perspective. In: PAUL, D. R. & NEWMAN, S. (editores). Polymer Blends. Academic Press, New York, 1978.
- [15] - BERNSTEIN, R. E. et alii. LCST behavior in polymer blends. Macromolecules, 10: 681-686, 1977.

- [16] - CABASSO, I. et alli. Polysulfone hollow fibers. I. Spinning and Properties. Journal of Applied Polymer Science, 20: 2377-2394, 1976.
- [17] - CABASSO, I. et alli. Polysulfone hollow fibers. II. Morphology. Journal of Applied Polymer Science, 21: 165-180, 1977.
- [18] - GONÇALVES, M. C.. Ultrafiltration membranes prepared from PSf-PVP blends, Technical Reports Group Training Course in Chemical Technology Research, JICA, 1985, p.47-74.
- [19] - WIJMANS, J. G. et alli. Phase separation phenomena in solutions of polysulfone in mixtures of a solvent and a nonsolvent: relationship with membrane formation. Polymer, 26: 1539-1545, 1985.
- [20] - MATSUDA, M. & KAMIZAWA, C.. Precise measurement of membrane constants of cellulose acetate membranes by direct osmosis tests. Desalination, 49: 367-378, 1984.
- [21] - NEEL, J. et alli. Characterization of ultrafiltration membranes. Part II - Mass transport measurements for low and high molecular weight synthetic polymers in water solutions. Journal of Membrane Science, 7: 141-155, 1980.
- [22] - NGUYEN, Q. T. & NEEL, J.. Characterization of ultrafiltration membranes. Part IV - Influence of the deformation of macromolecular solutes on the transport to ultrafiltration membranes. Journal of Membrane Science, 14: 111-128, 1983.

- [23] - NOBREGA, R. et alii. Transfer of dextran through ultrafiltration membranes: A study of rejection data analysed by gel permeation chromatography, Journal of Membrane Science, 45: 1989.
- [24] - SAWYER, L. C. & GRUBB, D. T.. Polymer Microscopy. Chapman and Hall. London. Cap.4. 1987. p.75-146.
- [25] - TWEDDLE, T. A. et alii. Polysulfone hollow fibers. I. Spinning and properties. Journal of Applied Polymer Science, 20: 2377-2394, 1976.
- [26] - MCGREGOR, W. C.. Selection and use of ultrafiltration membranes. In: MCGREGOR, W. C. (editor). Membrane Separations in Biotechnology, Marcel Dekker, N.Y., 1986. p. 1-36.
- [27] - STRATHMANN, H. et alii. A rationale for the preparation of Loeb-Sourirajan-type cellulose acetate membranes. Journal of Applied Polymer Science, 15: 811-828, 1971.
- [28] - WIJMANS, J. G. et alii. The mechanism of formation of microporous or skinned membranes produced by immersion precipitation. Journal of Membrane Science, 14: 263-274, 1983.
- [29] - FRIEDRICH, G. et alii. Asymmetric reverse osmosis and ultrafiltration membranes prepared from sulfonated polysulfone. Desalination, 36: 39-62, 1981.

- [30] - GUILLOTIN, M. et alii. Physicochemical processes occurring during the formation of cellulose diacetate membranes. Research of criteria for optimizing membrane performance. Desalination, 21: 165-181, 1977.
- [31] - CABASSO, I. et alii. Porosity and pore size determination in polysulfone hollow fibers. Journal of Applied Polymer Science, 21: 1883-1900, 1977.
- [32] - ROESINK, H. D. W.. Microfiltration, membrane development and module design. Tese de Doutorado. Universidade de Twente, Holanda, 1989.
- [33] - GRACE, H. P.. Structure and performance of filter media. AIChE Journal, 2: 307-315, 1956.
- [34] - MITRA, G. & PAUL, N. G. K. Practice of ultrafiltration - diafiltration in the plasma fractionation industry. In: MCGREGOR, W.C. (editor). Membrane Separations in Biotechnology. New York, Marcel Dekker, 1986. p.115-132.
- [35] - COONEY, J. M.. Biotechnology, 2: 41, 1984. Apud:CARLSON, A.. Factors influencing the use of aqueous two-phase partition for protein purification. Separation Science and Technology, 23 (8-9): 785-817, 1988.
- [36] - CREIGHTON, T. E.. Proteins. In: KROSCWITZ, J.I. (editor). Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. New York, Wiley-Interscience Publication, 1988. v.13, p.615-620.

- [37] - BARNES, G. & FRIEDEN, E.. Separation of albumin, ceruloplasmin, and transferrin from human plasma. Journal of Chemical Education. 59 (10): 873-874, 1982.
- [38] - JUN, S. H. & RUCKENSTEIN, E.. Separation of multicomponent mixture of proteins by potential barrier chromatography. Separation Science and Technology. 21 (2): 111-138, 1986.
- [39] - SVENSSON, H. et alii. Zone electrophoresis in a density gradient. Stability conditions and separation of serum proteins. Science Tools LKB Instruments Journal. 4(1): 1-10, 1957.
- [40] - RADOVICH, J. M. et alii. Coupling electrophoresis with ultrafiltration to improved processing of plasma proteins. Separation Science and Technology, 15 (8): 1491-1498, 1980.
- [41] - WILCOX, H. G. & HEMBERG, M.. The isolation of human serum lipoproteins by zonal ultracentrifugation. Biochimica et Biophysica Acta. 152: 424-426, 1968.
- [42] - TERPSTRA, A. H. M. et alii. Improved Techniques for the separation of serum proteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by restaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. Analytical Biochemistry. 111: 149-157, 1981.
- [43] - ADAMS, G. H. & SCHUMAKER, V. N.. Analytical equilibrium density gradient ultracentrifugation of human plasma lipoproteins. Nature. 202: 490-491, 1964.

- [44] - CARLSON, A. Factors influencing the use of aqueous two-phase partition for protein purification. Separation Science and Technology. 23 (8-9): 785-817, 1988.
- [45] - SOBER, H. A. et alii. Fractionation of proteins. In: NEURATH, H. & Hill, R. L. (editores). The Proteins. New York, Academic Press, 2<sup>a</sup>. ed., 1965. v.3, cap.12, p.1-91.
- [46] - COHN, E. J. et alii. Preparation and properties of serum and plasma proteins IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components, of biological tissues and fluids. Journal of American Chemical Society. 68: 459-475, 1946.
- [47] - FRIEDLI, H. & KISTLER, P.. Removal of ethanol from albumin by gel filtration in the manufacturing of human serum albumin solutions for clinical use. Chimia. 26 (1): 25-27, 1972.
- [48] - BING, D. H. et alii. Blood plasma processing by electro dialysis. In: MCGREGOR, W.C. (editor). Membrane Separations in biotechnology. New York, Marcel Dekker, 1986. p.135-157.
- [49] - SCHMITTHAVESLER, R.. Molecular filtration in human plasma fractionation. Process Biochemistry. 12 (8): 13-17, 1977.
- [50] - Gel filtration theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Rahms i Lund, 1979.
- [51] - PORTER, M. C.. Membrane filtration. In: SCHWEITZER, P.A. (editor). Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers.

New York, McGraw-Hill, 1979, Cap.2, p.3-103.

[52] - PORTER, M. G. & NELSON, L.. Ultrafiltration in the chemical, food processing, pharmaceutical and medical industries. In: LI, N. N. (editor). Recent Developments in Separation Science. Cleveland, Chemical Rubber, 1975, v.2, p.227-267.

[53] - THIJSEN, H. A. G.. Fundamentals of concentration processes. In: SPICER, A. (editor). Advances in Preconcentration and Dehydration of Foods. London Applied Science Publishers Ltd., 1974, p.13-45.

[54] - KOSIKOWSKI, F. W.. Membrane separations in food processing. In: MCGREGOR, W.C. (editor). Membrane Separation in Biotechnology. New York, Marcel Dekker, 1986, p.201-246.

[55] - KAMALESH, S. K. & PRASAD, R.. Protein ultrafiltration: some neglected considerations. In: MCGREGOR, W.C. (editor). Membrane Separations in Biotechnology. New York, Marcel Dekker, 1986, p.37-60.

[56] - REIHANIAN, H. et alii. Mechanisms of polarization and fouling of ultrafiltration membranes by proteins. Journal of Membrane Science. 16: 237-258, 1983.

[57] - FANE, A. G. et alii. Ultrafiltration of protein solutions through partially permeable membranes - the effect of adsorption and solution environment. Journal of Membrane Science. 16: 211-224, 1983.

- [58] - MATSUURA, T. & SOURIRAJAN, S.. Physicochemical and Engineering properties of food in reverse osmosis and ultrafiltration. In: RAO, M. A. & RIZVI, S. S. H. (editores). Engineering Properties of Foods. New York, Marcel Dekker, Inc., 1986, p.255-320.
- [59] - BLATT, W. F. et alii. Solute polarization and cake formation in membrane ultrafiltration. In: FLINN, J. E. (editor). Membrane Science and Technology. New York, Plenum Press, 2<sup>a</sup>. ed., 1973. p.47-97.
- [60] - TRETIN, D. R. & DOSHI, M. R.. Ultrafiltration in an unstirred bath cell. Industrial Engineering and Chemical Fundamentals. 19: 189-191, 1980.
- [61] - HARRIS, J. L.. Influence of gel layer rheology on ultrafiltration flux of wheat starch effluent. Journal of Membrane Science. 29: 97-109, 1986.
- [62] - KOZINSKI, A. A. & LIGHTFOOT, E. N.. Proteins ultrafiltration: a general example of boundary layer filtration. AIChE Journal. 18 (15): 1030-1040, 1972.
- [63] - VILKER, V. L. et alii. Concentration polarization in protein ultrafiltration. AIChE Journal. 27 (4): 632-645, 1981.
- [64] - VILKER, V. L. et alii. The osmotic pressure of concentrated protein solutions: effect of concentration and pH in saline solutions of bovine serum albumin. Journal of Colloid and Interface Science. 79 (2): 548-566, 1981.

- [65] - VILKER, V. L. et alii. The osmotic pressure of concentrated protein and lipoprotein solutions and its significance to ultrafiltration. Journal of Membrane Science. 20: 63-77, 1984.
- [66] - KOZINSKI, A. A. & LIGHTFOOT, E. N. Ultrafiltration of proteins in stagnation flow. AIChE Journal. 17 (1): 81-85, 1971.
- [67] - HANEMAAIJER, J. H. et alii. Characterization of clean and fouled ultrafiltration membranes. Desalination. 68: 93-108, 1988.
- [68] - PRAKASH, S. & GADDIS, J. L. An exponential transformation to assist in solution of polarization boundary layers in membrane separations. Computation in Chemical Engineering, 12 (4): 345-349, 1988.
- [69] - ROBERTSON, B. C. et alii. A Stefan-Maxwell analysis of protein transport in porous membranes. Separation Science and Technology. 23: 1799-1811, 1988.
- [70] - WIJMANS, J. C. et alii. Hydrodynamic resistance of concentration polarization boundary layer in ultrafiltration. Journal of Membrane Science. 22: 117-135, 1985.
- [71] - GOLDSMITH, R. L. Macromolecular ultrafiltration with microporous membranes. Industrial Engineering and Chemical Fundamentals. 10 (1): 113-120, 1971.
- [72] - CHARM, S. E. & LAI, C. J. Comparison of ultrafiltration systems for concentration of biologicals. Biotechnology

Bioengineering. 13: 185-202, 1971.

- [73] - BRESLAU, B. R. et alii. Hollow fiber ultrafiltration - a systems approach for process water and by-product recovery. Chemical Engineering Progress. 71 (12): 74-80, 1975.
- [74] - DILLMAN, W. J. & MILLER, I. F.. On the adsorption of serum proteins on polymer membrane surfaces. Journal of Colloid and Interface Science. 44 (2): 221-241, 1973.
- [75] - ROBERTSON, B. C. et alii. A Stefan-Maxwell analysis of protein transport in porous membranes. Separation Science and Technology. 23 (12-13): 1799-1811, 1988.
- [76] - FANE, A. G. et alii. The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes. Journal of Membrane Science. 29: 97-109, 1986.
- [77] - SUKI, A. et alii. Flux decline in protein ultrafiltration. Journal of Membrane Science. 21: 269-283, 1984.
- [78] - NUNES, S. P. et alii. A new centrifugal ultrafiltration device. Separation Science and Technology. 21: 823-830, 1986.
- [79] - GONÇALVES, M. C. & GALEMBECK, F.. Serum protein fractionation by membrane processes: centrifugal ultrafiltration, osmosedimentation and multistage ultrafiltration. Separation Science and Technology. 24: 303-316, 1989.

- [80] - GALEMBECK, F. et alii. Rapid sedimentation under gravity. Basic theory and experimental demonstration. Journal of Physical Chemistry, 84 (1): 112-119, 1980.
- [81] - GALEMBECK, F. et alii. Transport in osmotically coupled systems. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 51: 173, 1979.
- [82] - GALEMBECK, F. et alii. Approach to sedimentation Equilibrium. A comparison between osmotically coupled and uncoupled systems, based on free-energy dissipation rates. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 53 (1): 25, 1981
- [83] - GALEMBECK, F. et alii. Osmotic coupling: the key to faster mass transport experiments. In: MITTAL & FENDLER. Solution Behaviour of Surfactants. Plenum Publishers, New York. v.2, 1982, p. 1465-1475.
- [84] - BUDD, P. M. Sedimentation and diffusion. In: ALLEN, G. (editor). Comprehensive Polymer Science. Oxford, Pergamon Press. cap.10, 1989, p. 199-214.
- [85] - NUNES, S. P. & GALEMBECK, F.. Osmosedimentation: a study using the linear approximation of non-equilibrium thermodynamics. Journal of Irreversible Thermodynamics, 12: 205-212, 1987.
- [86] - NUNES, S. P. & GALEMBECK, F.. Preparation and characterization of cellulose acetate membranes for osmosedimentation. Journal of Polymer Science: Polymer Letter Edition, 21: 49-55, 1983.

- [87] - NUNES, S. P. et alii. Cellulose acetate membranes for osmosedimentation: performance and morphological dependence on preparation conditions. Polymer, 27: 937-943, 1986.
- [88] - SMITH, M. H.. Molecular weights of proteins and some other materials, including sedimentation, diffusion and frictional coefficients and partial specific volumes. In: SOBER, H.A (editor). Handbook of Biochemistry. 2nd. Edition, The Chemical Rubber Co. Cleveland, 1970.
- [89] - VAN OSS, G. J. & BRONSON, P. M.. Separation of blood serum proteins by ultrafiltration. In: FLINN, J.E. (editor). Membrane Science and Technology, New York, Plenum Press. 1970 p. 139-149.
- [90] - PUTNAM, F. W.. Structure and function of the plasma proteins. In: PUTNAM, F.W. (editor) The Plasma Proteins. New York, Academic Press, 2nd. ed., 1975. v.1, p.20-29.
- [91] - Especificações Técnicas. Cutilab, Materiais para Cultura de Células. Campinas, 1986.
- [92] - MAZID, A. M.. Separation and fractionation of macromolecular solutions by ultrafiltration. Separation Science and Technology. 23 (14-15): 2191-2210, 1988.
- [93] - MICHAELS, A. S.. Fifteen years of ultrafiltration: problems and future promises of an adolescent technology. In: COOPER, A.R. (editor). Ultrafiltration Membranes and Applications. New York, Plenum Press. 1980, p.1-19.

- [94] - LEE, D. N. & MERSON, R. L.. Prefiltration of Cottage cheese whey to reduce fouling of UF membranes. Journal of Food Science, 41: 403-410, 1976.
- [95] - FANE, A. G. et alii. The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes. Journal of Membrane Science, 16: 195-210, 1983.
- [96] - THATHNING, B. & JORGE, G.. Densimetric detection in gel permeation chromatography. Journal of Chromatography, 241: 147-158, 1982.
- [97] - MORAWETZ, H.. Macromolecules in Solution. New York, Wiley-Interscience, 2nd ed., 1975, p.344-396.
- [98] - BREUER, M. M.. Polyelectrolytes. In: JENKINS, A.D. (editor). Polymer Science North Holland Publishing Company. 1972, p.1136-1185.
- [99] - HANSEN, C. M.. The universality of the solubility parameter. I&EC Product Research and Development, 8 (1): 2-11, 1969.
- [100] - MANDEL, M. Polyelectrolytes. In: KROSCWITZ, J. (editor). Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. John Wiley & Sons. USA. 1988, p.739-829.
- [101] - PEDERSEN, J. K.. Pectins. In: DAVIDSON, R. L. (editor). Handbook of Water-Soluble Gums and Resins. New York, McGraw-Hill, 1980, Cap. 15, p.1-21.

- [102] - GROWAL, A.. Dextran and its use in colloidal infusion solutions. Academic Press. New York. 1957, p.156.
- [103] - FLODIN, P.. Dextran gels and their applications in gel filtration. Meijels Boldindustri, Halmstad, Uppsala, 1962, p.85-156.
- [104] - STANNETT, V. T. et alii. Recent advances in membrane science and technology. Advances in Polymer Science, 32: 71-121, 1979.
- [105] - MANDEL, M.. Polyelectrolite solutions without added salt. Concentration effects and condensation. European Polymer Journal, 19: 911-918, 1983.
- [106] - ARMSTRONG, R. W. & STRAUSS, U. P.. Polyelectrolytes. In: BIKALES, N. M. (editor). Encyclopedia of Polymer Science and Technology. John Wiley and Sons, New York, 1969, p.781-861.
- [107] - OOSAWA, F. et alii. Theory of strong polyelectrolyte solutions I. Coiled macro ions. Journal of Polymer Science, 8: 93-111, 1954.
- [108] - OOSAWA, F.. A simple theory of thermodynamic properties of polyelectrolyte solutions. Journal of Polymer Science, 23: 421-430, 1957.
- [109] - KATCHALSKY, A. Polyelectrolytes. Pure and Applied Chemistry, 26: 327-373, 1971.

- [110] - MANNING, G. S.. Polyelectrolytes, Annual Review of Physical Chemistry, 23: 2543-2544, 1972.
- [111] - DE GENNES, P. G. et alii. Remarks on polyelectrolyte conformation. The Journal of Physique, 37: 1461-1473, 1976.
- [112] - GRAESSLEY, W. W.. The entanglement concept in polymer reology. Advances in Polymer Science, 16: 1-179, 1974.
- [113] - ODIJK, T.. Possible scaling relations for semidilute polyelectrolyte solutions. Macromolecules, 12: 688-692, 1979.
- [114] - ROOTS, J. & NYSTROM, B.. Sedimentation behaviour in semidilute solutions of polyelectrolyte. Polymer, 22: 573-575, 1981.
- [115] - NYSTROM, B. & ROOTS, J.. Scaling concepts in the interpretation of diffusion and sedimentation phenomena in semidilute polymer and polyelectrolyte solutions. Progress in Polymer Science, 8: 333-371, 1972.
- [116] - BEKTUROV, E. A. & BAKAUOVA, Z. K.. Synthetic Water Soluble Polymers in Solutions. Hüthig & Wepf, Basel, 1981.
- [117] - WALL, F. T. & BERKOWITZ, J.. Numerical solution of the Poisson-Boltzman equation for spherical polyelectrolyte molecules. Journal of Chemical Physics, 26: 114-122, 1957.
- [118] - VOYUTSKY, S.. Colloid Chemistry. Mir Publishers, Moscow. 1978, p.512-514.

- [119] - BUDD, P. M. Sedimentation behaviour in dilute solutions of a polyelectrolyte. Polymer, 26: 1519-1522, 1985.
- [120] - NODA, N. et alii. The intrinsic viscosity of polyelectrolytes. The Journal of Physical Chemistry, 74: 710-719, 1970.
- [121] - KITANO, T. et alii. Conformation of polyelectrolytes in aqueous solutions. Macromolecules, 13: 57-63, 1980.
- [122] - YEH, R. & ISIHARA, A. Intrinsic viscosity of polyelectrolytes in salt solutions. Journal of Polymer Science: Part A-2, 9: 373-375, 1971.
- [123] - DARKUS, R. L. et alii. Concentration dependence of the reduced viscosity of dilute aqueous polyelectrolyte solutions. Journal of Polymer Science, 3 (4): 1941-1948, 1965.
- [124] - WILLIAMS, J. W. & VAN HOLDE, K. E. The theory of sedimentation analysis. Chemical Reviews, 58: 715, 1958.
- [125] - VAN HOLDE, K. E. Physical Biochemistry, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1971.
- [126] - SHAW, D. J. Introduction to Surface and Colloid Chemistry. Butterworth, London, 1980.
- [127] - PEDERSEN, K. O. On charge and specific ion effects on sedimentation in the ultracentrifuge. Journal of Physical Chemistry,

62: 1282-1290, 1958.

[128] - RICE, S. & NAGASAWA, M. Polyelectrolytes. Academic Press New York, 1961.

[129] - ALEXANDROWICZ, Z. & DANIEL, E.. Sedimentation and diffusion of polyelectrolytes. Part I. Theoretical description. Biopolymers, 1: 447-471, 1963.

[130] - BUDD, P. M.. Determination of average molecular weights of a polyelectrolyte by meniscus - depletion sedimentation equilibrium. British Polymer Journal, 20: 33-37, 1988

[131] - VAROQUI, R. & SCHMITT, A.. Limiting sedimentation and diffusion coefficients of polyelectrolytes. The charge effect. Biopolymers, 11: 1119-1136, 1972.

[132] - SCHMITT, A. et alii. Phénomènes de transport dans les solutions de polyelectrolytes. Journal of Physique, 39 (6): 161-168, 1978.

[133] - NAGASAWA, M. & EGUCHI, Y.. The charge effect in sedimentation. I. Polyelectrolytes. Journal of Physical Chemistry, 71: 880-888, 1967.

[134] - STINGTER, D.. Ionic charge effects on the sedimentation of polyelectrolytes. Macromolecules, 18: 1619-1627, 1985.

[135] - DANIEL, E. & ALEXANDROWICZ, Z.. Sedimentation and diffusion

of polyelectrolytes. Part II. Experimental studies with poly-L-lysine hydrochlorides. Biopolymers, 1: 473-495, 1963.

[136] - MANNING, G. S.. The charge effect on transport in polyelectrolyte ternary solutions. A conjecture. Journal of Physical Chemistry, 84: 3331-3332, 1980.

[137] - KATO, M. et alii. Viscosimetric study on polystyrene sulfonic acid solutions. The Journal of Physical Chemistry, 58: 332-339, 1954.

[138] - WEILL, G. & DESCLOIZEAUX, J.. Dynamics of polymers in dilute solutions: an explanation of anomalous indices by cross-over effects. Le Journal de Physique, 40: 90-105, 1979.

[139] - PIRES, A. T. N.. Osmosedimentação, aplicação analítica e preparativa a soluções macromoleculares. Tese de Doutorado, 1984.

[140] - NUNES, S. P.. Osmocentrifugação e ultrafiltração centrífuga. Tese de Doutorado, 1985.

[141] - BOX, G. E. P. et alii. Statistics for Experiments. John Wiley & Sons, New York, 1978.

[142] - GALEMBECK, F. & PIRES, A. T. N.. Osmosedimentation methods: preparative and analytical applications. Separation and Purification Methods, 15 (2): 97-126, 1986.

[143] - ADAMSON, A. W.. A Textbook of Physical-Chemistry. Academic Press, New York, 1973. p. 506-509