

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

*...no base da osmossedimentação*

OSMOSEDIMENTAÇÃO: APLICAÇÃO ANALÍTICA E  
PREPARATIVA A SOLUÇÕES MACROMOLECULARES

ALFREDO TIBURCIO NUNES PIRES

Tese de Doutorado

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO GALEMBECK

CAMPINAS - 1984

*Verificar revista de acordo com as sugestões  
da Banca Examinadora  
Campinas 14 de junho de 1984  
Fernando Galembek*

À minha irmã

MARIA EMÍLIA

### AGRADECIMENTOS

Terminado este trabalho é imprescindível agradecer a todos que ajudaram para que seu objetivo fosse alcançado.

#### Agradeço

- ao Prof. Dr. Fernando Galembeck por sua contínua orientação e construtivas sugestões que contribuíram de maneira significativa ao bom desempenho desta Tese.
- ao Prof. Dr. Faruk Nome pelo estímulo para que eu desse continuidade a minha formação científica.
- ao colega Eduardo A. Pinheiro pela solícita colaboração nos experimentos de ultracentrifugação.
- ao Instituto de Química da Unicamp e ao Departamento de Química da UFSC.
- à CAPES/PICD pela bolsa concedida.
- aos colegas do Instituto de Química da Unicamp e muito especialmente aos amigos do grupo de pesquisa pelo excelente ambiente de trabalho e perfeito entrosamento que proporcionaram durante minha permanência em Campinas.

## ÍNDICE

|                                                                        | <u>Página</u> |
|------------------------------------------------------------------------|---------------|
| RESUMO .....                                                           | vi            |
| ABSTRACT .....                                                         | viii          |
| I. INTRODUÇÃO .....                                                    | 1             |
| 1.1. Soluções de macromoléculas .....                                  | 1             |
| 1.2. Peso Molecular de macromoléculas .....                            | 9             |
| 1.3. Dextranas .....                                                   | 11            |
| 1.4. Sedimentação e difusão de macrossolutos .....                     | 14            |
| 1.5. Ultracentrifugação .....                                          | 19            |
| 1.6. Osmometria e viscosimetria .....                                  | 22            |
| 1.7. Osmossedimentação e osmocentrifugação .....                       | 25            |
| 1.8. Objetivos .....                                                   | 28            |
| II. PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS .....                              | 29            |
| 2.1. Materiais e equipamentos .....                                    | 29            |
| 2.2. Preparação de membranas assimétricas de acetato de celulose ..... | 30            |
| 2.3. Diálise em fluxo e em centrífuga a baixa velocidade .....         | 31            |
| 2.4. Determinação do volume específico parcial da dextrana .....       | 34            |
| 2.5. Experimentos de osmosedimentação .....                            | 35            |
| 2.5.1. Metodologia .....                                               | 35            |
| 2.5.2. Alcance do equilíbrio de difusão-sedimentação .....             | 39            |
| 2.5.3. Determinação de $\bar{M}_w$ , $A_2$ e $\chi$ .....              | 44            |
| 2.5.3.1. Dextrana T 500 .....                                          | 44            |
| 2.5.3.2. Tiroglobulina .....                                           | 53            |

|                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.5.3.3. Dextrana ICN Pharmaceuticals...                                             | 55  |
| 2.5.3.4. Dextrana D-5376 .....                                                       | 57  |
| 2.6. Medidas viscosimétricas .....                                                   | 68  |
| 2.7. Titulação turbidimétrica .....                                                  | 71  |
| 2.8. Ultracentrifugação .....                                                        | 72  |
| 2.8.1. Metodologia .....                                                             | 72  |
| 2.8.2. Determinação do coeficiente de <u>se</u><br>dimentação de albumina bovina ... | 73  |
| 2.8.3. Determinação do coeficiente de <u>se</u><br>dimentação de dextrana .....      | 76  |
| 2.8.4. Determinação do coeficiente de <u>di</u><br>fusão de dextrana .....           | 76  |
| 2.9. Fracionamento de dextrana por osmossedimentação .....                           | 85  |
| 2.10. Osmocentrifugação .....                                                        | 91  |
| 2.10.1. Metodologia .....                                                            | 91  |
| 2.10.2. Osmocentrifugação de dextrana ..                                             | 93  |
| 2.10.3. Osmocentrifugação de uma mistura<br>de dextrana e dextrana azul ....         | 97  |
| III. DISCUSSÃO .....                                                                 | 100 |
| IV. CONCLUSÕES .....                                                                 | 118 |
| V. REFERÊNCIAS .....                                                                 | 120 |

## RESUMO

A sedimentação de macromoléculas em solução, sob gravidade, é um processo extremamente lento, impossibilitando a determinação de parâmetros importantes que caracterizam o sistema no estado de equilíbrio de sedimentação-difusão.

Este trabalho propõe um método analítico e preparativo - a osmossedimentação - baseado no efeito de aceleração da sedimentação de macromoléculas em solução, observado quando se permite um acoplamento osmótico ao sistema, isto é, quando a solução em estudo é colocada em contato com o respectivo solvente através de uma membrana semipermeável.

Assim, demonstrou-se o alcance do equilíbrio de sedimentação-difusão de dextrana T 500 ( $\bar{M}_w = 5 \times 10^5$ ) e dextrana D 5376 ( $\bar{M}_w = 2 \times 10^6$ ) em tempo muito curto (10 horas) comparado com o necessário para sedimentação não acoplada (53 anos). Parâmetros físico-químicos determinados a partir de gradientes de concentração no equilíbrio, tais como peso molecular de dextrana e tíroglobulina, foram compatíveis com valores conhecidos na literatura e/ou obtidos por métodos convencionais, comprovando a eficiência da osmossedimentação como método analítico. O mesmo método permitiu a determinação de temperatura  $\theta$ , parâmetro de Flory-Huggins ( $\chi$ ) e coeficiente de virial ( $A_2$ ) a várias temperaturas para diferentes amostras de dextrana.

A aplicação preparativa da osmossedimentação foi investigada, concentrando-se soluções de dextrana D 5376 a 2000 rpm. Por exemplo, centrifugou-se uma solução 0,85% de dextrana durante 8 horas, acumulando-se 63% da dextrana em solução na quinta parte inferior da célula de osmossedimentação, enquanto que somente 20%

da dextrana se localizaram na quinta parte inferior da célula não osmoticamente acoplada.

O fracionamento de dextrana polidispersa foi estudado em células de 1 metro de altura, sob gravidade, com um volume de solução de 1,2 l. Com a análise dos valores de  $\bar{M}_w$  correspondentes a cada uma das oito frações retiradas da célula observou-se uma variação de peso molecular entre  $0,7 \times 10^6$  e  $2,1 \times 10^6$  do topo ao fundo da célula, mostrando a viabilidade do fracionamento de macrossolutos por osmossedimentação.

ABSTRACT

The sedimentation of macromolecules under gravity is extremely slow, which makes impossible the attainment of sedimentation-diffusion equilibrium and the determination of important parameters of a system.

This work describes an analytical and preparative method - osmosedimentation - based on the acceleration of macromolecules sedimentation, observed when the system is osmotically coupled, i.e., when the macromolecular solution is in contact with the respective solvent through a semipermeable membrane.

The attainment of sedimentation-diffusion equilibrium, under gravity, was demonstrated for two dextran samples (T 500 -  $\bar{M}_w = 5 \times 10^5$ , D 5376 -  $\bar{M}_w = 2 \times 10^6$ ), in a very short time (10 hours). For the corresponding non-coupled system, the estimated time needed is 53 years. Physical-chemical parameters such as dextran and thyroglobulin molecular weights, determined from equilibrium concentration gradients were in agreement with known values from the literature and/or with those obtained by conventional methods. These results confirm the osmosedimentation effectiveness as an analytical method. The same method also allowed the determination of the  $\theta$  temperature, the Flory-Huggins parameter ( $\chi$ ) and the virial coefficient ( $A_2$ ) at several temperatures, for different dextran samples.

The preparative applicability of osmosedimentation was investigated by concentrating dextran D 5376 solutions at 2000 rpm. For example, after centrifuging for 8 hours a 0,85% (w/v) dextran solution, 63% of the dextran in solution were accumulated in the lower fifth of the osmosedimentation cell, whereas only 20% were found

in the lower fifth of the non-coupled cell (standard centrifugation).

The polydisperse dextran fractionation was studied in a one-meter tall, 1.2-liter capacity cell. Eight fractions were drawn and, by analysing the  $\bar{M}_w$  values of each sample, a molecular weight variation of  $0.7 \times 10^6$  to  $2.1 \times 10^6$ , from the cell top to cell bottom was observed, showing the viability of macrosolute fractionation by osmosedimentation.

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. Soluções de Macromoléculas

O estudo de macromoléculas em solução apresenta grande interesse do ponto de vista prático, devido a possibilidade de obtenção, em solução, de parâmetros que as caracterizam e cuja determinação é dificultada no estado sólido. Por exemplo, a determinação do peso molecular de proteínas globulares em forma cristalina pode ser feita por cristalografia de raio X. Entretanto esta alternativa de determinação do peso molecular é de interesse exclusivamente acadêmico, considerando-se que métodos cristalográficos requerem esforços muito superiores aos necessários à determinação de peso molecular de macromoléculas em solução.<sup>1</sup>

Dessa maneira, a existência de solventes adequados a diferentes polímeros é de primordial importância. A solubilidade de macromoléculas depende não só de fatores tais como o peso molecular, grau de ramificação, reticulação, cristalinidade, mas também da temperatura e do próprio solvente. O processo espontâneo de solubilização é uma medida da afinidade entre solvente e macromolécula, sendo acompanhado a pressão e temperatura constantes, por um decréscimo de energia livre. Ocorre inicialmente um intumescimento, ou seja, as moléculas do solvente penetram no interior do polímero sólido aumentando seu volume e mudando a sua conformação. A etapa seguinte de solubilização é a difusão da macromolécula para o interior do meio solvente, formando uma única fase termodinamicamente estável. Assim, a dissolução de macromoléculas é normalmente um processo lento e mesmo a agitação mecânica, se anterior ao intumescimento, é ineficiente.<sup>2</sup>

Com relação ao meio, tem-se solvente "bom" e solvente "pobre". Um solvente "bom" é aquele que dissolve um polímero com um decréscimo de energia livre, sofrendo apreciável abaixamento de pressão de vapor e produzindo solução com elevada pressão osmótica. Um solvente "pobre" apresenta características contrárias a estas.<sup>2</sup>

A determinação de parâmetros físico-químicos, tais como o peso molecular do macrossoluto, torna-se mais simples quando as soluções apresentam, sob temperatura acessível, comportamento ideal, isto é, que pode ser caracterizado por uma equação válida para sistemas ideais. Como regra geral, soluções de macromoléculas são raramente ideais, exceto no limite de diluição infinita. Uma maneira conveniente de descrever o comportamento não ideal de uma solução é expressar o potencial químico do solvente em termos de uma série de potência de concentração do soluto<sup>3</sup> ( $c_2$ ), conforme a equação 1;

$$\mu_1 - \mu_1^0 = RT \bar{V}_1 c_2 \left( \frac{1}{M_2} + A_2 c_2 + A_3 c_2^2 + \dots \right) \quad (1)$$

onde  $\bar{V}_1$  é o volume molar do solvente e  $M_2$  é o peso molecular do soluto. Os coeficientes  $A_2$  e  $A_3$  são denominados de segundo e terceiro coeficiente de virial respectivamente. Para soluções na faixa de concentração diluída os termos do coeficiente de virial de ordem superior a dois são negligenciáveis. Assim, o segundo coeficiente de virial é uma característica muito importante de soluções de polímeros, uma vez que sua magnitude reflete o caráter do solvente para um determinado polímero. Num solvente "bom" o valor de  $A_2$  é positivo, sendo tanto maior quanto "melhor" for o solvente; em solvente "pobre"  $A_2$  é negativo. Uma situação intermediária, com valor de  $A_2$  nulo, apresenta comportamento pseudo-ideal e o solvente é então chamado de solvente  $\theta$ .

O coeficiente de virial diminui com o aumento do peso molecular e aumenta com a heterogeneidade molecular para amostras de um mesmo polímero, de um mesmo peso molecular médio, o que foi comprovado com medidas de pressão osmótica de frações bem definidas de poliisobutileno em cicloexano e poliestireno em tolueno.<sup>4</sup>

O grau de ramificação da amostra também influi no valor de  $A_2$ , ocorrendo um decréscimo deste com o aumento do grau de ramificação. Uma verificação deste comportamento foi feita por Granath<sup>5</sup>, usando amostras de dextrana de mesmo peso molecular mas com diferentes graus de ramificação.

Os desvios da idealidade de soluções macromoleculares devem-se, de acordo com a teoria de Flory-Huggins, à sua entropia de mistura que é muito menor que no caso de soluto de baixo peso molecular; e se deve predominantemente à grande diferença entre o tamanho molecular dos componentes — solvente e soluto. Uma representação esquemática em duas dimensões de uma mistura de duas moléculas diferentes (representadas por x e ●), de tamanhos semelhantes, é apresentada na figura 1a, onde cada molécula pode ocupar um único lugar no retículo. As moléculas dos dois componentes podem se arranjar no retículo de inúmeras maneiras, sendo a entropia de mistura dada pela equação de Boltzmann. Admitindo-se que uma molécula de polímero é constituída de um grande número de segmentos, unidos entre si, com flexibilidade nas ligações que os unem e que cada segmento ocupa um espaço no retículo, idêntico ao correspondente às moléculas do solvente, o número de arranjos destes segmentos é reduzido (figura 1b).

O cálculo aproximado para o número de arranjos de cada modelo foi formulado independentemente por Flory<sup>6</sup> e Huggins<sup>7,8</sup> e

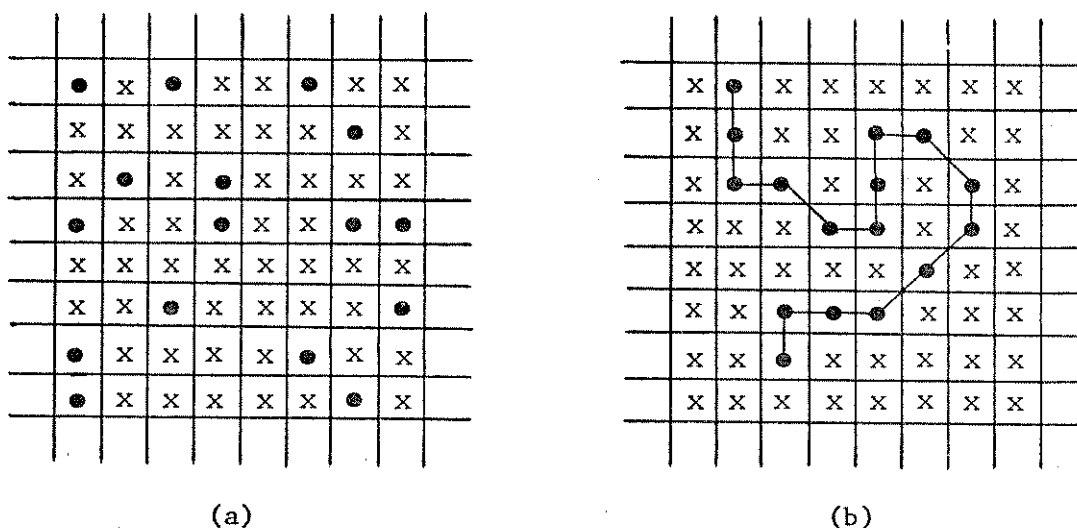


FIGURA 1. Representação em duas dimensões, a) mistura de dois componentes diferentes com moléculas de tamanho semelhantes, b) polímero.

é parte fundamental da Teoria de Flory-Huggins para soluções poliméricas, sendo a entropia de mistura fornecida por uma equação análoga à descrita para misturas ideais de moléculas pequenas:

$$\Delta S_M = -k(n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2) \quad (2)$$

onde  $\phi_i$  é fração de volume do componente  $i$  (solvente ou polímero).

A entalpia de dissolução de polímeros é descrita pela equação abaixo:

$$\Delta H = \chi k T N_1 \phi_2 \quad (3)$$

onde  $\chi$  é o parâmetro de Flory-Huggins. Este parâmetro especifica, em unidades de  $RT$ , a energia livre de excesso para transferir um mol do solvente puro para a fase polimérica pura. A variação de  $\chi$  com a concentração pode ser escrita em série de potência<sup>9</sup> em relação a  $\phi_2$ , conforme a equação 4,

$$\chi = \chi_1 + \chi_2 \phi_2 + \chi_3 \phi_2^2 + \dots \quad (4)$$

Para solução suficientemente diluída, o único parâmetro necessário para caracterizar o sistema é  $\chi_1$ . O seu valor pode ser calculado a partir dos dados do segundo coeficiente de virial<sup>10</sup> ( $A_2$ ), através da equação 5;

$$\chi = 0,5 - A_2 \frac{\bar{v}_1}{\bar{v}_2} \quad (5)$$

onde  $\bar{v}_1$  é o volume molar parcial do solvente e  $\bar{v}_2$  o volume específico parcial do soluto.

As macromoléculas flexíveis em solução diluída, podem se enovelar, assumindo conformação pouco estendida e sendo separadas entre si por grandes regiões de solvente puro. Este fato é negligenciado no tratamento de Flory-Huggins, o que torna a teoria inaplicável no caso de soluções diluídas. Flory e Krigbaum<sup>11</sup> assumiram um modelo onde cada "nuvem" de segmentos que constituem a macromolécula, seja aproximadamente esférica com uma densidade máxima no centro, apresentando um decréscimo de densidade à medida que se afasta do centro. Dentro do volume ocupado pelos segmentos de uma macromolécula ocorrem interações intramoleculares e as demais macromoléculas tendem a ser excluídas<sup>12</sup>, sendo a entropia, entalpia e energia livre molar destas interações dadas pelas seguintes equações:

$$\overline{\Delta S} = k \psi_1 \phi_2^2 \quad (6)$$

$$\overline{\Delta H} = k T k_1 \phi_2^2 \quad (7)$$

$$\overline{\Delta G} = k T (k_1 - \psi_1) \phi_2^2 \quad (8)$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann,  $\psi$  é o parâmetro característii

co para um dado par polímero-solvente e  $k_1$  é dado pela equação 9;

$$k_1 = \frac{BV_1}{kT} \quad (9)$$

Nesta equação 9, B é uma função das energias de interação entre solvente-solvente, polímero-polímero e solvente-polímero por unidade de volume e  $V_1$  é o volume molar do solvente.<sup>11</sup>

Das equações descritas anteriormente, resulta a equação 10,

$$k_1 - \psi = \chi - \frac{1}{2} \quad (10)$$

A relação  $\frac{k_1 T}{\psi}$  foi definida por Flory como  $\theta$ , com dimensão de temperatura, tal que;

$$\psi - k_1 = \psi \left(1 - \frac{\theta}{T}\right) = \frac{1}{2} - \chi. \quad (11)$$

Na temperatura igual a  $\theta$ , a energia livre molar parcial devido a interação polímero-solvente é zero, as contribuições de entalpia e entropia se cancelam e o sistema passa a apresentar um comportamento pseudo-ideal.

A equação 11, permite estimar a temperatura  $\theta$  para soluções macromoleculares, através de um gráfico da diferença  $(\frac{1}{2} - \chi)$  em função do inverso da temperatura absoluta.

Muitos dos métodos de estudo de soluções macromoleculares requerem que o macrossoluto se encontre num regime de concentração em que interações intermoleculares possam ser desprezadas. Anteriormente, distinguia-se somente o comportamento entre solução diluída e concentrada<sup>13</sup>. Nos últimos anos, trabalhos teóricos e experimentais têm estabelecido a conveniência de se definir três regimes de concentração, ou seja, diluído, semi-diluído e concentrado.<sup>14-16</sup> A figura 2 apresenta um esquema dos diferentes regimes de concentração, onde (a) representa moléculas

individuais, ou seja, solução diluída; (b) moléculas com pequeno entrelaçamento e (c) a região de concentração onde os segmentos do polímero são distribuídos uniformemente sobre todo o volume da solução.

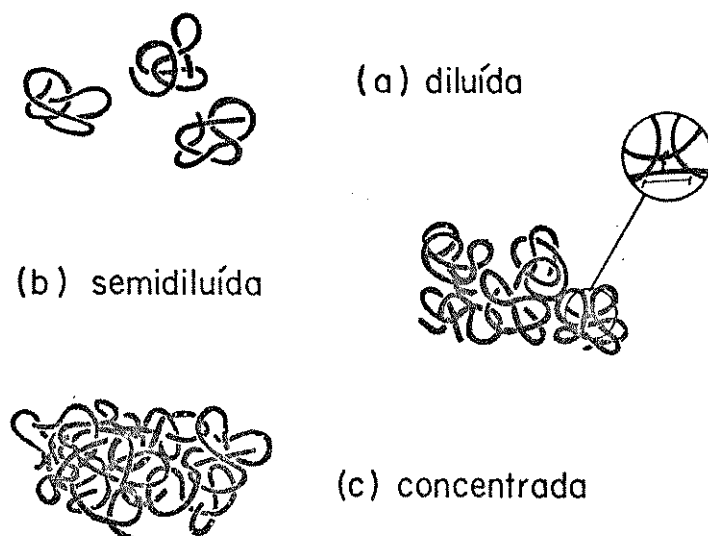


FIGURA 2. Diferentes regimes de concentração de solução de polímero.

A transição de um regime de concentração para outro ocorre gradualmente e não é sempre possível estabelecer uma concentração bem definida separando os diferentes regimes.<sup>17</sup> Para solução diluída, em que a molécula se comporta como unidade individual (figura 2a), uma escala de comprimento conveniente é o raio de giração da molécula ( $R_G$ ), uma propriedade estática, medida por exemplo, através de experimentos de espalhamento de luz.<sup>17</sup> A quantidade  $R_G$  é proporcional a  $M^v$ , onde  $v$  é um expoente crítico, sendo igual a 0,5 e aproximadamente 0,6 em solvente  $\theta$  e em solvente "bom" respectivamente. Cottom<sup>18</sup> analisou experimentos de espalhamento de luz de poliestireno ( $2,5 \times 10^5 \leq M \leq 5,6 \times 10^7$ ) em benzeno e corrigiu os dados para efeito de polidispersidade. Este procedimento resultou em um  $v = 0,588$  que se encontra em

concordância com a teoria.

À medida que há um aumento de concentração do macrossoluto, as interações intermoleculares, isto é, entre segmentos de moléculas diferentes, tornam-se predominantes e, numa determinada concentração  $c^*$ , as moléculas começam a se superpor. Esta concentração  $c^*$  separa os regimes diluído e semidiluído. Diversos modelos teóricos para determinação do valor de  $c^*$  têm sido apresentados.<sup>15</sup> Uma característica dos modelos é que  $c^*$  é inversamente proporcional a viscosidade intrínseca<sup>19</sup>, sendo que a constante de proporcionalidade depende do modelo escolhido e das interações que ocorrem no sistema.

Recentemente, leis caracterizando aspectos dinâmico e estático de soluções poliméricas têm surgido por analogia com problemas magnéticos.<sup>20</sup> Estas leis, conhecidas como "leis de scaling", têm sido verificadas experimentalmente,<sup>21,14</sup> e exprimem propriedades de transporte em série de potência de concentração. Uma solução macromolecular no regime semidiluído pode ser visualizada como uma "rede temporária", onde a distância média entre dois pontos de contato adjacentes é denotado por  $\xi$ , conforme ilustrado na figura 2b. O valor de  $\xi$  é independente do peso molecular do polímero dissolvido, mas varia proporcionalmente com a concentração elevada ao expoente de "scaling". Este expoente da concentração é igual a -0,77 e -1,0 para solvente bom e solvente teta, respectivamente<sup>22</sup>.

Analisando-se concentrações ainda maiores, tais que ocorra uma distribuição homogênea de segmentos de cadeia sobre todo o volume considerado (figura 2c) tem-se o regime de solução concentrada. A concentração que delimita os regimes semi-diluído e concentrado é denotada por  $c^+$ , isto é, soluções com concentra

ção  $c > c^+$  são consideradas soluções concentradas. O valor de  $c^+$  pode ser estimado por<sup>13</sup>,

$$c^+ = 6 [\eta]_0^{-1}$$

onde  $[\eta]_0$  é a viscosidade intrínseca na condição teta. As concentrações  $c^*$  e  $c^+$  são consideradas como concentrações críticas para as transições entre os regimes de concentração. A validade dos conceitos das concentrações críticas tem sido avaliada por diferentes métodos, tais como espalhamento de neutron a baixo ângulo<sup>14</sup>, NMR<sup>23</sup>, osmometria<sup>24</sup>, viscosimetria<sup>25</sup>, espectrometria ultravioleta<sup>26</sup> e velocidade de sedimentação.<sup>27,28</sup> Diversos dos métodos estudados indicaram que a transição ocorre suavemente sobre uma faixa de concentração relativamente larga, bem como as concentrações críticas para um dado polímero dependem do peso molecular do polímero dissolvido, da natureza do sistema polímero-solvente.

## 1.2. Peso Molecular de Macromoléculas

Uma amostra de um polímero, ainda que linear, pode apresentar macromoléculas de diferentes graus de polimerização (número de monômeros na cadeia), ou seja, de distintos pesos moleculares. Amostras de polímeros com esta característica são denominadas polidispersas sendo caracterizadas por um peso molecular médio. O tipo de média obtida depende da propriedade utilizada experimentalmente. Por exemplo, na determinação do peso molecular por propriedades coligativas de solução, cada molécula tem igual contribuição sobre o efeito que é observado. O peso molecular resultante é denominado peso molecular médio em número ( $\bar{M}_n$ ), e é definido pela equação 12;

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad (12)$$

onde  $N_i$  é o número de moles e  $M_i$  o peso molecular de uma determinada fração  $i$ . Esta média também pode ser obtida por osmometria.

Uma outra maneira de expressar o peso molecular é através do peso molecular médio em massa, definido pela equação 13,

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad (13)$$

Esta média pode ser obtida através de experimentos de espalhamento de luz, velocidade e equilíbrio de sedimentação.

Outra representação média de peso molecular é  $M_z$ , conforme a equação 14;

$$\bar{M}_z = \frac{\sum_i N_i M_i^3}{\sum_i N_i M_i^2} \quad (14)$$

Pela comparação das equações 12 e 13, para uma amostra de diferentes frações de peso molecular, conclui-se que o  $\bar{M}_w$  é necessariamente maior do que  $\bar{M}_n$ . A razão  $\bar{M}_w/\bar{M}_n$  é uma das maneiras de se determinar o grau de polidispersidade de uma amostra. Quando esta razão é igual à unidade, os pesos moleculares médios  $\bar{M}_w$  e  $\bar{M}_n$ , obtidos através de diferentes métodos ou tratamentos são idênticos, o grau de polimerização é uniforme para todos os constituintes da amostra, que é chamada de monodispersa. Com exceção de algumas proteínas que ocorrem naturalmente, os polímeros raramente são monodispersos. Isto é uma consequência da complexidade cinética das reações de polimerização. As amostras paucidispersas de polímeros, ou seja, com uma faixa estreita de peso molecular são resultados de métodos sintéticos especiais ou

fracionamentos posteriores.<sup>2</sup>

### 1.3. Dextrana

Dextranas de diferentes pesos moleculares foram estudadas neste trabalho e são polissacarídeos constituídos exclusivamente por unidades monoméricas  $\alpha$ -D-glucopirranose, unidas preferencialmente por ligações do tipo 1 $\rightarrow$ 6, com um pequeno número de ligações do tipo 1 $\rightarrow$ 3 que induz a formação de ramificações da cadeia principal. A figura 3 mostra um esquema de formação de dextrana linear a partir da sacarose, liberando um equivalente molar de frutose<sup>29</sup>. Janes e William<sup>30</sup> demonstraram que existe uma relação entre a estrutura da dextrana e a variedade do microorganismo empregado. Por exemplo, os resultados da oxidação de dextranas, com metaperiodato de sódio, a 25°C, indicam que a relação entre os números de ligações 1 $\rightarrow$ 4 e 1 $\rightarrow$ 6 pode variar de 1:3 a 1:24, dependendo da variedade de *Leuconostoc mesenteroides* utilizada na produção da dextrana.

Dextranas vêm apresentando grande interesse, sendo motivo de estudo as suas estruturas, mecanismos de formação, bem como suas aplicações industriais e médicas. Na tabela I são enumeradas algumas das aplicações de dextrana de diferentes pesos moleculares.

Conforme listado na tabela I, dextrana parcialmente hidrolisada, quando dissolvida em soro fisiológico a 6% pode ser injetada como substituto do plasma sanguíneo. Porém, dextranas utilizadas com esta finalidade dependem de um controle apurado das condições de hidrólise para que sejam obtidas moléculas de tamanho médio definido. Dextranas de alto peso molecular, após aplicação intravenosa, podem chegar a permanecer algum tempo nos

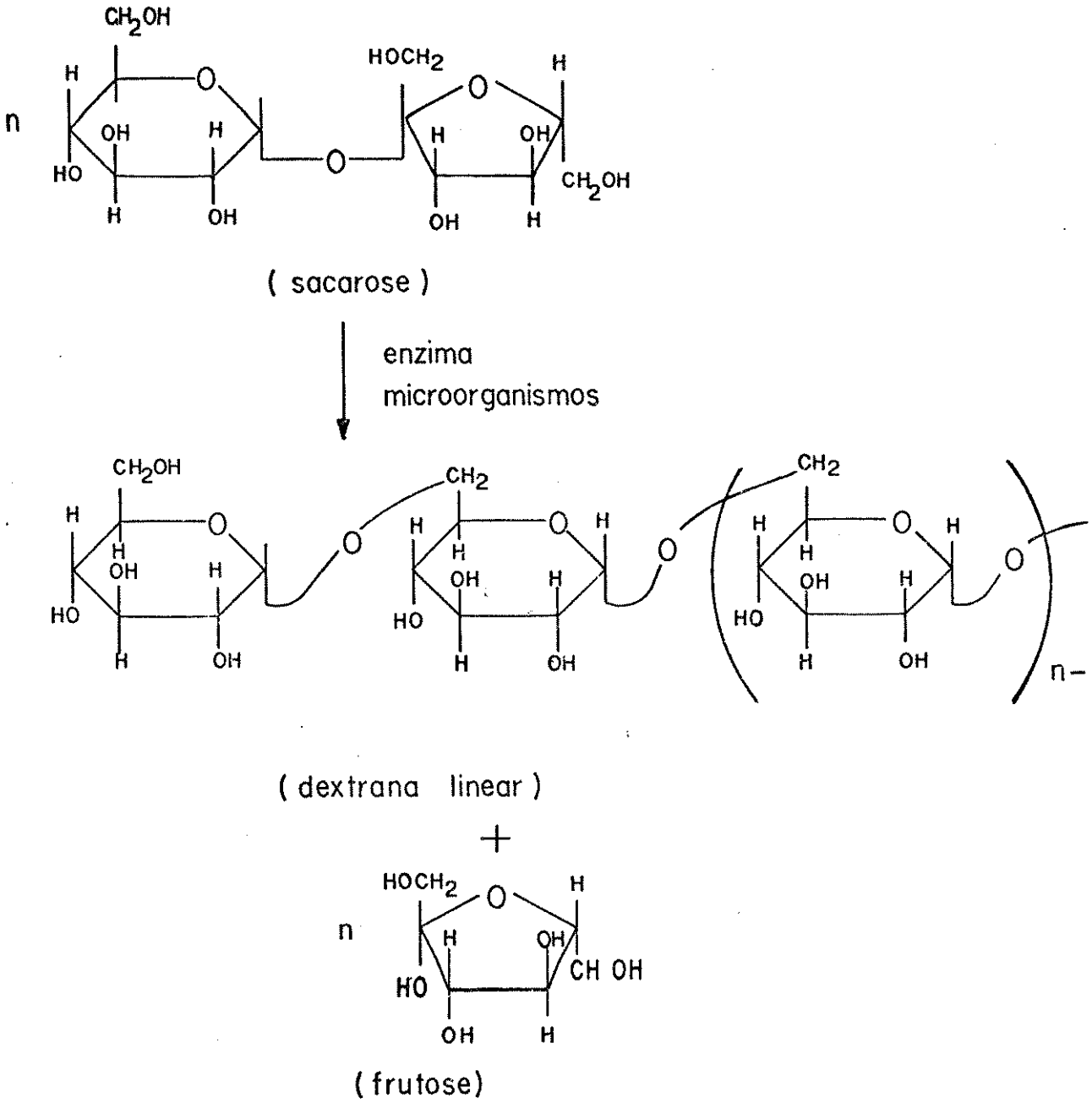


FIGURA 3. Esquema de obtenção de dextrana linear, a partir de sacarose, catalisada por dextransacarase.

TABELA I. Aplicações de dextrana.

| Peso molecular                  | Forma empregada                                                        | Aplicação                                                                     | Ref.   |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 75000 $\pm$ 2500                | 6% em 0,9% NaCl                                                        | substituição do plasma sanguíneo                                              | 31     |
| 75000 $\pm$ 2500                | 10-12% em solução aquosa ou de dextrose                                | tratamento de edema cerebral                                                  | 31     |
| 40000 $\pm$ 20000               | 10% em 0,9% NaCl                                                       | redução ou anulação da agregação de eritrócitos, aumento da fluidez do sangue | 32     |
| 7000 - 10000                    | sulfato de dextrana                                                    | inibição da coagulação do sangue                                              | 33     |
|                                 | dextrana                                                               | inibição da cristalização da sacarose                                         | 34     |
| 40000, 180000<br>50000, 2200000 | dextrana, sulfato de dextrana, carboximetil dextrana                   | separação de partículas e macromoléculas em sistemas líquidos de duas fases   | 35     |
| 30000 - 2000000                 | dextrana reticulada                                                    | peneira molecular para separação ou fracionamento de macromoléculas           | 36, 37 |
| 30000 - 2000000                 | dietilaminaetil e carboximetil derivados de gel de dextrana reticulada | fracionamento de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos                 | 36, 37 |

vasos sanguíneos sem que sejam facilmente filtradas. Por outro lado, soluções de dextranas com baixo peso molecular possuem uma elevada pressão osmótica<sup>38</sup>. Daí a importância de métodos para determinação de peso molecular, bem como de fracionamento de dextrana.

A produção em larga escala e o uso de dextrana foi iniciado na Suécia por Svenska Sockerfabriks Aktiebolaget para Aktiebolaget Pharmacia em 1942<sup>36</sup>; e nos Estados Unidos pela Commercial Solvents Corporation em 1949.<sup>39</sup> Dextranas e seus derivados são hoje utilizados universalmente em laboratórios químicos, bioquímicos e afins, na forma de produtos solúveis e insolúveis (Sephadex).

#### 1.4. Sedimentação e Difusão de Macrossolutos

Através dos fenômenos de transferência de massa, tais como difusão e sedimentação, pode-se calcular certos parâmetros característicos das macromoléculas e partículas coloidais em solução.

Numa coluna contendo uma solução binária ideal<sup>40</sup>, o potencial químico de um componente  $i$ , sob gravidade, é dado pela equação 15:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln x_i + (\bar{v}_i \rho - 1) M_i g z \quad (15)$$

onde,  $\bar{v}_i$  = volume específico parcial do componente  $i$

$\rho$  = densidade da solução

$M_i$  = peso molecular da fração  $i$

$g$  = aceleração da gravidade

$z$  = profundidade

Para  $z$  e  $g$  fixos, o potencial químico do componente  $i$  aumenta somente com o aumento da sua concentração, à temperatura constante. Havendo regiões de diferentes concentrações, ocorrerá difusão de moléculas em direção à região de menor concentração, onde o potencial químico também é menor.

Por outro lado, se a concentração for uniforme e  $\bar{v}_i \rho < 1$ , o potencial diminui com a profundidade e as moléculas de  $i$  tendem a sedimentar.

À medida que a sedimentação prossegue, cria-se um gradiente de concentração vertical aumentando a contribuição da difusão até que o potencial químico total seja uniforme em todo o sistema. Neste instante há um equilíbrio entre os processos de difusão e sedimentação.

No equilíbrio,  $\Delta\mu$  é nulo, da equação 15 se obtém a equação 16, que prevê<sup>41</sup> a variação exponencial da fração molar do componente  $i$  com a profundidade,

$$\frac{d(\ln x_i)}{dz} = \frac{M_i (1 - \bar{v}_i \rho) g}{RT} \quad (16)$$

Por exemplo, em uma solução ideal, ou em condição  $\theta$ , de polímero de peso molecular igual a  $2 \times 10^6$ ,  $\bar{v} = 0,6$  ml/g e concentração de  $2 \times 10^{-2}$  g/ml ( $\rho_{\text{sol}} = 1,0028$ ) numa coluna de 20 cm, no equilíbrio, a razão de concentrações no fundo e topo da coluna será de aproximadamente 4, à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Entretanto, o tempo necessário para que este estado de equilíbrio seja alcançado é muito longo e pode ser estimado através das equações desenvolvidas por Van Holde e Baldwin<sup>42</sup>, baseadas na teoria de Mason e Weaver<sup>43</sup>. Assim, avaliando-se o tempo requerido para uma solução 1,6% de dextrana ( $\bar{M}_w = 2 \times 10^6$ ), com um coeficiente de difusão igual a  $1,6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , para alcançar o equilíbrio numa coluna de 20 cm de altura são necessários 53 anos. Se a altura for reduzida, por exemplo, a 10 cm, mantendo-se as demais condições, o tempo necessário para que o sistema alcance o equilíbrio é então de 13 anos.

A velocidade de sedimentação foi relacionada com o comprimento da coluna por Weaver<sup>44</sup>, o qual obteve uma expressão que permite estimar o tempo necessário para alcançar o equilíbrio numa coluna de comprimento  $l$  como igual ou menor ao tempo que uma partícula necessita para percorrer a distância de  $2l$ , seguindo a lei de Stokes.

Assim, o fator cinético é limitante para o estudo de soluções de polímeros no estado de equilíbrio. O tempo de alcance do equilíbrio pode ser reduzido a uma escala de interesse experimental, sob gravidade, utilizando colunas relativamente curtas, da ordem de 0,2 cm conforme descrito por Weber et al.<sup>45</sup>, para solutos de partículas grandes e densas. Eles determinaram o  $\bar{M}_w$  de vírus de Tipula iridescente (TIV) igual a  $1 \times 10^9$ , a  $4,5^\circ\text{C}$ , partindo de uma solução de concentração inicial de 0,085%. O valor foi comparado com o determinado por outros métodos com boa concordância.

Em regime de concentração semidiluída, o processo de sedimentação pode ser visualizado como o fluxo de solvente através de uma rede temporária de moléculas de soluto ao invés do transporte do soluto em meio ao solvente<sup>22</sup>, definindo-se o coeficiente de permeabilidade  $k$ . A dependência de  $k$  com a concentração foi estudada para alguns sistemas poliméricos. Por exemplo, para sistemas binários de poliestireno-solvente,  $k$  é significativamente maior em condições  $\theta$ , devido à formação de agregados<sup>46</sup>, com poros largos, que facilitam o fluxo de solvente através deles. Por outro lado, para sistemas de hidroxipropilcelulose-água<sup>47</sup>, o valor de  $k$  é praticamente independente das condições termodinâmicas, pois provavelmente não há variação do tamanho dos poros que a macromolécula forma em solução, seja em solven-

te "bom" ou em solvente  $\theta$ .

Visualizando-se o regime semidiluído como uma sucessão de unidades monoméricas, com distância média entre pontos de contato  $\xi$ , o coeficiente de sedimentação<sup>48</sup> é dado pela equação (17),

$$s \propto \frac{M}{f} \quad (17)$$

onde  $f$  é o coeficiente de fricção e  $M$  é o peso molecular da sequência de monômeros. Assumindo-se que não existe interação entre estes segmentos de cadeia, durante a sedimentação, tem-se  $M$  proporcional ao número de monômeros de uma malha da rede, isto é,  $M \propto \xi_s^3$ , onde  $\xi_s$  expressa o comprimento estático. Se a malha é considerada esférica e impenetrável pelo solvente, tem-se segundo a lei de Stokes;

$$f \propto 6\pi\eta_0 \xi_D \quad (18)$$

onde  $\xi_D$  expressa o comprimento dinâmico das unidades monoméricas entre dois pontos adjacentes de uma malha do retículo.

Assim, o coeficiente de sedimentação pode ser escrito como;

$$s \propto \frac{c \cdot \xi_s^3}{\eta_0 \xi_D} \quad (19)$$

Através de substituições algébricas das expressões que relacionam  $\xi_s$  e  $\xi_D$  com a concentração, resulta a expressão:

$$s \propto c^{-\alpha_1} \quad (20)$$

onde

$$\alpha_1 \begin{cases} 0,5 & \text{(na condição de solvente bom)} \\ 1,0 & \text{(na condição de solvente } \theta \text{).} \end{cases}$$

Destor e Rondelez<sup>49</sup> estudaram o coeficiente de sedimenta-

ção de poliestireno de vários pesos moleculares, verificando que o valor de  $s$  no regime semidiluído (acima de  $c^*$ ) é independente do peso molecular.

O coeficiente de sedimentação ( $s$ ) caracteriza o macrossoluto num determinado solvente e temperatura, mas depende da pressão hidrostática e da concentração. O aumento da pressão a que um macrossoluto está sujeito, durante um experimento de sedimentação, tende a reduzir  $s$ <sup>50</sup>. Este efeito é mais pronunciado em solventes orgânicos<sup>51</sup>, onde  $s$  pode variar de 20 a 30%. A variação de  $s$  com a concentração é expressa pela relação

$$s \propto c^{\frac{1-x}{1-3x}} \quad (21)$$

onde  $x = 0,588$  e  $0,500$  em solvente bom e solvente  $\theta$  respectivamente<sup>52</sup>. Muitos autores têm dedicado esforços para verificar esta relação, mas com resultados ambíguos. H. Elmgren<sup>53</sup> tem discutido as razões pelas quais a equação 21 não se aplica a soluções reais de polímeros.

Associado ao coeficiente de sedimentação o coeficiente de difusão é um parâmetro importante na caracterização de macromoléculas em solução e é descrito pela equação 22;

$$D = \frac{RT}{N_A f} \quad (22)$$

onde  $N_A$  é o número de Avogadro e  $f$  é o coeficiente de fricção.

Em regime semidiluído define-se também o coeficiente de difusão cooperativo ( $D_c$ ) que corresponde ao coeficiente de difusão de uma malha considerada independente de suas vizinhas.  $D_c$  tende a  $D$ , à medida que a concentração diminui. O coeficiente de difusão cooperativo pode ser expresso pela equação 23, em termos de coeficientes de virial<sup>54</sup>.

$$D_c = \frac{RT}{N_A \cdot f} (1 - \bar{v}_2 \cdot c) (1 + 2A_2 M_c + \dots) \quad (23)$$

As propriedades de atrito também são muito importantes na descrição dos fenômenos de transporte em soluções macromoleculares. Representando-se a condição de diluição infinita pelo índice 0, a razão  $f_0/f$  pode ser escrita em função do coeficiente de sedimentação e difusão cooperativa através das equações 24 e 25.

$$\frac{f_0}{f} = \frac{(1 - \bar{v}_2 \rho_0)}{(1 - \bar{v}_2 \rho)} \cdot \frac{s}{s_0} \quad (24)$$

$$\frac{f_0}{f} = \frac{D_c}{D_0} \frac{(1 + 2A_2 M_c + 3A_3 M_c^2 + \dots)}{(1 - \bar{v}_2 c)} \quad (25)$$

Estas equações são aplicáveis somente a sistemas de dois componentes puros e permitem uma comparação das características fricionais na difusão e sedimentação.

### 1.5. Ultracentrifugação

Svedberg e Nichols<sup>55</sup> a partir de 1923, iniciaram o estudo do efeito do campo inercial em soluções de macromoléculas e sistemas coloidais. Foram obtidos progressos, de maneira que se tornou possível determinar a distribuição do tamanho de partículas em uma amostra de sol de ouro<sup>56</sup>. Na época eles propuseram o nome "ultracentrífuga" para o instrumento no qual a sedimentação sob um campo inercial era estudada quantitativamente. Atualmente, entretanto o termo "ultracentrífuga" é utilizado para todas as centrífugas de alta velocidade, mesmo quando o instrumento não contém dispositivos que permitam a realização de medidas analíticas durante o transporte. A utilização de ultracentrífugas pode ter finalidades analíticas ou preparativas. Na ultra-

centrífuga analítica, podem ser medidas algumas propriedades físico-químicas de partículas dispersas ou de um soluto, através da observação óptica contínua de pequenos volumes de aproximadamente 1 ml de amostra durante o período de centrifugação. Parâmetros físico-químicos podem ser determinados com a utilização de ultracentrífuga analítica, através de dois métodos distintos: equilíbrio e velocidade de sedimentação. O método de equilíbrio apresenta grande importância, pois é baseado na teoria do equilíbrio termodinâmico; pode ser utilizada a velocidade alta ou baixa do rotor. O método de equilíbrio à baixa rotação utiliza colunas de ~1 cm de altura, requer tempos superiores para alcance do equilíbrio, apresenta uma maior precisão, tem menor sensibilidade a componentes de baixo peso molecular e maior a componentes de alto peso molecular do que o método à alta rotação. Pelo método de alta rotação podem ser determinados  $\bar{M}_w$ ,  $\bar{M}_n$  e  $\bar{M}_z$  enquanto que o de baixa rotação permite calcular  $\bar{M}_w$  e  $\bar{M}_z$ , dependendo do tratamento utilizado<sup>57</sup>. As características da amostra determinam a escolha do método. Por exemplo, os experimentos de alta velocidade não são indicados para o estudo de sistemas que contêm contaminantes de baixo peso molecular<sup>58</sup>, e para soluções concentradas, como por exemplo para alguns sistemas em que ocorre interação entre as macromoléculas. Este método de alta velocidade aplica-se predominantemente à concentração inicial do macrossoluto entre 0,1 e 1,5 mg/ml (o método de baixa velocidade aplica-se a concentração inicial entre 2 e 20 mg/ml) e foi desenvolvido a partir do trabalho de Yphantis<sup>59</sup>, que operou a ultracentrífuga em velocidades onde a concentração no menisco se tornava desprezível.

Van Holde e Baldwin<sup>44</sup>, estabeleceram a redução da altura da

coluna como condição necessária para tornar viáveis os experimentos de equilíbrio de sedimentação, pois o tempo necessário para atingir o equilíbrio é proporcional ao quadrado da altura. Entretanto, estes experimentos, mesmo em colunas curtas (~ 3 mm) requerem tempos da ordem de 12 a 18 horas (ou mais), sendo que a precisão diminui com o tamanho da coluna<sup>60</sup>.

No método de velocidade de sedimentação utiliza-se uma velocidade de rotação da ordem de 40000 a 60000 rpm, que corresponde ao ponto médio da célula (a uma distância de 6,5 cm do centro do rotor) estar sujeito a 114000 e 256000 vezes a gravidade normal respectivamente. Neste tipo de experimento, observa-se o deslocamento da fronteira macromolécula-solvente de uma solução inicialmente uniforme, através de métodos ópticos, como por exemplo espectroscopia UV e variação do índice de refração com sistema óptico Schlieren. Os resultados destas experiências são analisados com o auxílio de teorias e fenomenologias de transporte e da termodinâmica dos processos irreversíveis, que permitem determinar o coeficiente de sedimentação e difusão, peso molecular, tamanho e forma das partículas<sup>61</sup>. A figura 4 apresenta a distribuição de massa de soluto durante a sedimentação numa célula com formato de setor<sup>62</sup>. A solução, que inicialmente se apresentava homogênea, sob a ação do campo inercial, passa a possuir uma fronteira, distinguindo-se a solução do solvente puro. A velocidade de deslocamento desta fronteira é função do coeficiente de sedimentação do macrossoluto, que é função do peso molecular, tamanho, forma e polidispersidade da amostra. Se a difusão for negligenciável e as partículas uniformes em tamanho e forma, esta fronteira será bem nítida<sup>61</sup>.

O peso molecular médio em massa ( $\bar{M}_w$ ) da amostra em estudo

é determinado através da equação 26:

$$\bar{M}_w = \frac{RT}{(1 - \bar{v}_2 \rho_0)} \cdot \frac{s_0}{D_0} \quad (26)$$

onde  $s_0$  e  $D_0$  são os coeficientes de sedimentação e difusão à concentração zero,  $\rho_0$  a densidade do solvente e  $\bar{v}_2$  o volume específico parcial do macrossoluto. A metodologia utilizada para determinação de  $s_0$  e  $D_0$  será exemplificada na parte experimental desta Tese.

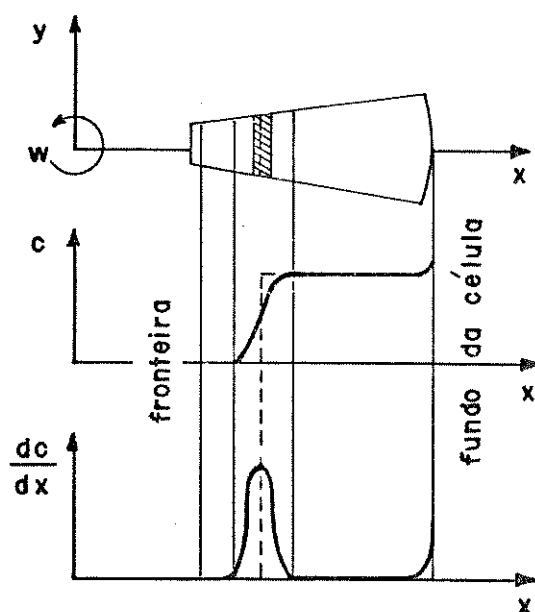


FIGURA 4. Distribuição de massa de soluto durante a sedimentação numa célula com formato de setor.

#### 1.6. Osmometria e Viscosimetria

Além dos métodos que utilizam uma ultracentrífuga para a determinação de parâmetros físico-químicos de dispersões coloidais ou de macromoléculas em solução, existem outros métodos com metodologia e faixa de aplicação bem definidas.

Por exemplo, osmometria é um método que se aplica à determinação de peso molecular e coeficiente de virial de macromolé

culas. O método consiste em se colocar a solução em estudo em contato com o solvente através de uma membrana permeável somente ao solvente, conforme esquema da figura 5. Como existe macrossoluto somente em um compartimento do osmômetro, o potencial químico do solvente é diferente nos dois comparti-

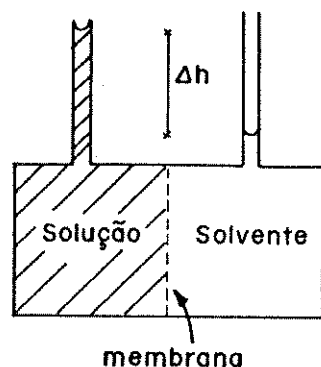


FIGURA 5

mentos, induzindo um fluxo de solvente no sentido do compartimento do solvente puro para o da solução. A diferença da pressão hidrostática resultante da transferência de líquido diminui o potencial químico do solvente no compartimento da solução. A diferença de pressão através da membrana, no momento em que o potencial químico do solvente nos dois compartimentos for idêntico é chamada de pressão osmótica. Esta diferença de pressão é medida através da diferença de alturas dos líquidos nos capilares, unidos aos compartimentos da solução e solvente (figura 5).

No equilíbrio osmótico; tem-se

$$\mu_1 - \mu_0 = - \pi V_1 . \quad (27)$$

Substituindo a equação 1 na equação (27), resulta

$$\frac{\pi}{c_2} = RT \left[ \frac{1}{M_2} + A_2 c_2 \right] \quad (28)$$

e em termos do parâmetro de Flory-Huggins, pela equação 29,

$$\frac{\pi}{c_2} = RT \left[ \frac{1}{M_2} + \frac{\rho_1}{M_1 \rho_2} \left( \frac{1}{2} - \chi \right) c \right] \quad (29)$$

onde os índices 1 e 2 referem-se ao solvente e soluto respectivamente.

Kok e Rudin<sup>63</sup>, deduziram uma expressão que permite calcular o coeficiente de virial a partir do peso molecular e viscosidade intrínseca em solvente  $\theta$  e no solvente em estudo. A previsão do coeficiente de virial permite então a avaliação da pressão osmótica, através da equação 28. Eles compararam os valores calculados com resultados experimentais relacionados na literatura, mostrando que a pressão osmótica calculada a partir da equação 28 fornece valores corretos somente à baixa concentração de polímero, ou com boa aproximação quando  $\frac{\pi}{c} < 3 \left(\frac{\pi}{c}\right)_0$ .

A determinação da viscosidade de polímeros em solução permite avaliar o seu peso molecular, através da equação de Mark-Houwink<sup>64</sup> (equação 30), que expressa a relação entre viscosidade intrínseca e peso molecular do macrossoluto.

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad (30)$$

$$\text{onde } M_v = \left[ \frac{\sum_i N_i M_i^{1+a}}{\sum_i N_i M_i} \right]^{1/a}$$

Na equação 30,  $a$  e  $K$  são parâmetros empíricos que dependem do tipo de polímero, do solvente e da temperatura em que a viscosidade foi medida. Para muitos sistemas  $a$  varia entre 0,6 e 0,8 e  $K$  de  $0,5 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-4}$ . Assim, a determinação do peso molecular através de medidas da viscosidade necessita de uma determinação prévia dos parâmetros empíricos para o sistema em estudo. Para amostras monodispersas, ( $\bar{M}_n \approx \bar{M}_v \approx \bar{M}_w$ ) qualquer média de peso molecular pode ser combinada com a medida de viscosidade para avaliar as constantes da equação 30. Como o  $\bar{M}_v$  é mais próximo de  $\bar{M}_w$  do que do  $\bar{M}_n$ , em amostras polidispersas o peso molecular médio em massa é preferido para esta calibração. Este método é bastante simples, acessível, mas apresenta como desvantagem a necessidade de se conhecer previamente a curva de varia-

terminado sistema.

### 1.7. Osmossedimentação e Osmocentrifugação

Conforme foi comentado anteriormente, a sedimentação de macrossolutos, sob gravidade, é um processo extremamente lento. F. Galembeck e colaboradores<sup>40,65-67</sup> observaram que a velocidade de sedimentação de um macrossoluto é aumentada quando a solução é colocada em contato com o solvente, através de uma membrana semipermeável. Esta consequência do acoplamento de fluxos osmóticos a fluxos de sedimentação é denominada osmossedimentação. A figura 6 ilustra um esquema dos fluxos que ocorrem em experimentos de osmossedimentação, que consiste numa célula de diálise, com uma membrana vertical, resultando dois compartimentos. Assim, a solução em estudo fica em contato com o solvente através da membrana. Por simplicidade, considera-se uma solução binária ideal onde o macrossoluto é monodisperso e que a membrana retém o macrossoluto mas não o solvente. Através da membrana semipermeável, existirá um fluxo de solvente que está relacionado com a diferença de potencial químico do solvente nos dois compartimentos, indicado na figura 6 por setas contínuas.

Partindo-se de uma situação em que a concentração da solução no compartimento 2 é uniforme, e admitindo-se que i) não existe desnível entre os compartimentos, ii) que o volume molar parcial do solvente na solução é igual ao do solvente puro e iii) que a fração molar do solvente é constante com a profundidade, a diferença de potencial químico do solvente através da membrana é dada pela equação 31,

onde  $x_{\text{solv}}$  é a fração molar do solvente na solução,  $\Delta\rho$  é a diferença de densidade entre solução e solvente,  $\bar{V}_{\text{solv}}^0$  é o volume molar parcial do solvente puro e  $z$  é a profundidade, tomada a partir do nível superior da fase líquida.

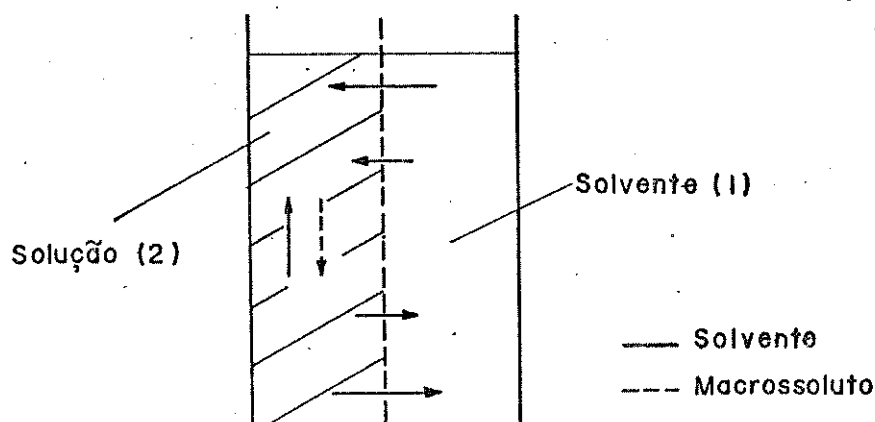


FIGURA 6. Esquema de uma célula de osmossedimentação.

O sinal de  $\Delta\mu_{\text{solv}}$  indica o sentido do fluxo de solvente através da membrana. O termo  $RT\ln x_{\text{solv}}$  é sempre negativo e considerando-se o caso genérico, onde  $\rho_{\text{solvente}} < \rho_{\text{solução}}$ , o termo  $z\bar{V}_{\text{solv}}^0 g\Delta\rho$  é positivo. Ocorre fluxo de solvente para o compartimento da solução até a profundidade em que o termo  $z\bar{V}_{\text{solv}}^0 g\Delta\rho$  for maior em módulo do que  $RT\ln x_{\text{solv}}$ . Quando isto ocorre, o fluxo do solvente se inverte, isto é, passa a ser do compartimento da solução para o compartimento do solvente, ou seja, tem-se um fluxo osmótico reverso. Esta inversão de fluxo de solvente numa célula indica a existência de um ponto onde o fluxo de solvente é nulo. Esta profundidade  $z$  pode ser calculada, da equação 31, conhecendo-se os demais parâmetros na condição de  $\Delta\mu_{\text{solv}} = 0$ . O fluxo de solvente ocorre até que não exista mais gradiente de potencial químico de solvente no sistema, ou seja,

quando o equilíbrio de sedimentação-difusão tenha sido alcançado. Estando o sistema no estado de equilíbrio, podem ser utilizadas algumas equações que se aplicam somente a este estado termodinâmico para a determinação de parâmetros físico-químicos, tais como peso molecular, coeficiente de virial, parâmetro de Flory-Huggins.

Foi mostrado experimentalmente para soluções de dextrana e óxido de ferro<sup>68</sup>, que utilizando-se experimentos de osmossedimentação resultam gradientes de concentração em tempos relativamente curtos. Assim, os experimentos de osmossedimentação, permitindo a obtenção de gradiente de concentração em escala de tempo mensurável, torna em princípio possível, sob gravidade, fracionar amostra polidispersa de polímero, concentrar proteínas ou outros macrossolutos.

O mesmo princípio da osmossedimentação pode ser estendido para experimentos feitos a baixo campo inercial (osmocentrifugação).

Tanto os experimentos de osmossedimentação como os de osmocentrifugação necessitam de uma membrana que possua um elevado grau de seletividade, isto é, que não permita o fluxo de soluto entre os compartimentos da célula mas tenha um fluxo de solvente adequado para que o processo não seja cineticamente prejudicado. Por exemplo, na determinação de parâmetros físico-químicos é necessário que o gradiente de concentração seja o correspondente ao do estado de equilíbrio. Porém, se mesmo pequenas quantidades de soluto (ou mesmo algum contaminante) atravessam a membrana semipermeável, influenciarão no fluxo de solvente e consequentemente no gradiente de concentração final. Portanto, é de primordial importância para experimentos analíticos de os-

mossedimentação o desenvolvimento de membranas semipermeáveis utilizáveis com o polímero ou proteína desejada. Trabalho neste sentido foi executado no laboratório, conduzindo a membranas com as características necessárias, que foram utilizadas neste trabalho<sup>69</sup>.

### 1.8. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi verificar a aplicabilidade do método de osmosedimentação a trabalho analítico e preparativo realizado com soluções de macromoléculas.

Para atingir este objetivo, foi necessário:

- i) verificar o atingimento do estado de equilíbrio de sedimentação em soluções de macromoléculas, sob gravidade;
- ii) determinar o peso molecular de macrossolutos bem definidos;
- iii) comparar os valores obtidos por osmosedimentação com os obtidos por outros métodos e com os relacionados na literatura;
- iv) verificar a aplicabilidade do método de osmosedimentação ao fracionamento e do método de osmocentrifugação à concentração de dextrana.

## II. PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS

### 2.1. Materiais e Equipamentos

Foram utilizados neste trabalho os seguintes materiais:

- acetato de celulose, Carlo Erba (ácido acético combinado, 53%).
- ácido acético glacial, Labormax.
- acetona PA-ACS, Carlo Erba.
- etanol PA, Carlo Erba.
- dextrana T500, lote nº 4094, Pharmacia Fine Chemicals ( $M = 5 \times 10^5$ ).
- dextrana D5376, lote nº 38C-0123, Sigma, ( $M = 2 \times 10^6$ ).
- dextrana D5376, lote nº 58C-0296, Sigma, ( $M = 2 \times 10^6$ ).
- dextrana, ICN Pharmaceuticals Inc, lote nº 7600, ( $M = 5$  a  $40 \times 10^6$ ).
- dextrana, ICN Pharmaceuticals Inc, lote nº 2151, ( $M = 4 \times 10^4$ ).
- dextrana azul D5751, lote 50F-01B, Sigma, ( $M = 2 \times 10^6$ ).
- tiroglobulina, tipo I: bovina, nº T-1001, lote 89C-8100.
- albumina bovina, nº A2153, lote 41F-0059, Sigma.
- timerosal.

e os seguintes equipamentos;

- bureta de pistão Metrohm AG Herisau de 10 ml.
- viscosímetro Ubbelohde.
- densímetro PAAR-DMA 60.
- espectrofotômetro UV-visível Zeiss PMQ II.
- ultracentrífuga analítica MOM - tipo 3170.
- computador CP500 - Prológica.
- centrífuga refrigerada RC-38 - Sorvall Instrument.

- centrífuga IEC, modelo K.
- planímetro Hruden.

## 2.2. Preparação de Membranas Assimétricas de Acetato de Celulose

As membranas utilizadas nos experimentos de osmosedimentação e osmocentrifugação foram preparadas seguindo-se o procedimento desenvolvido no laboratório<sup>69</sup>.

Dissolveram-se 15 g de acetato de celulose numa mistura solvente, contendo 75 ml de ácido acético, 25 ml de acetona e 35 ml de água. A solução foi então espalhada sobre uma placa de vidro, contendo dois fios de níquel-cromo de 0,4 mm de espessura (esticados para garantir a uniformidade da espessura da membrana). Deixou-se o solvente evaporar durante 10 minutos e introduziu-se a placa num recipiente com água, à temperatura ambiente, para que o acetato de celulose coagulasse. A membrana produzida por este método é assimétrica, pois é formada por uma película filtrante suportada numa camada do mesmo polímero.

Estas membranas, para utilização em experimentos de osmosedimentação e osmocentrifugação, devem apresentar uma alta permeabilidade ao solvente e boa rejeição do soluto em estudo.

A permeabilidade das membranas foi avaliada analisando-se o fluxo de água através delas, sob a pressão de um metro de água. Estas medidas foram obtidas, colocando-se uma célula de diálise em contato com um reservatório de água a uma altura de um metro. A área da membrana era de  $12,6 \text{ cm}^2$ , resultando um fluxo de  $0,04 \text{ ml cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ .

### 2.3. Diálise em Fluxo e em Centrífuga a Baixa Velocidade

Em amostras com contaminantes de baixo peso molecular ou com um grau elevado de polidispersidade, houve interesse em eliminar o contaminante ou as frações de menor peso molecular. Com essa finalidade foram feitos experimentos em células de diálise com fluxo contínuo de solvente e em células de diálise sob a ação de um campo de 800 x g.

No primeiro caso foi tomada uma célula de diálise de 28 cm de altura (figura 7a), constituída por duas placas de acrílico justapostas com a membrana semipermeável, que divide a célula em dois compartimentos. Inicialmente, a solução de dextrana polidispersa foi colocada em um dos lados da célula e o solvente no outro lado. O solvente foi então bombeado a uma velocidade de  $10 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$  e recolhido para análise da quantidade de macrossoluto que atravessou a membrana. No lado da célula em que se colocou solução foi borbulhado ar pela parte inferior para homogeneizar o seu conteúdo.

No segundo tipo de experimento utilizaram-se células de 12 cm de altura e 8,5 cm de largura (figura 7b), submetidas a baixo campo inercial, numa centrífuga IEC. Inicialmente, a solução a ser dialisada e o solvente foram colocados, cada um em um dos lados da célula e após um determinado tempo de centrifugação a 2000 rpm, a fração do solvente foi trocada para análise da massa de macrossoluto que atravessou a membrana.

A amostra utilizada foi dextrana de peso molecular nominal  $2 \times 10^6$  (Sigma). As densidades da solução inicial e das frações de solvente foram determinadas diretamente no densímetro PAAR-DMA 60. A fração de volume do soluto ( $\phi_2$ ) foi calculada pela equação 32,

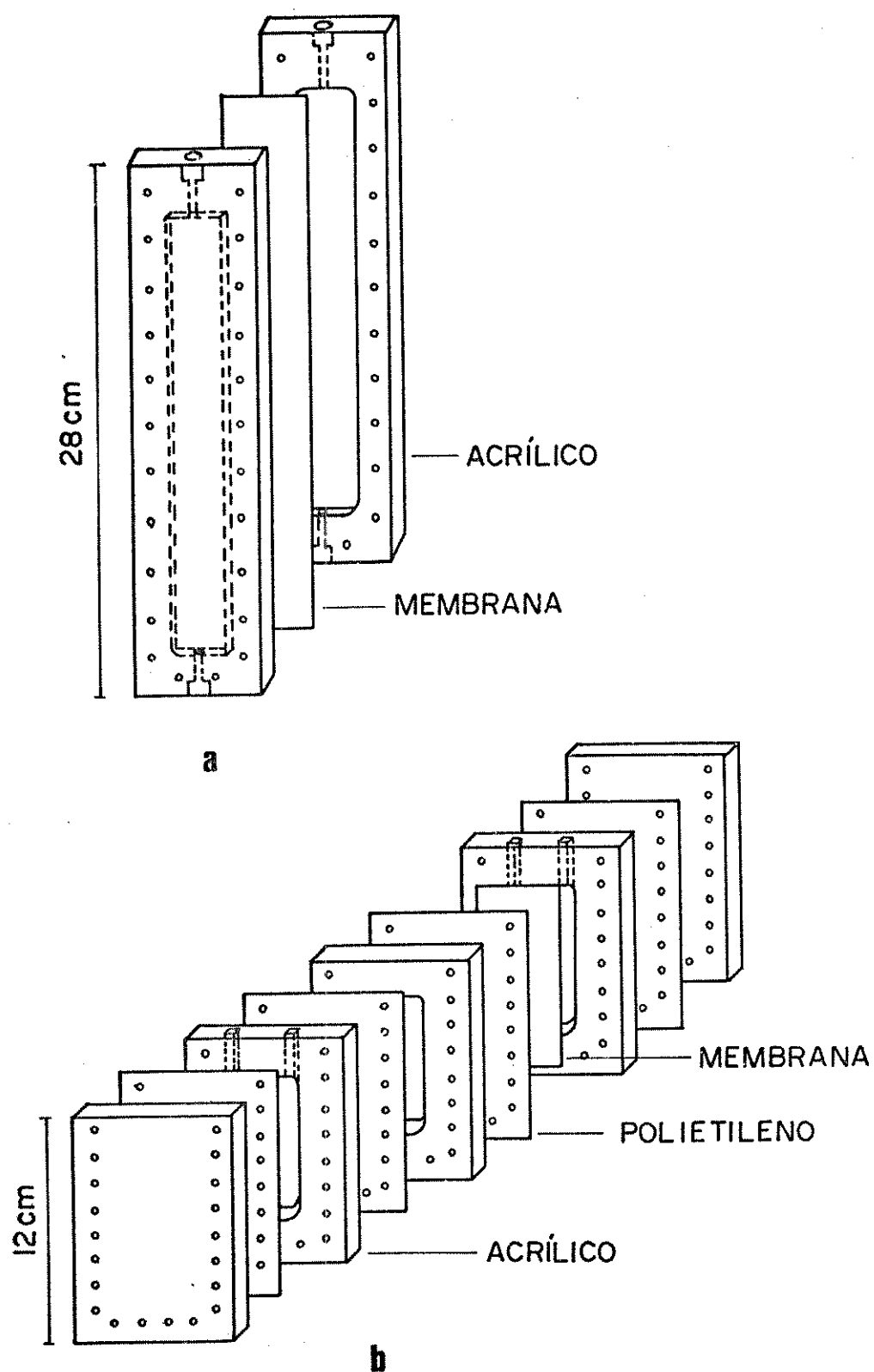


FIGURA 7. Esquema de células de diálise.

$$\phi_2 = \frac{\rho_{12} - \rho_1}{\frac{1}{\bar{v}_2} - \rho_1} \quad (32)$$

onde  $\rho$  é a densidade,  $\bar{v}$  é o volume específico parcial e os índices 2 e 1 referem-se ao soluto e solvente respectivamente. A massa de macromolécula que passou através da membrana foi obtida pela equação 33;

$$m_2 = V\rho_{12} - V\rho_1 (1 - \phi_2) \quad (33)$$

onde  $V$  é o volume total da fração recolhida.

Na tabela II, são apresentadas as massas de dextrana recolhidas no lado do solvente, em função do tempo. Na figura 8, estão plotados os valores contidos na tabela II, onde se pode notar que o tempo necessário para eliminar uma mesma fração de massa de dextrana da solução inicial (no caso 10%), por diálise em baixo campo inercial é em torno de 20 horas, isto é, oito vezes menor do que por diálise em fluxo.

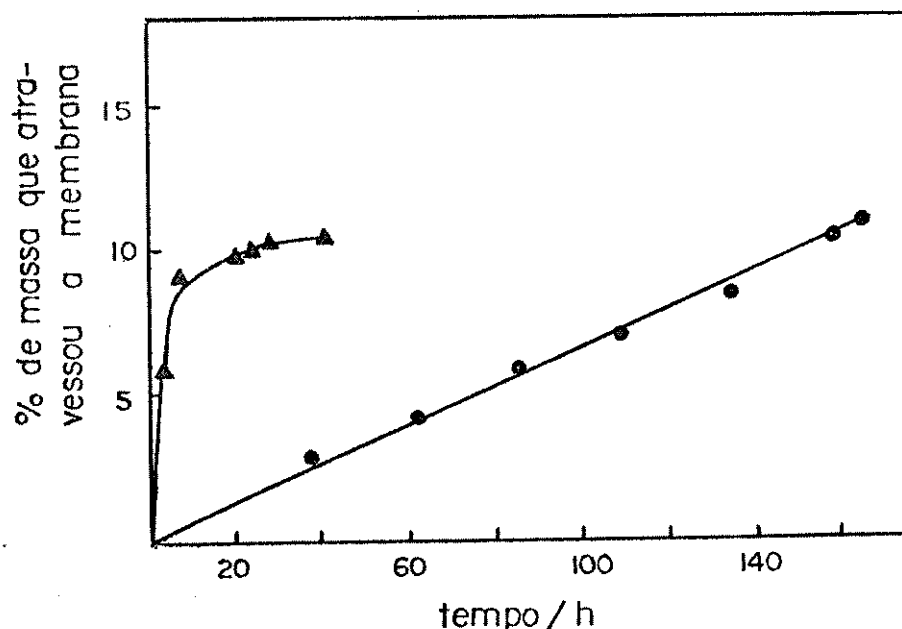


FIGURA 8. Fração de massa de dextrana que atravessou a membrana em função do tempo (●) diálise em fluxo, (▲) diálise a baixo campo inercial.

TABELA II. Fração de massa de dextrana que passou através da membrana para o compartimento do solvente, em experimentos de diálise em fluxo e de diálise durante centrifugação.

| Tempo/hora | Diálise em fluxo <sup>a</sup> |                      |                  | Diálise durante centrifugação <sup>b</sup> |                      |                  |
|------------|-------------------------------|----------------------|------------------|--------------------------------------------|----------------------|------------------|
|            | V <sup>c</sup> (ml)           | $\phi_2 \times 10^6$ | % m <sub>2</sub> | V (ml)                                     | $\phi_2 \times 10^6$ | % m <sub>2</sub> |
| 4,0        |                               |                      |                  | 12,6                                       | 623                  | 5,8              |
| 7,5        |                               |                      |                  | 12,6                                       | 382                  | 9,2              |
| 21,5       |                               |                      |                  | 11,7                                       | 121                  | 9,7              |
| 25,0       |                               |                      |                  | 12,4                                       | 70                   | 9,9              |
| 29,0       |                               |                      |                  | 12,4                                       | 99                   | 10,2             |
| 39,0       | 395                           | 153                  | 2,8              |                                            |                      |                  |
| 42,2       |                               |                      |                  | 12,6                                       | 102                  | 10,5             |
| 63,0       | 245                           | 146                  | 4,6              |                                            |                      |                  |
| 86,0       | 210                           | 137                  | 5,8              |                                            |                      |                  |
| 110,0      | 190                           | 137                  | 6,9              |                                            |                      |                  |
| 136,0      | 255                           | 134                  | 8,4              |                                            |                      |                  |
| 160,5      | 237                           | 159                  | 10,3             |                                            |                      |                  |
| 166,0      | 45                            | 156                  | 10,8             |                                            |                      |                  |

a)  $c_{\text{inicial}} = 1,8 \times 10^{-2} \text{ g/cm}^3$ ,  $V_{\text{dialisado}} = 65 \text{ ml}$ .

b)  $c_i = 2,2 \times 10^{-2} \text{ g/cm}^3$ ,  $V_{\text{dial.}} = 10 \text{ ml}$ .

c) V é o volume da fração recolhida.

#### 2.4. Determinação do Volume Específico Parcial da Dextrana

O volume específico parcial ( $\bar{v}_2$ ) de um soluto, numa solução binária é definido como a derivada parcial do volume da solução com relação à massa do soluto, mantendo-se constantes a temperatura, pressão e massa do solvente.

O volume de uma solução binária pode ser escrito como<sup>70</sup>,

$$V = n_1 \bar{V}_1 + m_2 \cdot \bar{v}_2 \quad (34)$$

onde  $\bar{V}_1$  é o volume molar parcial do solvente e  $\bar{v}_2$  o volume específico parcial do soluto.

O procedimento seguido para determinação do volume total de solução em função da massa de dextrana foi o seguinte: inicialmente colocou-se uma certa quantidade de dextrana num dessecador com pentóxido de fósforo, sob vácuo, até se obter peso constante. Uma vez alcançado peso constante, colocaram-se em pesafiltros quantidades de dextrana entre 0,013 e 0,311 g e adicionaram-se 5 ml de água bidestilada. A massa de dextrana foi então corrigida para uma massa constante de 5,0000 g de água, e o volume total determinado pela razão da massa total pela densidade da solução. Os dados são apresentados na tabela III. O gráfico de massa de dextrana em função do volume total permite determinar, através do coeficiente angular (equação 34), o valor de  $\bar{v}_2$  para dextrana. Na figura 9 estão plotados os valores da tabela III. A reta foi traçada por regressão linear, obtendo-se  $\bar{v}_2$  igual a  $0,634 \pm 0,006 \text{ cm}^3/\text{g}$ . O coeficiente linear obtido foi de  $5,014 \pm 0,001 \text{ ml}$  que está de acordo com o valor de  $n_1 \cdot \bar{V}_1$  esperado que é de 5,015 ml. Brown et al.<sup>71</sup> determinaram um valor de  $\bar{v}_2$  igual a  $0,643 \pm 0,002 \text{ cm}^3/\text{g}$  para uma amostra de dextrana T 70 e verificaram ainda que  $\bar{v}_2$  é independente da concentração na faixa de concentração abaixo de 35% (m/m).

## 2.5. Experimentos de Osmossedimentação

### 2.5.1. Metodologia

Os experimentos de osmosedimentação, sob gravidade, foram feitos em células de diálise, construídas com quatro placas de acrílico de 6 mm e de 25 cm de altura (figura 10). As duas placas interiores apresentam compartimentos interligados através de um pequeno canal. Entre as placas de acrílico foi colocado um filme de polietileno para melhor acomodação destas e

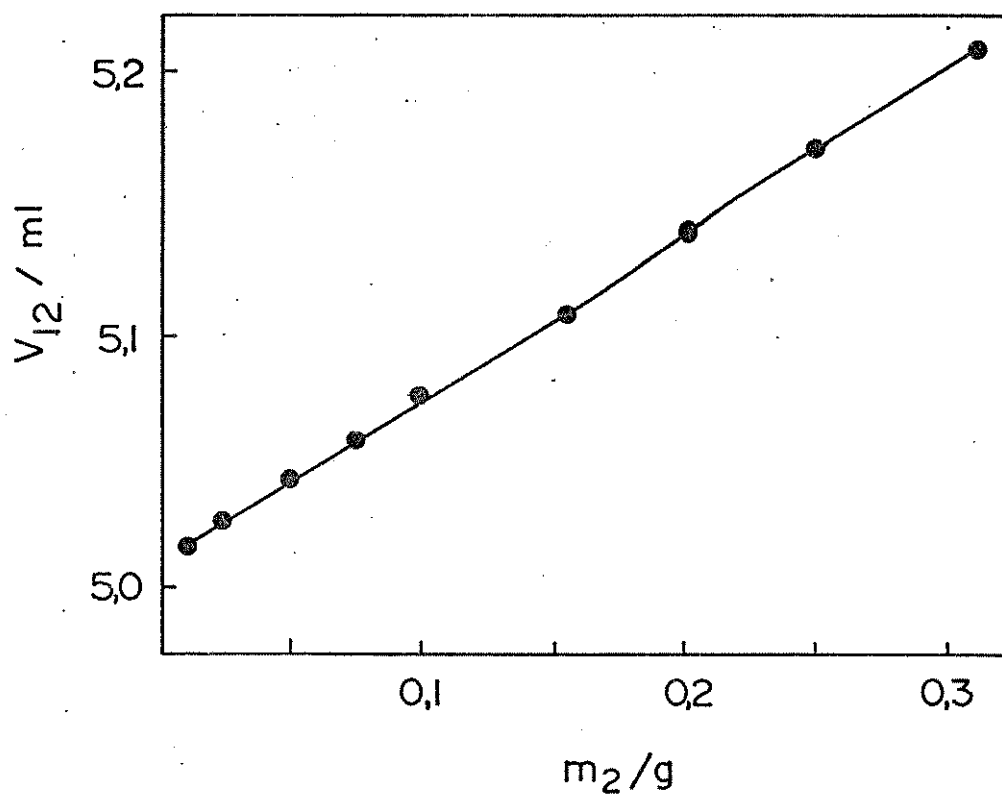


FIGURA 9. Relação entre volume de solução (massa do solvente constante e igual a 5,0000 g) e massa do soluto, para solução aquosa de dextrana a  $(25,0 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}$ .

TABELA III. Volume total de soluções de dextrana de concentração variável.

| Massa de dextrana (g) | Densidade da <sup>a</sup> solução (g/cm <sup>3</sup> ) | Volume total (ml) |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|-------------------|
| 0,01317               | 0,998003                                               | 5,02320           |
| 0,02659               | 0,999011                                               | 5,03157           |
| 0,05255               | 1,000911                                               | 5,04796           |
| 0,07571               | 1,002640                                               | 5,06235           |
| 0,10215               | 1,004604                                               | 5,07876           |
| 0,15488               | 1,008593                                               | 5,11096           |
| 0,20126               | 1,011476                                               | 5,14225           |
| 0,24755               | 1,015001                                               | 5,17000           |
| 0,31154               | 1,018837                                               | 5,21334           |

<sup>a</sup> Determinada a  $(25,0 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}$ .

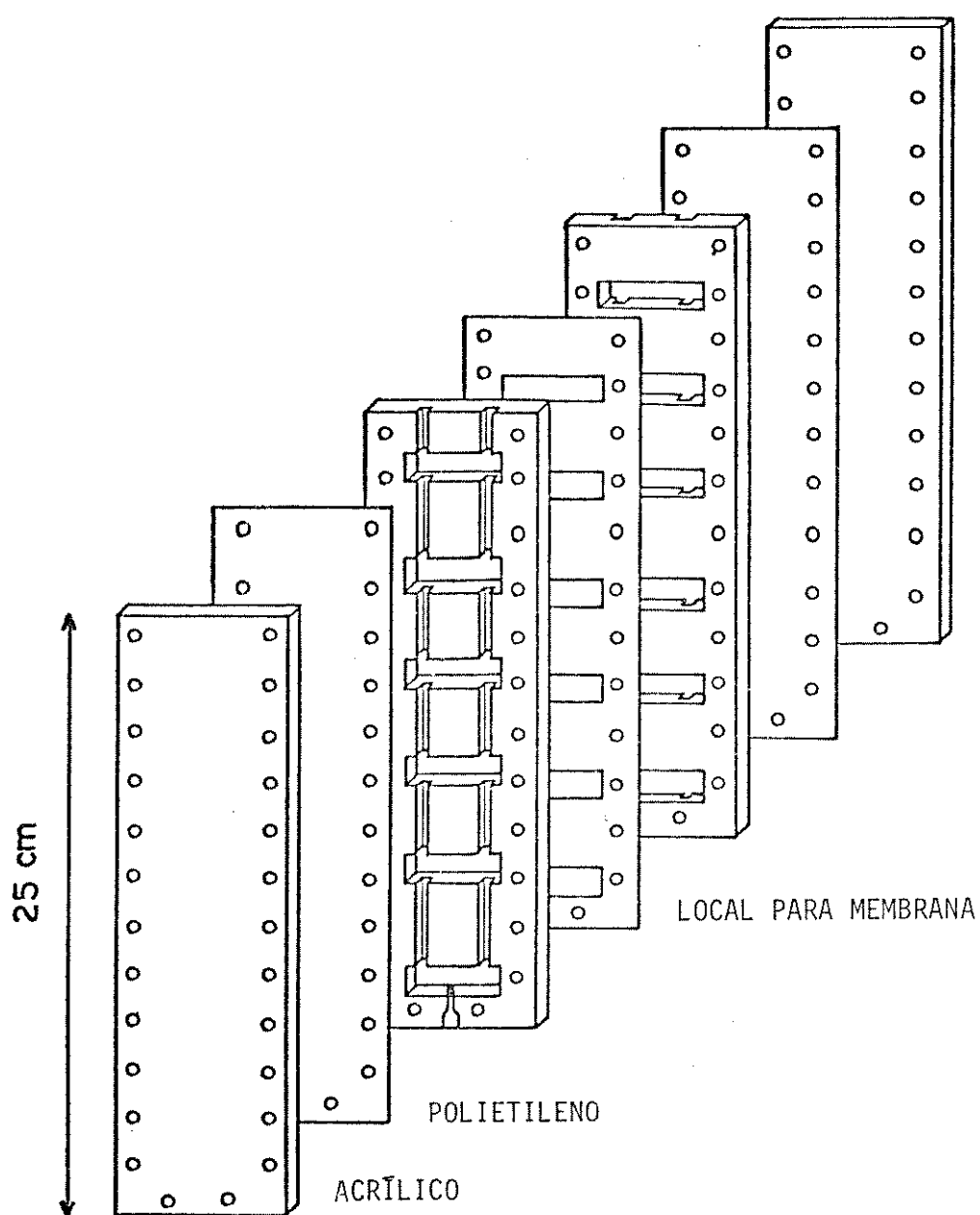


FIGURA 10. Célula para ser utilizada em experimentos de osmossedimentação, sob gravidade.

evitar que ocorresse vazamento. A membrana semipermeável de acetato de celulose divide a célula em dois lados. Em um dos lados foi colocada a solução a ser estudada e no outro, o solvente. Por solvente, entende-se água e demais componentes micromoleculares do meio no qual o macrossoluto em estudo foi dissolvido. As diversas amostras de dextranas foram dissolvidas numa solução aquosa de timerosal a 100 ppm, para evitar contaminação com fungos.

As células contendo solução e solvente foram mantidas em banhos termostatizados e após um determinado tempo foi drenado o conteúdo dos seus diversos compartimentos, utilizando-se uma bomba peristáltica de quatro canais. Determinou-se a densidade, a 25,0°C, de cada uma das amostras contidas nos diversos compartimentos, desprezando-se a solução contida nos canais que os interligavam. A partir das determinações de densidade das soluções, foi calculada a sua concentração<sup>72</sup> através da equação 35, onde  $\rho$  é a densidade,  $\bar{v}$  é o volume específico parcial,  $c$  é a concentração e os índices 1 e 2 denotam solvente e soluto respectivamente.

$$c_2 = \frac{\rho_{12} - \rho_1}{1 - \rho_1 \bar{v}_2} \quad (35)$$

As unidades da densidade e da concentração são g/cm<sup>3</sup> e do volume específico parcial cm<sup>3</sup>/g e o erro na determinação da densidade é de  $2 \times 10^{-3} \%$ .

### 2.5.2. Alcance do Equilíbrio de Difusão-sedimentação

Um dos objetivos deste trabalho foi verificar se experimentos de osmosedimentação conduzem ao estado de equilíbrio de difusão-sedimentação. Os estudos para esta verificação fo-

ram feitos através de dois tipos diferentes de experimentos de osmossedimentação. No primeiro tipo, denotado por experimento do tipo A, a solução em estudo a uma dada concentração  $c$  foi colocada num lado da célula de diálise (figura 10), contendo solvente no outro lado. Em outro tipo de experimento, do tipo B, a solução de concentração igual a  $2c$ , foi colocada na parte inferior de um dos lados da célula e o solvente na metade superior desse mesmo lado e também no outro lado.

Foram feitos experimentos do tipo A e do tipo B com dextrana T500 (Pharmacia Fine Chemicals) e dextrana de  $\bar{M}_w$  nominal  $2 \times 10^6$  (Sigma). A concentração de dextrana nos seis compartimentos de um mesmo lado da célula foi determinada através da leitura da densidade, a diferentes tempos. Tomando-se a razão da concentração do macrossoluto a 1,0 e 21,0 cm abaixo do topo da coluna, foi observada uma variação dos valores iniciais desta razão de 1,00 (tipo A) e zero (tipo B) para o valor final, em ambos os casos, de 0,88 após 120 horas, para dextrana T 500, a  $20^\circ\text{C}$  (figura 11).

As razões entre as concentrações nos dois compartimentos extremos em função do tempo de cada experimento são apresentadas na tabela IV. A figura 12 mostra as curvas resultantes, para experimentos dos dois tipos, de razões de concentrações nos compartimentos mais afastados e também entre os mais próximos em função do tempo. Como era de se esperar, o tempo necessário para que o mesmo valor final da razão de concentração fosse obtido, em experimentos do tipo B, foi maior do que em experimentos do tipo A, pois no primeiro caso o sistema em seu estado inicial encontrava-se bem mais afastado do estado de equilíbrio. Observação semelhante é válida para a análise das cur-

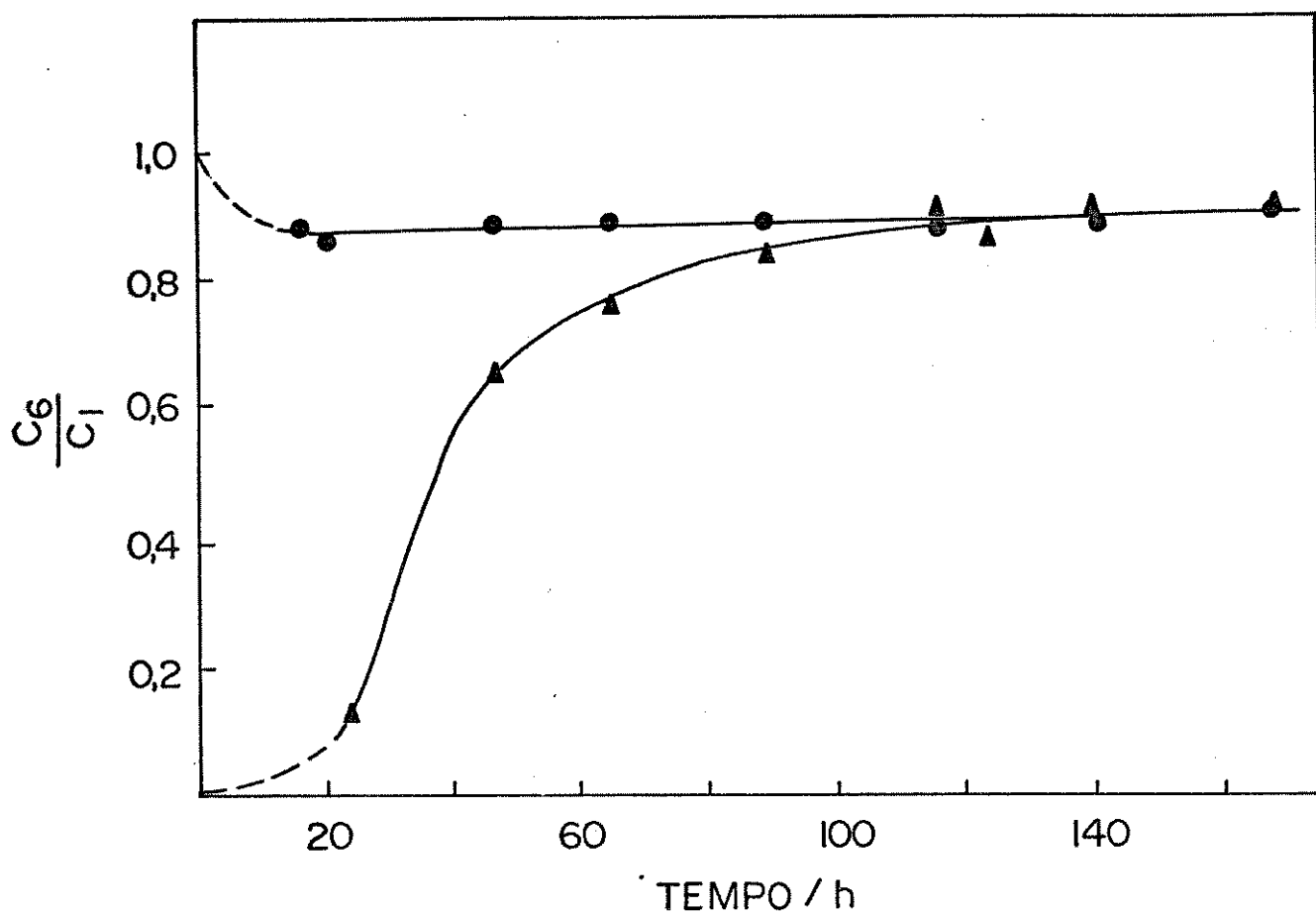


FIGURA 11. Razão das concentrações de dextrana T 500 no compartimento superior ( $c_g$ ) e inferior ( $c_l$ ) da célula de osmossedimentação como função do tempo. Condições iniciais: (▲) solução de concentração  $\underline{c}$  no lado da solução, (●) metade inferior do lado da solução contendo solução de concentração  $\underline{2c}$  e metade superior com solvente.  $t = 20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

TABELA IV. Razão de concentrações de dextrana T 500 nos vários compartimentos das células de osmossedimentação nos experimentos do tipo A e B em função do tempo. Resultados de experimentos individuais.

$t = (20,0 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}.$

| Tipo de exp. | Tempo (h) | $c_6/c_1$ | $c_5/c_2$ | $c_4/c_3$ |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| B            | 263,0     | 0,910     | 0,985     | 0,996     |
| B            | 261,0     | 0,879     | 0,959     | 0,990     |
| A            | 233,0     | 0,881     | 0,975     | 0,993     |
| B            | 234,0     | 0,845     | 0,972     | 0,994     |
| B            | 118,0     | 0,860     | 0,959     | 0,987     |
| A            | 118,0     | 0,917     | 0,965     | 0,991     |
| B            | 76,0      | 0,197     | 0,949     | 0,990     |
| B            | 79,0      | 0,573     | 0,916     | 0,969     |
| A            | 79,0      | 0,845     | 0,965     | 0,984     |
| B            | 54,5      | 0,028     | 0,832     | 0,979     |
| A            | 54,5      | 0,904     | 0,974     | 0,992     |
| B            | 48,0      | 0,155     | 0,891     | 0,975     |
| B            | 27,0      | 0,010     | 0,017     | 0,836     |
| A            | 18,0      | 0,849     | 0,952     | 0,986     |
| B            | 10,0      | 0,008     | 0,011     | 0,825     |
| A            | 10,0      | 0,881     | 0,957     | 0,986     |
| B            | 4,0       | 0,009     | 0,013     | 0,396     |
| A            | 4,0       | 0,860     | 0,946     | 0,985     |

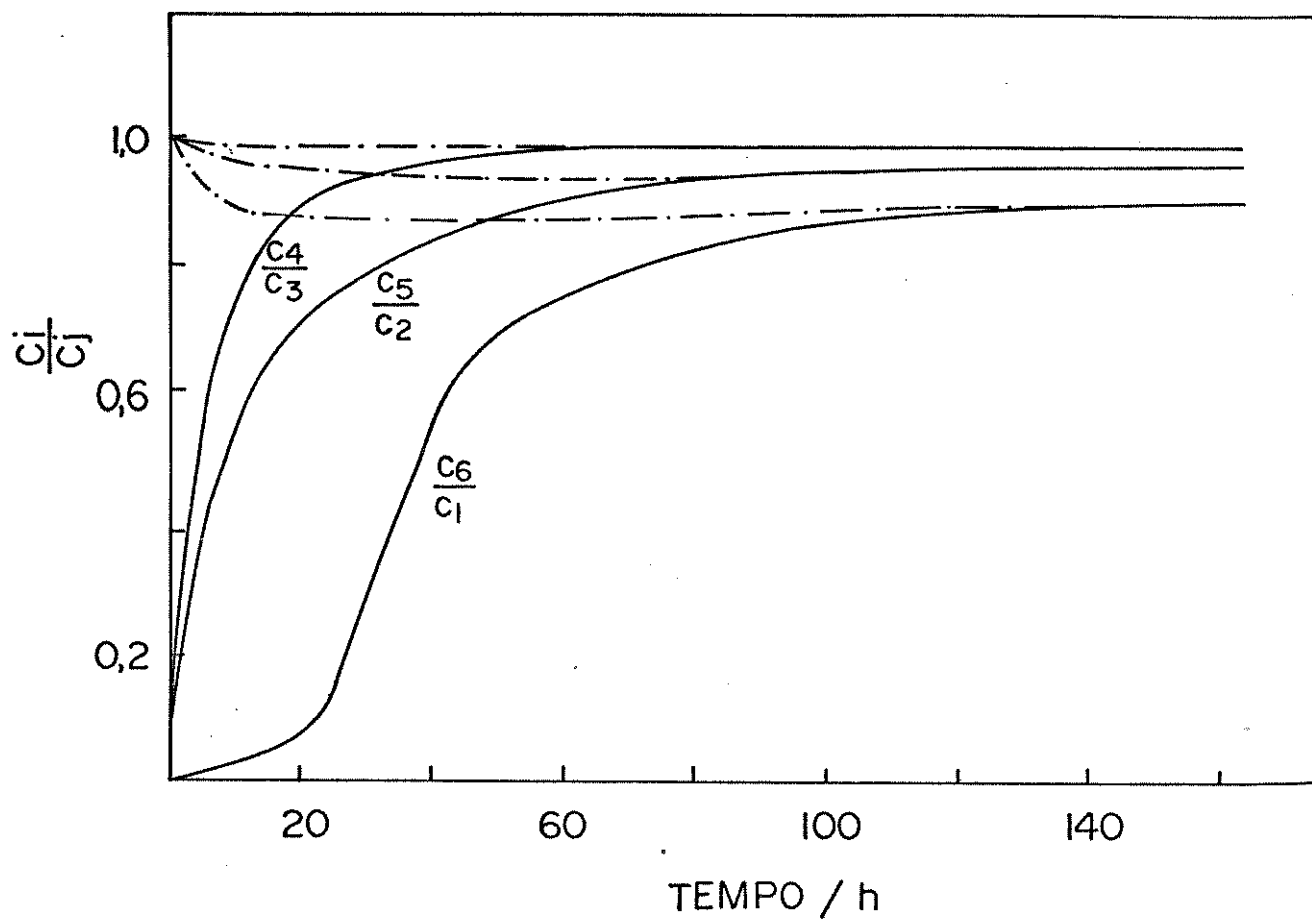


FIGURA 12. Razão das concentrações de dextrana T 500 nos diversos compartimentos da célula de osmosedimentação como função do tempo, a 20,0°C.

Experimento: (—) tipo B.

(---) tipo A.

vas das razões de concentrações entre compartimentos mais afastados e mais próximos.

Procedimento análogo foi seguido para o estudo do alcance do equilíbrio com amostra de dextrana ( $\bar{M}_w$  nominal  $2 \times 10^6$  segundo o fabricante), na temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Os resultados são apresentados na tabela V e o gráfico da razão de concentrações das frações extremas em função do tempo está na figura 13.

### 2.5.3. Determinação de $\bar{M}_w$ , $A_2$ e $\chi$

#### 2.5.3.1. Dextrana T 500

Experimentos de osmossedimentação do tipo A, isto é, iniciados com solução de concentração uniforme, sob gravidade, foram feitos com dextrana T 500 nas temperaturas de  $5,5^\circ\text{C}$ ,  $20,0^\circ\text{C}$  e  $40,0^\circ\text{C}$ . Após um tempo superior a 20 horas as amostras foram retiradas e foi determinada a concentração do soluto (através da leitura da densidade) em cada compartimento. A figura 14 apresenta um gráfico de logarítmo de concentração em função da profundidade para dois experimentos de osmossedimentação, na temperatura de  $5,5^\circ\text{C}$ .

Observa-se que o sistema comporta-se de maneira não ideal. Neste caso (soluto polidisperso, não ideal), aplica-se o tratamento descrito por Williams et al.<sup>41</sup>. A equação 17 desta referência é

$$\bar{M}_{ap} = \frac{RT}{(1-\bar{v}_p)gz} \times \frac{\Delta c}{\bar{c}} \quad (36)$$

onde,  $z$  é a profundidade a partir do topo da célula e  $\bar{c}$  é a concentração média do macrossoluto.

UNICAMP  
FÍSICA (1974)

TABELA V. Razão de concentrações de dextrana D 5376 (Sigma) nos vários compartimentos das células de osmossedimentação nos experimentos do tipo A e B em função do tempo. Resultados de experimentos individuais.

$t = (25,0 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}.$

| Tipo de exp. | Tempo (h) | $c_6/c_1$ | $c_5/c_2$ | $c_4/c_3$ |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| B            | 168,0     | 0,905     | 0,955     | 0,989     |
| A            | 167,0     | 0,910     | 0,968     | 0,988     |
| A            | 141,0     | 0,880     | 0,962     | 0,990     |
| B            | 140,0     | 0,907     | 0,965     | 0,991     |
| B            | 124,5     | 0,853     | 0,936     | 0,994     |
| B            | 116,0     | 0,902     | 0,969     | 0,991     |
| A            | 116,0     | 0,880     | 0,947     | 0,987     |
| B            | 88,5      | 0,837     | 0,940     | 0,982     |
| A            | 88,5      | 0,886     | 0,964     | 0,990     |
| A            | 65,0      | 0,890     | 0,962     | 0,993     |
| B            | 65,0      | 0,751     | 0,921     | 0,979     |
| A            | 47,0      | 0,882     | 0,968     | 0,992     |
| B            | 47,0      | 0,645     | 0,859     | 0,955     |
| B            | 24,0      | 0,125     | 0,736     | 0,924     |
| A            | 22,0      | 0,860     | 0,963     | 0,990     |
| A            | 17,0      | 0,882     | 0,965     | 0,985     |

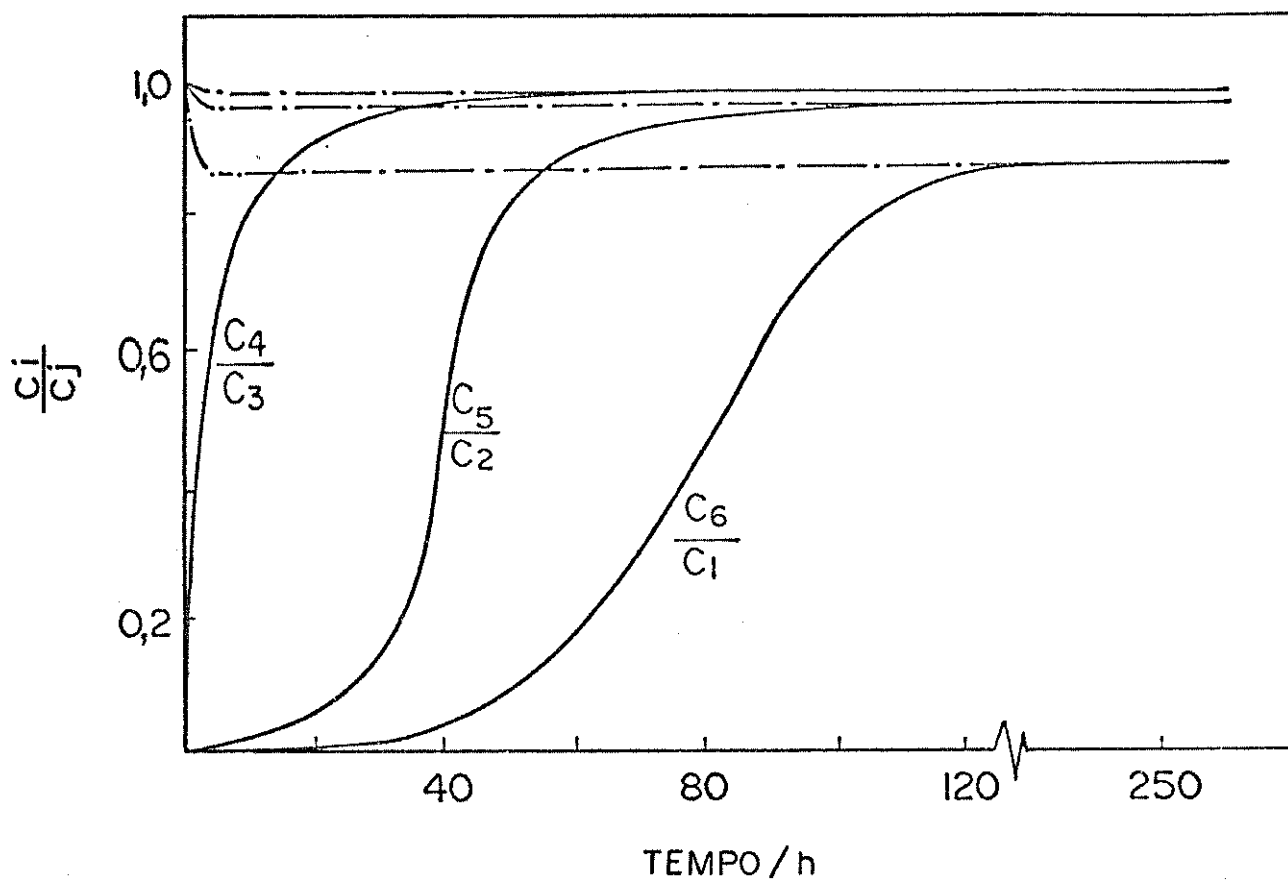


FIGURA 13. Razão das concentrações de dextrana D5376 (Sigma), nos diversos compartimentos da célula de osmossedimentação como função do tempo, a 25,0°C.  
 Experimento: (---) tipo A.  
 (—) tipo B.

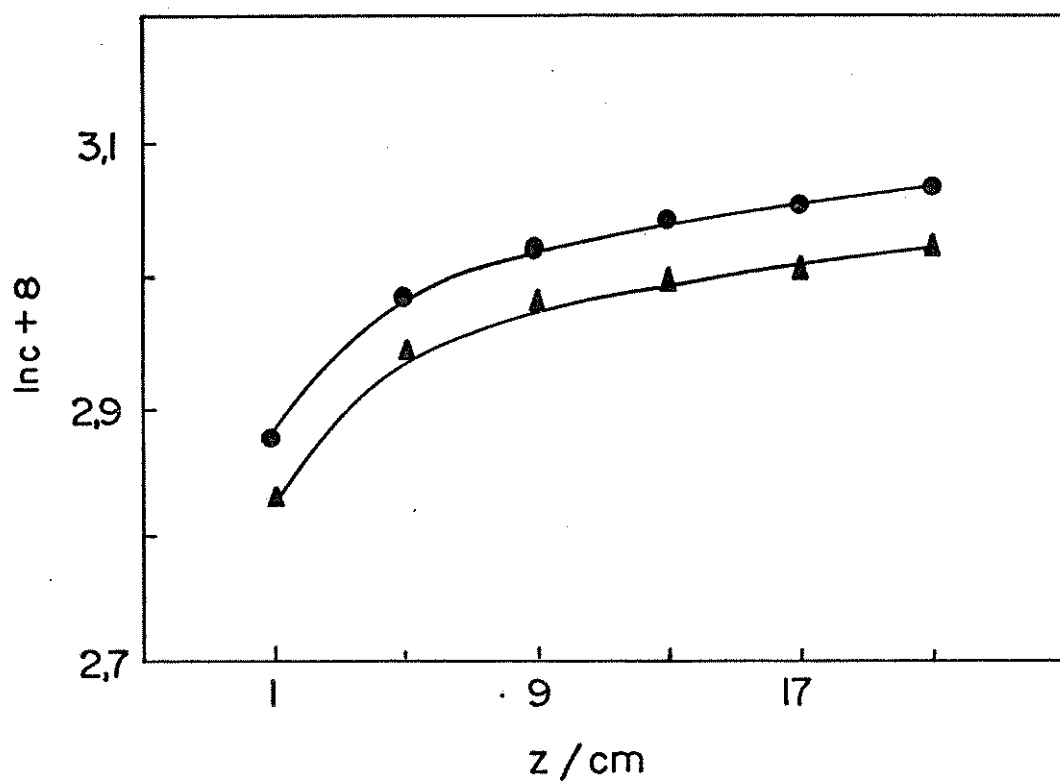


FIGURA 14. Logarítmo da concentração da solução aquosa de dextrana T 500 em função da profundidade, a  $5,5^{\circ}\text{C}$ .

(●)  $\bar{c} = 6,8 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$

(▲)  $\bar{c} = 6,5 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$

As tabelas VI, VII e VIII apresentam o inverso do peso molecular médio aparente, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações médias de dextrana T 500 nas temperaturas de 5,5°C, 20,0°C e 40,0°C respectivamente.

O peso molecular médio à diluição infinita e o coeficiente de virial são obtidos<sup>41</sup> a partir da equação 37 (equação 18 da ref. 41):

$$\frac{1}{\bar{M}_{ap}} = \frac{1}{\bar{M}_w} + A_2 \bar{c} \quad (37)$$

Na figura 15 são apresentados os valores do inverso do peso molecular médio aparente a diversas concentrações, onde as retas foram obtidas por regressão linear, utilizando-se um computador CP 500.

Para o cálculo do desvio dos coeficientes linear e angular<sup>73</sup>, resultantes da regressão linear dos pontos obtidos experimentalmente, utilizaram-se as equações 38 e 39 com um nível de confiança de 95%:

$$e.b = \frac{t_{n-2} \cdot s}{\left| \sum_i (X_i - \bar{X})^2 \right|^{1/2}} \quad (38)$$

$$e.a = t_{n-2} \cdot s \left| \frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{X})^2} \right|^{1/2} \quad (39)$$

onde

$$s = \left| \frac{\sum_i (Y_i - (b + a \cdot X_i))^2}{n - 2} \right|^{1/2} \quad (40)$$

A figura 15 mostra que os coeficientes lineares são coincidentes. Os valores de  $\bar{M}_w$  e do coeficiente de virial para cada temperatura estão listados na tabela IX. Os va

TABELA VI. Inverso do peso molecular médio aparente, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações médias de dextrana T 500.  $t = (5,5 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}$ .

| $\bar{c} \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_6 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_1 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{\rho}$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{M}_{ap} \times 10^{-5}$ | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^6$ |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 3,95                                          | 3,56                                      | 4,30                                      | 0,998490                             | 6,07                          | 1,65                                 |
| 4,10                                          | 3,58                                      | 4,35                                      | 0,998552                             | 6,04                          | 1,66                                 |
| 6,47                                          | 3,65                                      | 6,83                                      | 0,999424                             | 5,87                          | 1,70                                 |
| 6,48                                          | 5,66                                      | 6,85                                      | 0,999426                             | 5,92                          | 1,69                                 |
| 6,67                                          | 5,83                                      | 7,03                                      | 0,999496                             | 5,81                          | 1,72                                 |
| 6,80                                          | 5,98                                      | 7,16                                      | 0,999543                             | 5,59                          | 1,79                                 |
| 7,12                                          | 6,36                                      | 7,74                                      | 0,999661                             | 6,05                          | 1,65                                 |
| 7,25                                          | 6,44                                      | 7,87                                      | 0,999710                             | 6,33                          | 1,58                                 |
| 7,52                                          | 6,67                                      | 8,03                                      | 0,999810                             | 5,83                          | 1,72                                 |
| 7,63                                          | 6,76                                      | 8,11                                      | 0,999850                             | 5,70                          | 1,75                                 |
| 7,86                                          | 6,78                                      | 8,39                                      | 0,999936                             | 6,58                          | 1,52                                 |
| 10,18                                         | 9,18                                      | 11,15                                     | 1,000789                             | 6,25                          | 1,60                                 |
| 10,82                                         | 9,14                                      | 11,88                                     | 1,001023                             | 8,20                          | 1,22                                 |
| 11,13                                         | 9,69                                      | 11,77                                     | 1,001138                             | 6,03                          | 1,66                                 |
| 17,96                                         | 15,23                                     | 19,73                                     | 1,003649                             | 8,07                          | 1,24                                 |
| 18,66                                         | 16,93                                     | 21,26                                     | 1,003907                             | 7,53                          | 1,33                                 |
| 20,21                                         | 17,86                                     | 23,29                                     | 1,004476                             | 8,70                          | 1,15                                 |

coef. angular:  $-(0,34 \pm 0,10) \times 10^{-4}$

coef. linear:  $(1,9 \pm 0,1) \times 10^{-6}$

coef. correlação: 0,83

TABELA VII. Inverso do peso molecular aparente, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações médias de dextra- na T 500.  $t = (20,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ .

| $\bar{c} \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_6 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_1 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{\rho}$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{M}_{ap} \times 10^{-5}$ | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^6$ |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 4,03                                          | 3,64                                      | 4,16                                      | 0,998524                             | 4,38                          | 2,28                                 |
| 4,05                                          | 3,67                                      | 4,20                                      | 0,998534                             | 4,45                          | 2,24                                 |
| 6,28                                          | 5,72                                      | 6,53                                      | 0,999353                             | 4,37                          | 2,29                                 |
| 6,37                                          | 5,74                                      | 6,63                                      | 0,999387                             | 4,73                          | 2,11                                 |
| 6,39                                          | 5,92                                      | 6,62                                      | 0,999395                             | 3,71                          | 2,70                                 |
| 6,46                                          | 5,74                                      | 6,73                                      | 0,999411                             | 5,19                          | 1,93                                 |
| 7,44                                          | 6,80                                      | 7,71                                      | 0,999781                             | 4,14                          | 2,42                                 |
| 11,24                                         | 10,45                                     | 11,78                                     | 1,001176                             | 4,03                          | 2,48                                 |
| 11,50                                         | 10,81                                     | 11,88                                     | 1,001272                             | 3,18                          | 3,14                                 |
| 12,14                                         | 11,66                                     | 12,72                                     | 1,001510                             | 2,97                          | 3,37                                 |
| 12,40                                         | 11,59                                     | 12,88                                     | 1,001605                             | 3,53                          | 2,83                                 |
| 12,59                                         | 11,35                                     | 13,00                                     | 1,001675                             | 4,46                          | 2,24                                 |
| 12,70                                         | 11,65                                     | 13,29                                     | 1,001717                             | 4,40                          | 2,27                                 |
| 12,97                                         | 12,00                                     | 13,66                                     | 1,001815                             | 4,34                          | 2,31                                 |
| 14,88                                         | 13,93                                     | 15,43                                     | 1,002518                             | 3,43                          | 2,91                                 |
| 15,72                                         | 15,04                                     | 16,45                                     | 1,002827                             | 3,06                          | 3,26                                 |
| 16,78                                         | 15,48                                     | 17,39                                     | 1,003216                             | 3,88                          | 2,58                                 |
| 16,98                                         | 16,02                                     | 17,45                                     | 1,003290                             | 2,86                          | 3,49                                 |

coef. angular:  $(0,67 \pm 0,37) \times 10^{-4}$

coef. linear:  $(1,9 \pm 0,4) \times 10^{-6}$

coef. correlação: 0,62

TABELA VIII. Inverso do peso molecular aparente<sup>a</sup>, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações médias de dextrana T 500.  $t = (40,0 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}$ .

| $\bar{c} \times 10^3 \text{ g/ml}$ | $c_5 \times 10^3 \text{ g/ml}$ | $c_l \times 10^3 \text{ g/ml}$ | $\rho \text{ g/ml}$ | $\bar{M}_{ap} \times 10^{-5}$ | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^6$ |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 3,88                               | 3,72                           | 4,02                           | 0,998470            | 3,43                          | 2,91                                 |
| 3,96                               | 3,76                           | 4,03                           | 0,998490            | 3,05                          | 3,27                                 |
| 3,96                               | 3,80                           | 4,09                           | 0,998500            | 3,36                          | 2,97                                 |
| 4,07                               | 3,85                           | 4,19                           | 0,998540            | 3,79                          | 2,63                                 |
| 5,70                               | 5,46                           | 5,81                           | 0,999138            | 2,80                          | 3,57                                 |
| 5,87                               | 5,64                           | 6,03                           | 0,999203            | 2,99                          | 3,35                                 |
| 7,47                               | 7,21                           | 7,61                           | 0,999792            | 2,42                          | 4,14                                 |
| 7,55                               | 7,29                           | 7,71                           | 0,999820            | 2,50                          | 4,00                                 |
| 7,57                               | 7,28                           | 7,74                           | 0,999828            | 2,73                          | 3,66                                 |
| 10,87                              | 10,59                          | 11,14                          | 1,001043            | 2,27                          | 4,40                                 |
| 10,88                              | 10,69                          | 11,13                          | 1,001044            | 1,80                          | 5,50                                 |
| 10,95                              | 10,58                          | 11,17                          | 1,001070            | 2,42                          | 4,12                                 |
| 11,13                              | 10,86                          | 11,32                          | 1,001139            | 1,89                          | 5,29                                 |
| 12,91                              | 12,50                          | 13,10                          | 1,001792            | 2,10                          | 4,76                                 |

a)  $\Delta z = 16 \text{ cm}$ .

coef. angular :  $(2,45 \pm 0,63) \times 10^{-4}$

coef. linear :  $(2,0 \pm 0,5) \times 10^{-6}$

coef. correlação: 0,89.

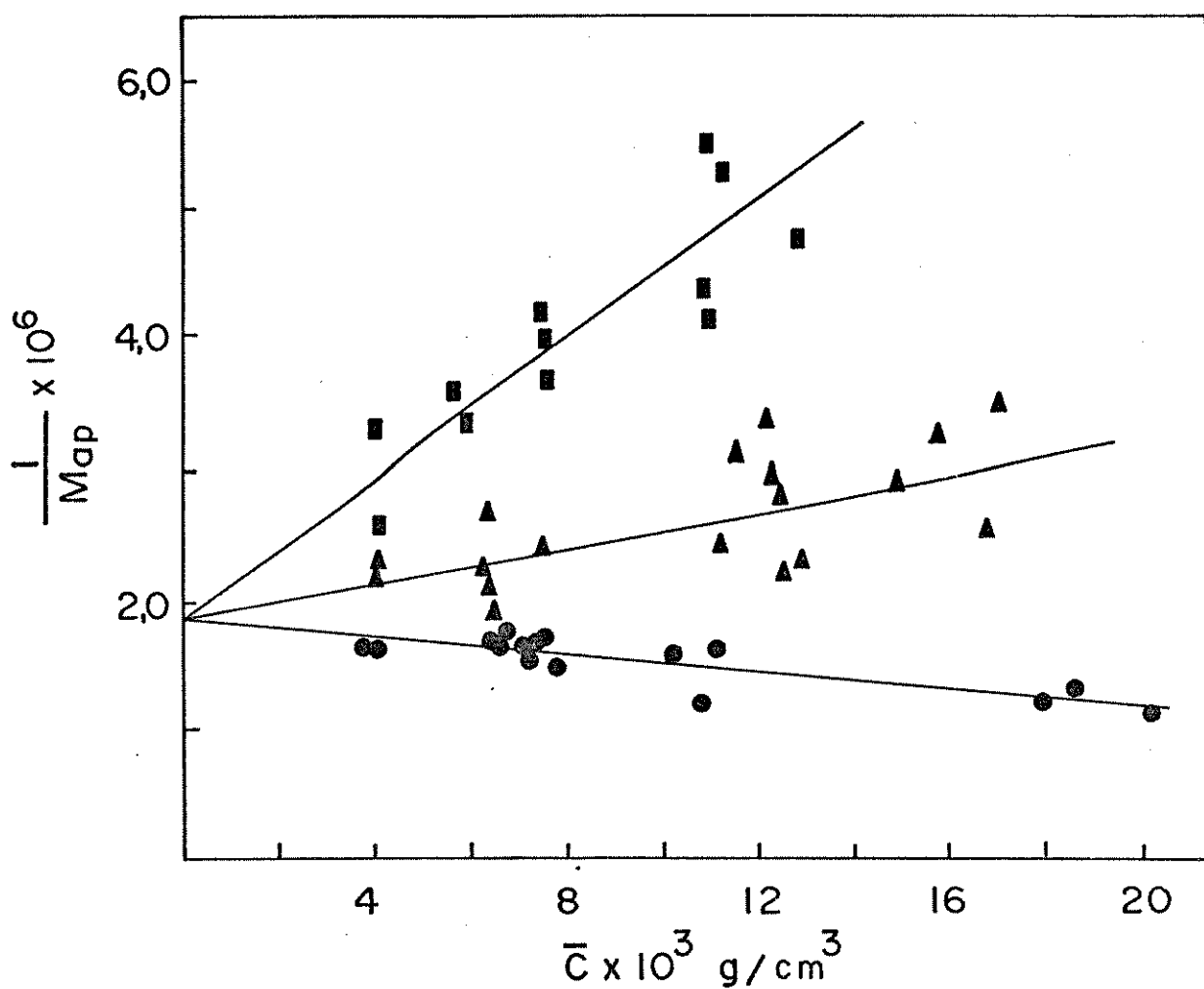


FIGURA 15. Inverso do peso molecular médio aparente em função da concentração média de dextrana T500 em solução aquosa. (●) 5,5°C. (▲) 20,0°C. (■) 40,0°C.

lores de  $A_2$  dados na tabela IX são da ordem de grandeza dos valores referidos na literatura<sup>74,75,76</sup>, e serão discutidos posteriormente.

Outro parâmetro físico-químico que pode ser determinado a partir destes dados é a temperatura  $\theta$ . Do gráfico de  $(1/2 - X)$  em função do inverso da temperatura absoluta, conforme equação 11, resulta uma temperatura  $\theta$  de 283,4 K para esta amostra de dextrana.

TABELA IX

| Temp °C | $\bar{M}_w \times 10^{-5}$ | $A_2 \times 10^4$ | $X$    |
|---------|----------------------------|-------------------|--------|
| 5,5     | $5,3 \pm 0,3$              | $-0,34 \pm 0,10$  | 0,5015 |
| 20,0    | $5,3 \pm 1,2$              | $0,67 \pm 0,37$   | 0,4970 |
| 40,0    | $5,0 \pm 1,2$              | $2,48 \pm 0,63$   | 0,4889 |

Unidades de  $A_2$ ,  $\text{cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$ .

#### 2.5.3.2. Tiroglobulina

Com o objetivo de estender o estudo a sistemas monodispersos, que apresentassem comportamento muito próximo ao ideal, passou-se a analisar o gradiente de concentração de soluções aquosas de tiroglobulina em  $\text{KNO}_3$  0,1 M, pH = 5,8. Neste meio a tiroglobulina apresenta-se na forma nativa, denotada na literatura por S-19, com um peso molecular<sup>77</sup> de  $6,7 \times 10^5$ . As concentrações iniciais das soluções variaram de 1,3 a 0,7% de proteína e a solução de nitrato de potássio antes de ser utilizada foi esterelizada por ultrafiltração, em membrana de aceta-

to de celulose. O tempo de cada experiência de osmossedimentação foi de 120 horas e a temperatura de  $20,0^{\circ}\text{C}$ .

As amostras da solução de tiroglobulina e do solvente foram retiradas da célula de diálise e analisadas num espectrofotômetro, a 280 nm, após serem diluídas, tomando-se 0,2 ml da solução com uma pipeta volumétrica e adicionando-se 3 ml de solvente com uma bureta de pistão Metrohm AG Herisau de 10 ml. O espectro UV, de uma amostra retirada do compartimento da solução (diluído 16 vezes) e o de uma amostra retirada do compartimento de solvente sem diluição são apresentados na figura 16.

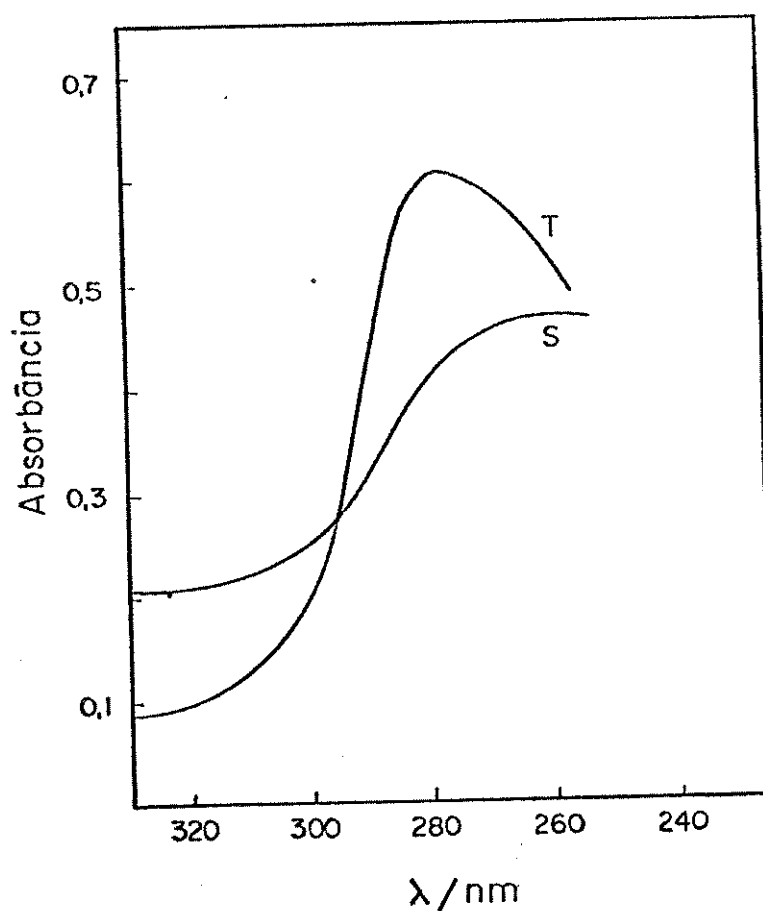


FIGURA 16. Espectro UV de uma solução de tiroglobulina (T), diluída 16 vezes e do solvente (S), sem diluição e recuperado após um experimento de osmossedimentação.

O espectro UV da amostra do solvente mostra a existência de um contaminante de peso molecular pequeno que atravessa a membrana durante a experiência.

Na figura 17 são apresentados gradientes de concentração obtidos em dois experimentos de osmossedimentação de tiroglobulina. Os pontos experimentais apresentam uma boa linearidade, sendo o desvio relativo nas medidas de concentração devido às leituras fotométricas, de 6%. Utilizou-se a equação barométrica (equação 41), para determinar o peso molecular da proteína nas condições anteriormente citadas,

$$\frac{d \ln c}{dz} = \frac{M (1 - \bar{v} \rho) g}{RT} \quad (41)$$

O primeiro termo da equação 41 foi obtido da inclinação da curva, por regressão linear do logarítmo da absorbância em função da profundidade, a 20,0°C, sob gravidade, com volume específico parcial da tiroglobulina igual a 0,713 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> e densidade da solução determinada diretamente, no densímetro. As condições de pH e força iônica, foram aquelas nas quais, segundo Edelhoch<sup>77</sup>, a proteína encontra-se numa proporção maior do que 95% na forma S-19 e menor do que 5% na forma de S-12, ou seja, uma fração muito pequena com menor peso molecular. A tabela X, apresenta o peso molecular obtido de diversos experimentos de osmossedimentação da tiroglobulina, resultando um valor médio de (7,1 ± 0,5) x 10<sup>5</sup>, em concordância com o valor apresentado na literatura.

#### 2.5.3.3. Dextrana ICN Pharmaceuticals

Com o objetivo de se estudar o comportamento de macrossolutos de pesos moleculares elevados, passou-se a

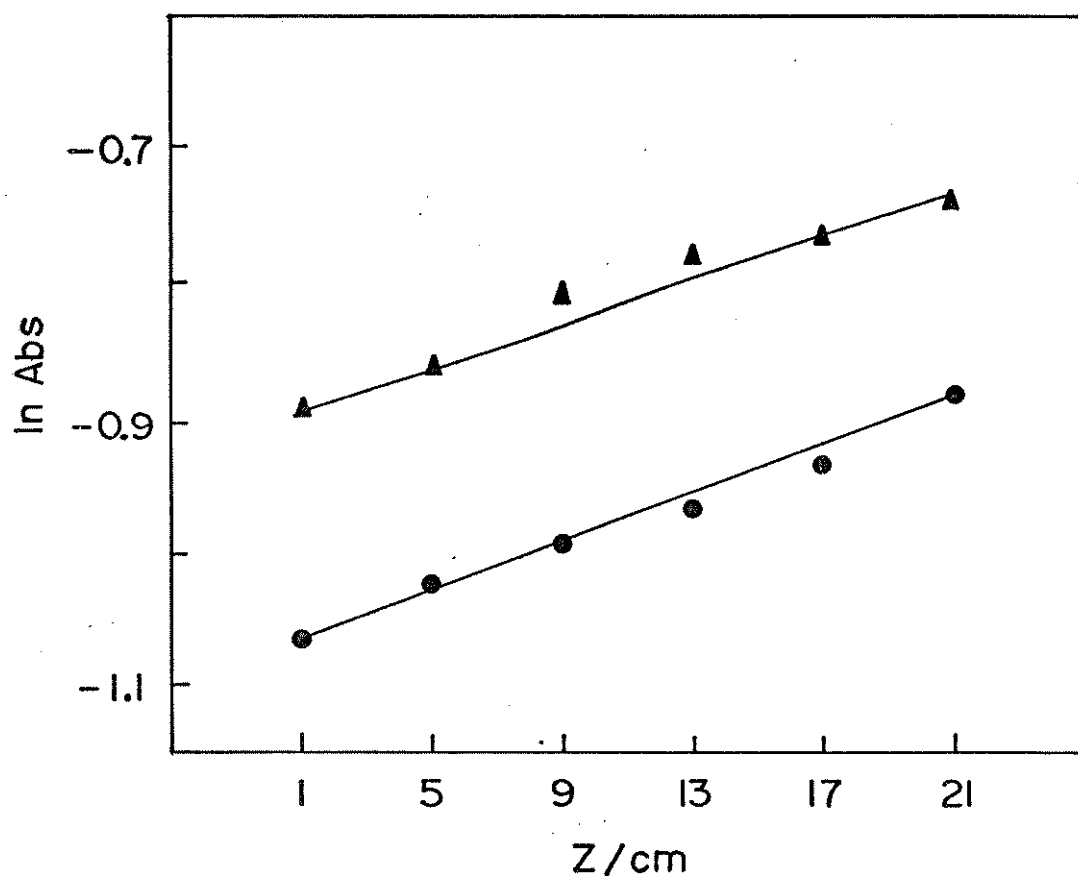


FIGURA 17. Logarítmo da absorbância (280 nm) em função da profundidade na célula de osmossedimentação. Solução aquosa de Tiroglobulina, em  $\text{KNO}_3$  0,1 M, pH 5,8 e  $t = 20,0^\circ\text{C}$ .  
 (▲)  $\bar{c} = 3,0 \times 10^{-3}$  g/ml.  
 (●)  $\bar{c} = 5,4 \times 10^{-3}$  g/ml.

TABELA X. Peso molecular da tiroglobulina calculado a partir da equação barométrica (equação 41), a 20,0°C.

| Conc. (g/100 ml) | M x 10 <sup>-5</sup> |
|------------------|----------------------|
| 1,3              | 7,0                  |
| 1,3              | 6,2                  |
| 0,6              | 7,3                  |
| 0,7              | 7,5                  |
| 0,8              | 6,4                  |
| 0,6              | 8,2                  |
| 0,3              | 7,1                  |

utilizar nos experimentos de osmossedimentação solução de dex - trana de peso molecular nominal na faixa de 5 a 40 x 10<sup>6</sup>. O pro - cedimento seguido foi análogo ao descrito anteriormente para as amostras de dextrana T 500. As experiências foram feitas a 25°C, sob gravidade, durante 48 horas. O peso molecular aparente cal - culado para cada experimento à diversas concentrações está lis - tado na tabela XI. A figura 18 apresenta o inverso do peso mo - lecular aparente em função da concentração média de dextrana. Da regressão linear dos pontos obtidos experimentalmente tem-se o coeficiente linear  $(8,32 \pm 7,10) \times 10^{-7}$  que corresponde a um  $\bar{M}_w = (12,0 \pm 10,3) \times 10^6$  e o coeficiente de virial igual a  $(9,03 \pm 0,97) \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$ .

#### 2.5.3.4. Dextrana D 5376

Outra amostra estudada foi uma dextrana for - necida pela Sigma, de peso molecular igual a  $2 \times 10^6$ , segundo o fabricante. Esta amostra foi estudada em solução aquosa, sob

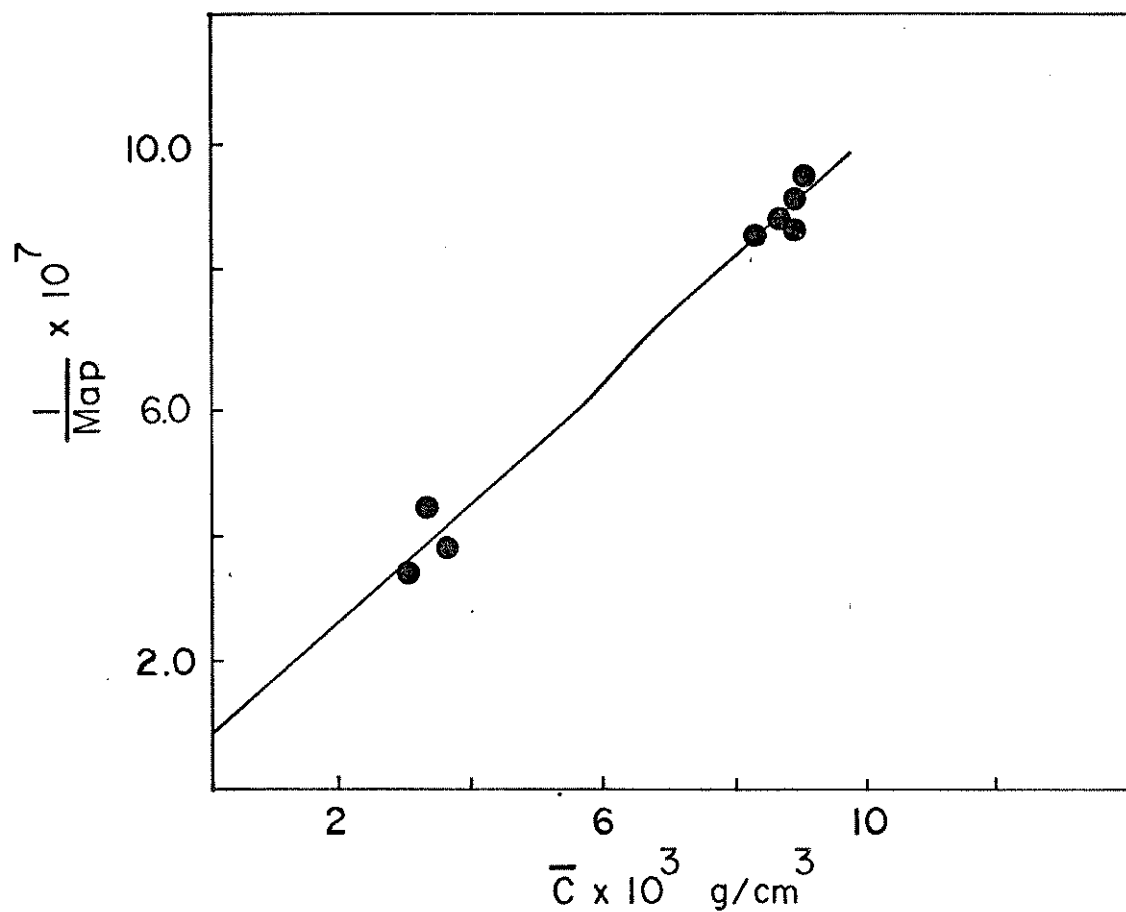


FIGURA 18. Inverso do peso molecular aparente em função da concentração média para amostra de dextrana de peso molecular nominal de  $5 \text{ a } 40 \times 10^6$ ,  $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ . Cada ponto corresponde a um experimento individual.

TABELA XI. Inverso do peso molecular médio aparente, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações médias de dextrana ( $\bar{M} = 5$  a  $40 \times 10^6$ ).  $t = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ .

| $\bar{c} \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_6 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_7 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{\rho}$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{M}_{ap} \times 10^{-6}$ | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^7$ |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 3,11                                          | 4,35                                      | 1,72                                      | 0,998187                             | 2,90                          | 3,44                                 |
| 3,42                                          | 4,34                                      | 2,12                                      | 0,998303                             | 2,23                          | 4,49                                 |
| 3,70                                          | 5,10                                      | 2,29                                      | 0,998405                             | 2,61                          | 3,83                                 |
| 8,41                                          | 9,65                                      | 6,78                                      | 1,000138                             | 1,18                          | 8,49                                 |
| 8,84                                          | 10,00                                     | 7,11                                      | 1,000294                             | 1,13                          | 8,83                                 |
| 9,06                                          | 10,42                                     | 7,39                                      | 1,000377                             | 1,15                          | 8,67                                 |
| 9,07                                          | 10,33                                     | 7,45                                      | 1,000379                             | 1,10                          | 9,13                                 |
| 9,17                                          | 10,59                                     | 7,40                                      | 1,000415                             | 1,20                          | 8,32                                 |

coef. angular:  $(9,03 \pm 0,97) \times 10^{-4}$

coef. linear:  $(8,32 \pm 7,10) \times 10^{-7}$

coef. correlação: 0,99

gravidade, de maneira análoga às anteriores. Os valores do peso molecular aparente para diversas concentrações a  $10,0^\circ\text{C}$ ,  $16,0^\circ\text{C}$  e  $25,0^\circ\text{C}$  são apresentados nas tabelas XII, XIII, XIV respectivamente. A figura 19 mostra o inverso do peso molecular aparente em função da concentração média na temperatura de  $10,0^\circ\text{C}$ . Os valores obtidos do coeficiente linear, nas três temperaturas, através de regressão linear dos pares ordenados,  $\frac{1}{\bar{M}_{ap}}$  vs concentração, são coincidentes (figura 20) e estão listados na tabela XV juntamente com os coeficientes de virial, parâmetro de Flory-Huggins e o peso molecular médio em peso, calculado à concentração zero.

Para esta amostra de dextrana, a temperatura  $\theta$  estimada a partir da equação 11 foi de  $280,5$  K.

TABELA XII. Inverso do peso molecular aparente, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações médias de dextrana D 5376 (lote nº 38C-0123), sob gravidade.  
 $t = (10,0 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}.$

| $\bar{c} \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_6 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_1 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{\rho}$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{M}_{ap} \times 10^{-5}$ | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^6$ |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 2,98                                          | 2,58                                      | 3,24                                      | 0,998140                             | 7,24                          | 1,38                                 |
| 3,29                                          | 2,84                                      | 3,54                                      | 0,998252                             | 6,95                          | 1,44                                 |
| 3,32                                          | 2,84                                      | 3,50                                      | 0,998265                             | 6,47                          | 1,55                                 |
| 3,40                                          | 2,92                                      | 3,61                                      | 0,998292                             | 6,63                          | 1,51                                 |
| 4,33                                          | 3,62                                      | 4,58                                      | 0,998636                             | 7,21                          | 1,39                                 |
| 4,89                                          | 4,34                                      | 5,28                                      | 0,998841                             | 6,31                          | 1,59                                 |
| 5,34                                          | 4,71                                      | 5,81                                      | 0,999006                             | 6,73                          | 1,49                                 |
| 5,47                                          | 4,68                                      | 5,86                                      | 0,999054                             | 7,06                          | 1,42                                 |
| 5,89                                          | 5,18                                      | 6,28                                      | 0,999208                             | 6,15                          | 1,63                                 |
| 6,04                                          | 5,23                                      | 6,34                                      | 0,999264                             | 6,02                          | 1,66                                 |
| 7,89                                          | 6,98                                      | 8,59                                      | 0,999944                             | 6,68                          | 1,50                                 |
| 8,02                                          | 6,96                                      | 8,56                                      | 0,999993                             | 6,53                          | 1,53                                 |
| 8,45                                          | 7,22                                      | 8,94                                      | 1,000142                             | 6,65                          | 1,50                                 |
| 12,68                                         | 11,32                                     | 13,36                                     | 1,001708                             | 5,28                          | 1,89                                 |
| 13,07                                         | 11,21                                     | 13,77                                     | 1,001850                             | 6,42                          | 1,56                                 |

coef. angular:  $(0,24 \pm 0,16) \times 10^{-4}$

coef. linear:  $(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-6}$

coef. correlação: 0,60

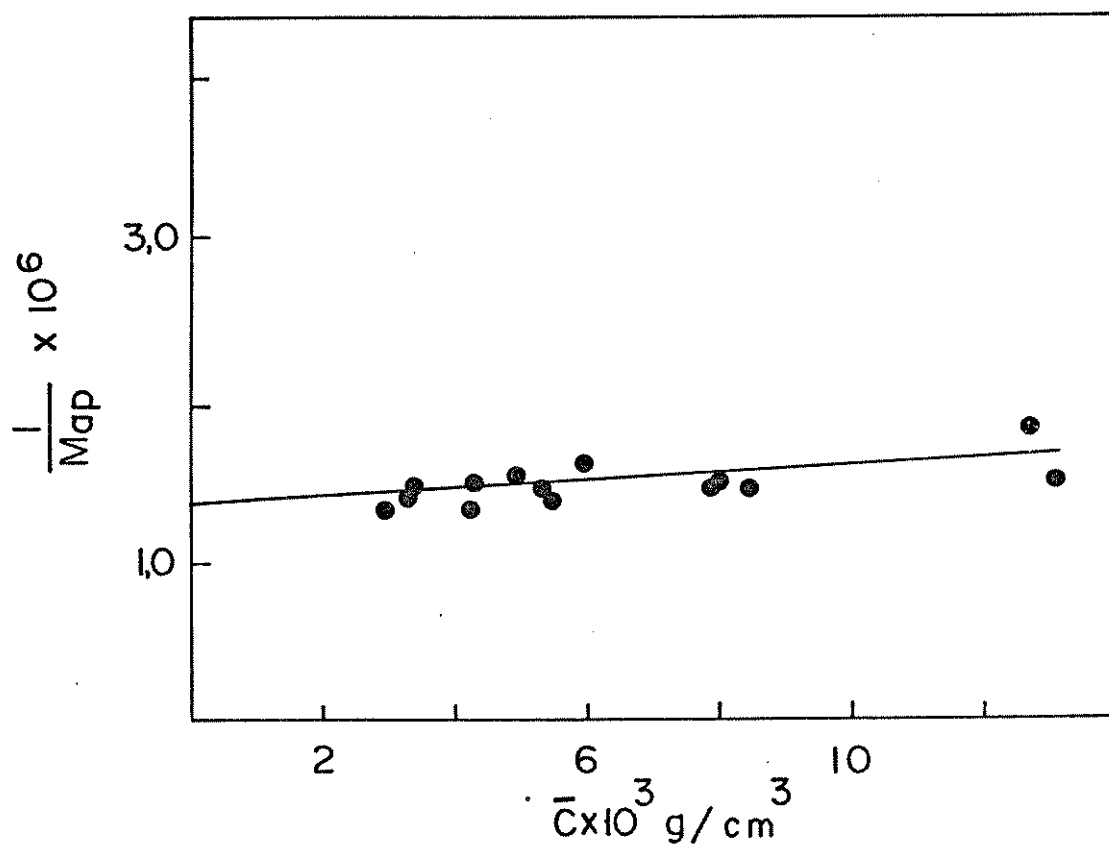


FIGURA 19. Inverso do peso molecular aparente em função da concentração para amostra de dextrana D 5376, 10°C. Cada ponto corresponde a um experimento individual.

TABELA XIII. Inverso do peso molecular aparente, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações médias de dextrana D 5376 (lote nº 38C-0123), sob gravidade.  
 $t = (16,0 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}$ .

| $\bar{c} \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_6 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_1 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{\rho}$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{M}_{ap} \times 10^{-5}$ | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^6$ |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 2,38                                          | 2,06                                      | 2,53                                      | 0,997919                             | 6,66                          | 1,50                                 |
| 2,45                                          | 2,15                                      | 2,59                                      | 0,997943                             | 6,07                          | 1,65                                 |
| 3,29                                          | 2,84                                      | 3,53                                      | 0,998254                             | 6,97                          | 1,43                                 |
| 3,39                                          | 2,99                                      | 3,60                                      | 0,998289                             | 6,06                          | 1,65                                 |
| 4,77                                          | 4,18                                      | 5,04                                      | 0,998799                             | 5,98                          | 1,67                                 |
| 4,94                                          | 4,34                                      | 5,22                                      | 0,998862                             | 5,95                          | 1,68                                 |
| 8,20                                          | 7,16                                      | 8,72                                      | 1,000060                             | 6,33                          | 1,58                                 |
| 8,39                                          | 7,48                                      | 8,93                                      | 1,000128                             | 5,78                          | 1,73                                 |
| 8,74                                          | 7,71                                      | 9,17                                      | 1,000256                             | 5,57                          | 1,80                                 |
| 9,52                                          | 8,58                                      | 10,01                                     | 1,000545                             | 5,05                          | 1,98                                 |
| 12,24                                         | 11,14                                     | 12,83                                     | 1,001548                             | 4,63                          | 2,16                                 |
| 12,25                                         | 11,12                                     | 12,78                                     | 1,001551                             | 4,54                          | 2,20                                 |
| 12,35                                         | 11,09                                     | 12,85                                     | 1,001585                             | 4,78                          | 2,09                                 |
| 12,42                                         | 11,24                                     | 12,89                                     | 1,001610                             | 4,45                          | 2,24                                 |

coef. angular:  $(0,62 \pm 0,15) \times 10^{-4}$

coef. linear:  $(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-6}$

coef. correlação: 0,90

TABELA XIV. Inverso do peso molecular aparente, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações médias de dextrana D 5376 (lote nº 38C-0123), sob gravidade.  
 $t = (25.0 \pm 0.1)^{\circ}\text{C}.$

| $\bar{c} \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_6 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_1 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{\rho}$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $M_{ap} \times 10^{-5}$ | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^6$ |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 2,07                                          | 1,86                                      | 2,18                                      | 0,997803                             | 5,30                    | 1,88                                 |
| 2,10                                          | 1,87                                      | 2,22                                      | 0,997814                             | 5,72                    | 1,75                                 |
| 2,14                                          | 1,86                                      | 2,26                                      | 0,997695                             | 6,42                    | 1,56                                 |
| 4,16                                          | 3,65                                      | 4,34                                      | 0,998574                             | 5,70                    | 1,75                                 |
| 4,28                                          | 3,88                                      | 4,49                                      | 0,998616                             | 4,90                    | 2,04                                 |
| 4,35                                          | 3,91                                      | 4,57                                      | 0,998643                             | 5,22                    | 1,91                                 |
| 6,90                                          | 6,29                                      | 7,25                                      | 0,999582                             | 4,79                    | 2,09                                 |
| 7,10                                          | 6,56                                      | 7,41                                      | 0,999655                             | 4,13                    | 2,42                                 |
| 7,44                                          | 6,81                                      | 7,75                                      | 0,999781                             | 4,35                    | 2,30                                 |
| 7,79                                          | 7,13                                      | 8,12                                      | 0,999907                             | 4,41                    | 2,27                                 |
| 7,87                                          | 7,19                                      | 8,15                                      | 0,999940                             | 4,21                    | 2,37                                 |
| 8,18                                          | 7,45                                      | 8,44                                      | 1,000049                             | 4,18                    | 2,39                                 |
| 8,21                                          | 7,57                                      | 8,49                                      | 1,000063                             | 3,86                    | 2,59                                 |
| 8,57                                          | 7,94                                      | 8,96                                      | 1,000197                             | 4,11                    | 2,44                                 |
| 9,37                                          | 8,84                                      | 9,79                                      | 1,000491                             | 3,50                    | 2,86                                 |
| 9,38                                          | 8,71                                      | 9,72                                      | 1,000494                             | 3,72                    | 2,69                                 |
| 9,56                                          | 8,93                                      | 9,87                                      | 1,000561                             | 3,37                    | 2,96                                 |

coef. angular:  $(1,39 \pm 0,26) \times 10^{-4}$

coef. linear:  $(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$

coef. correlação: 0,93

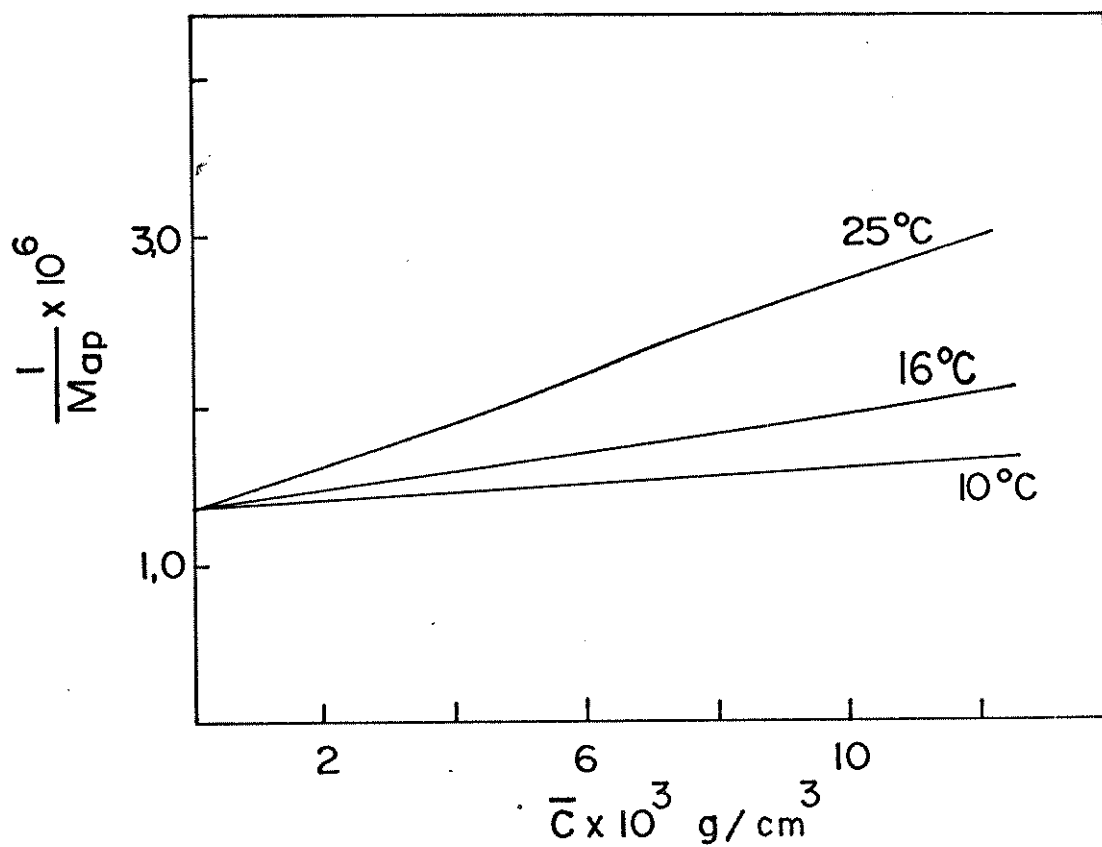


FIGURA 20. Inverso do peso molecular aparente em função da concentração para amostra de Dextrana D 5376. As retas correspondentes a cada temperatura foram obtidas por regressão linear dos pontos experimentais.

TABELA XV

| Temp./°C | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^6$ | $\bar{M}_w \times 10^{-5}$ | $A_2 \times 10^4$ | $\chi$ |
|----------|--------------------------------------|----------------------------|-------------------|--------|
| 10,0     | $1,38 \pm 0,11$                      | $7,2 \pm 0,5$              | $0,24 \pm 0,16$   | 0,4989 |
| 16,0     | $1,34 \pm 0,12$                      | $7,5 \pm 0,6$              | $0,62 \pm 0,15$   | 0,4972 |
| 25,0     | $1,35 \pm 0,17$                      | $7,4 \pm 0,9$              | $1,40 \pm 0,26$   | 0,4937 |

Unidades de  $A_2$ ,  $\text{cm}^3 \text{mol g}^{-2}$ .

O peso molecular obtido para esta amostra de dextrana foi nitidamente diferente do valor nominal. Este fato levou à determinação do peso molecular por outro método absoluto, ou seja, através da determinação dos coeficientes de difusão e sedimentação em ultracentrífuga, cujos resultados serão apresentados na próxima secção.

Além disso, repetiram-se os experimentos de osmossedimentação para amostra de dextrana do mesmo fabricante e idêntica especificação, mas de outro lote (Sigma, lote nº 58C-0296). As experiências foram feitas a  $7,1^\circ\text{C}$ , obtendo-se um  $\bar{M}_w$  igual a  $(1,9 \pm 0,4) \times 10^6$  e o coeficiente de virial de  $(0,12 \pm 0,01) \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{mol g}^{-2}$  (Tabela XVI e figura 21). Com esta amostra o peso molecular foi também obtido através da técnica de espalhamento de luz (determinação encomendada à firma Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania, Estados Unidos) e por cromatografia de permeação em gel no Centre de Recherches sur les Macromolécules végétales por cortesia de R. Rinaudo. Os valores obtidos foram de  $\bar{M}_w = 1,80 \times 10^6$  e  $2,43 \times 10^6$  ( $M_n = 4,14 \times 10^5$ ) para o primeiro e segundo método, respectivamente.

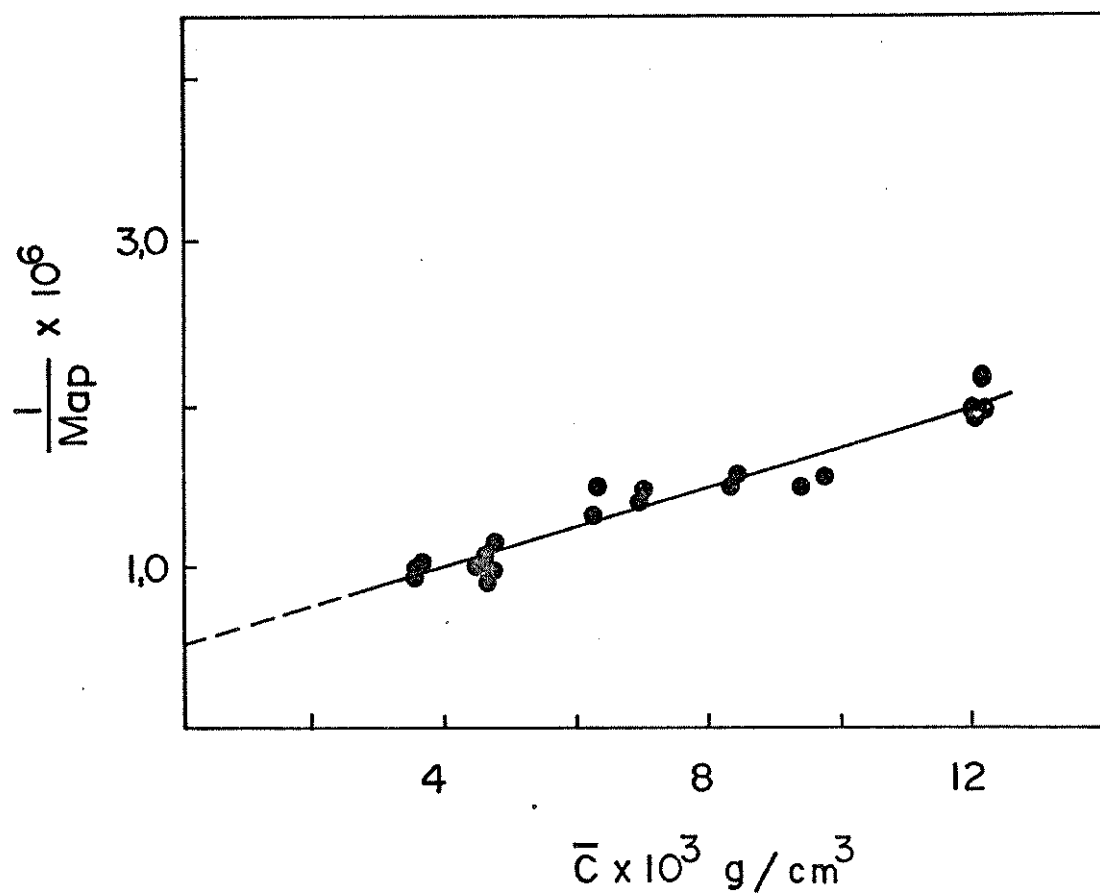


FIGURA 21. Inverso do peso molecular aparente em função da concentração para amostra de dextrana, 7,1°C. Cada ponto corresponde a um experimento de osmossedimentação individual.

TABELA XVI. Inverso do peso molecular aparente, calculado a partir da equação 36, para diversas concentrações de dextrana D5370 (lote nº 58C-0296), sob gravidade,  $t = (7,1 \pm 0,1)^{\circ}\text{C}$ .

| $\bar{c} \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_5 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_1 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{\rho}$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{M}_{ap} \times 10^{-6}$ | $\frac{1}{\bar{M}_{ap}} \times 10^6$ |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 3,56                                          | 2,92                                      | 3,85                                      | 0,998354                             | 1,05                          | 0,95                                 |
| 3,60                                          | 2,97                                      | 3,86                                      | 0,998367                             | 0,99                          | 1,01                                 |
| 3,66                                          | 3,08                                      | 3,92                                      | 0,998389                             | 0,93                          | 1,08                                 |
| 4,57                                          | 3,83                                      | 4,89                                      | 0,998723                             | 0,94                          | 1,06                                 |
| 4,61                                          | 3,82                                      | 4,88                                      | 0,998738                             | 0,93                          | 1,07                                 |
| 4,68                                          | 3,79                                      | 5,08                                      | 0,998765                             | 1,11                          | 0,90                                 |
| 4,80                                          | 3,91                                      | 5,11                                      | 0,998809                             | 1,01                          | 0,99                                 |
| 4,80                                          | 4,16                                      | 5,16                                      | 0,998810                             | 0,54                          | 1,19                                 |
| 6,33                                          | 5,55                                      | 6,69                                      | 0,999370                             | 0,79                          | 1,36                                 |
| 6,37                                          | 5,65                                      | 6,69                                      | 0,999386                             | 0,66                          | 1,52                                 |
| 6,94                                          | 6,07                                      | 7,27                                      | 0,999597                             | 0,70                          | 1,43                                 |
| 7,04                                          | 6,24                                      | 7,38                                      | 0,999634                             | 0,66                          | 1,52                                 |
| 8,37                                          | 7,42                                      | 8,76                                      | 1,000122                             | 0,65                          | 1,54                                 |
| 8,48                                          | 7,57                                      | 8,87                                      | 1,000163                             | 0,62                          | 1,61                                 |
| 9,44                                          | 8,44                                      | 9,96                                      | 1,000514                             | 0,65                          | 1,53                                 |
| 9,77                                          | 8,75                                      | 10,26                                     | 1,000638                             | 0,63                          | 1,60                                 |
| 11,98                                         | 10,99                                     | 12,48                                     | 1,001449                             | 0,50                          | 1,99                                 |
| 12,13                                         | 11,21                                     | 12,70                                     | 1,001506                             | 0,50                          | 2,00                                 |
| 12,18                                         | 11,25                                     | 12,61                                     | 1,001523                             | 0,45                          | 2,20                                 |
| 12,18                                         | 11,21                                     | 12,69                                     | 1,001523                             | 0,50                          | 2,02                                 |

$\Delta z = 16 \text{ cm}$

coef. angular:  $(0,12 \pm 0,01) \times 10^{-4}$

coef. linear:  $(5,3 \pm 1,1) \times 10^{-7}$

coef. correlação: 0,96

## 2.6. Medidas Viscosimétricas

Viscosidades foram determinadas utilizando-se um viscosímetro de Ubbelohde e seguindo-se o procedimento indicado na literatura<sup>64,78</sup>. O viscosímetro foi colocado em posição vertical num banho termostatizado a 20,0°C, sendo as diluições feitas no próprio viscosímetro. Antes de cada medida do tempo de escoamento, esperavam-se 20 minutos para assegurar a uniformidade de temperatura da amostra. As concentrações das soluções foram determinadas por medidas diretas da densidade.

A viscosidade intrínseca é definida<sup>10</sup> como,

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \left( \ln \frac{t_s \times \rho_s}{t_o \times \rho_o} \right) \quad (42)$$

onde  $t$  é o tempo de escoamento,  $\rho$  é a densidade e os índices  $s$  e  $o$  correspondem a solução e solvente respectivamente. Os resultados do tempo de escoamento das diversas amostras de dextrana analisadas encontram-se na tabela XVII. Do gráfico de  $\frac{1}{c} \ln \left( \frac{t_s \times \rho_s}{t_o \times \rho_o} \right)$  em função da concentração de dextrana (figura 22), determinou-se as viscosidades intrínsecas por extrapolação das retas obtidas por regressão linear.

Utilizando-se os valores dos parâmetros  $a$  e  $k$  segundo Granath<sup>5</sup> obteve-se  $\bar{M}_v$  para as três amostras de dextrana de diferentes fabricantes. Valores de  $\bar{M}_v$  também foram obtidos por extrapolação da curva experimental de  $\log [\eta]$  vs  $\log M$ , fornecidas por Senti et al<sup>75</sup> e pela Pharmacia Fine Chemicals<sup>79</sup>. Os valores de viscosidade intrínseca e de  $\bar{M}_v$  estão listados na tabela XVIII.

TABELA XVII. Valores de tempo de escoamento, das soluções aquosas de dextranas, para determinação da viscosidade intrínseca a 20,0°C.

| Dextrana                 | $\rho$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $t_0$ (s) | $t_s^a$ (s) | $\frac{1}{c} \ln \frac{\rho_s t_s}{t_0 \rho_0}$<br>(cm <sup>3</sup> /g) <sup>b</sup> |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| T500                     | 1,002610                       | 12,00                                   | 41,6      | 73,8        | 48,11                                                                                |
|                          | 1,001986                       | 10,31                                   |           | 68,1        | 48,19                                                                                |
|                          | 1,001376                       | 8,65                                    |           | 63,6        | 49,47                                                                                |
|                          | 1,000999                       | 7,62                                    |           | 60,2        | 48,88                                                                                |
|                          | 1,000485                       | 6,22                                    |           | 57,1        | 51,30                                                                                |
| ICN Pharm.               | 1,001412                       | 8,73                                    | 41,8      | 152,2       | 148,46                                                                               |
|                          | 1,000200                       | 5,43                                    |           | 80,5        | 121,04                                                                               |
|                          | 0,999978                       | 4,83                                    |           | 74,0        | 118,66                                                                               |
|                          | 0,999388                       | 3,23                                    |           | 61,0        | 117,56                                                                               |
|                          | 0,999162                       | 2,61                                    |           | 55,8        | 111,01                                                                               |
|                          | 0,998958                       | 2,06                                    |           | 52,0        | 106,62                                                                               |
| D5376<br>(lote 38C-0123) | 1,001353                       | 8,56                                    | 41,8      | 75,9        | 70,02                                                                                |
|                          | 1,000718                       | 6,84                                    |           | 65,0        | 64,93                                                                                |
|                          | 1,000402                       | 5,98                                    |           | 61,2        | 64,11                                                                                |
|                          | 1,000055                       | 5,04                                    |           | 57,3        | 62,99                                                                                |
|                          | 0,999802                       | 4,35                                    |           | 54,6        | 61,81                                                                                |
|                          | 0,999439                       | 3,36                                    |           | 51,4        | 62,54                                                                                |
|                          | 0,999250                       | 2,85                                    |           | 49,2        | 58,44                                                                                |

<sup>a</sup> Média de três determinações

<sup>b</sup>  $\rho_{0,20^\circ\text{C}} = 0,998202 \text{ g/cm}^3$ .

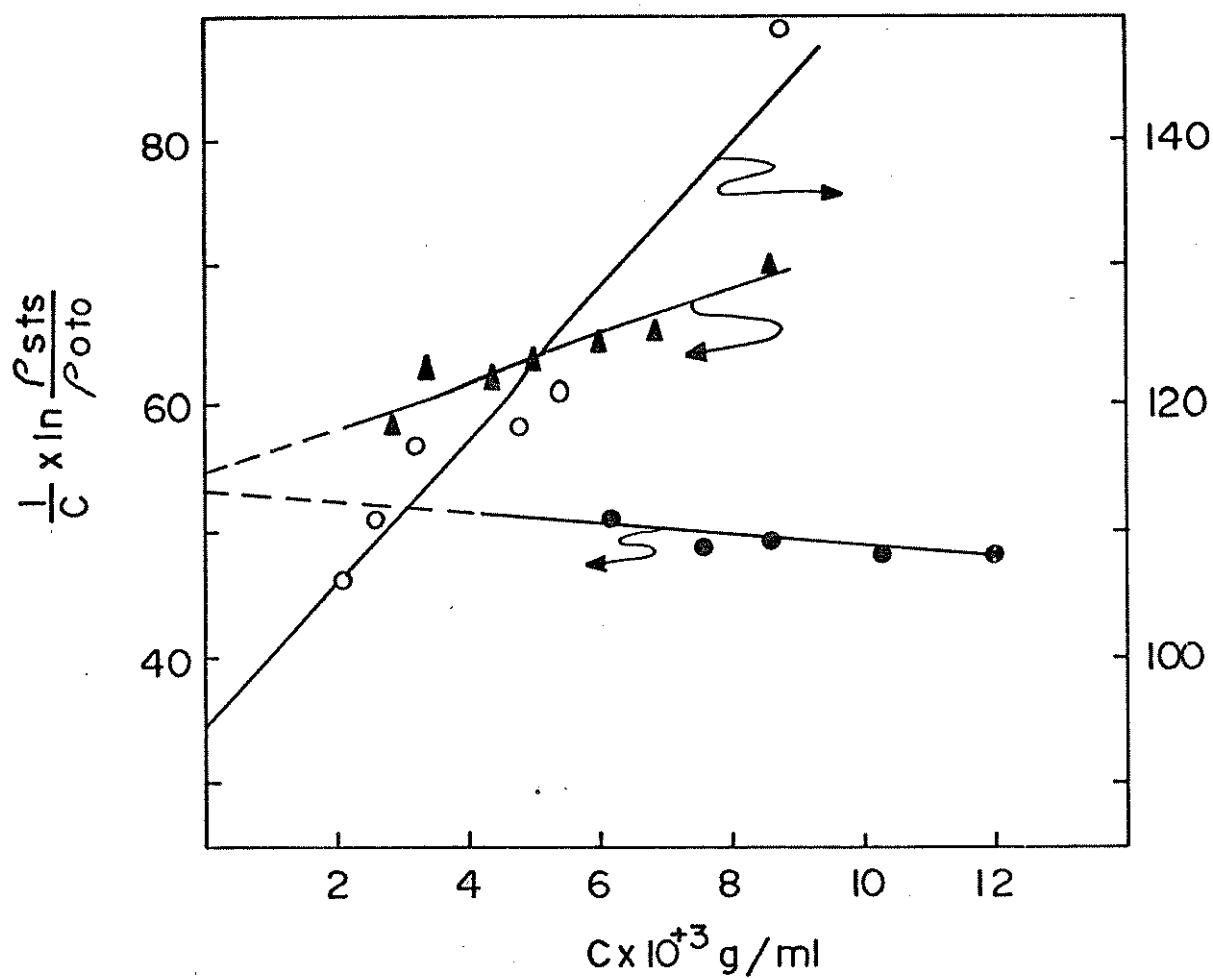


FIGURA 22. Gráfico para determinação da viscosidade intrínseca de dextrana em solução aquosa.

(●) dextrana T 500 - Pharmacia.

(▲) dextrana D 5376 - Sigma

(o) dextrana 5-40  $\times 10^6$  - ICN Pharm.

TABELA XVIII

| Dextrana               | $[\eta]$ ml/g | $\bar{M}_v \times 10^{-5}$ |                  |                  |
|------------------------|---------------|----------------------------|------------------|------------------|
| T 500                  | 53,6          | 3,8 <sup>a</sup>           | 5,4 <sup>b</sup> | 5,4 <sup>c</sup> |
| D 5376 (lote 38C-0123) | 54,8          | 4,0                        | 6,0              | 6,2              |
| ICN                    | 94,6          | 129                        | 140,0            |                  |

<sup>a</sup> ref. 5

<sup>b</sup> ref. 75

<sup>c</sup> ref. 79

## 2.7. Titulação Turbidimétrica

Considerando-se a grande discrepância entre o valor nominal de  $\bar{M}_w$  de uma das amostras de dextrana Sigma (lote 38C-0123) e o obtido por nós, passou-se a analisar o efeito de álcool sobre a solubilidade desta amostra através de titulação turbidimétrica. A titulação foi feita a 25°C, pesando-se 0,040 g de dextrana e 9,941 g de água bidestilada e adicionando-se etanol PA até o aparecimento de turbidez, verificado visualmente. O volume de álcool adicionado foi de 5,9 ml (média de três titulações), que corresponde a uma concentração de álcool de 37,1% em peso. Levando este valor à curva apresentada por Basedow e Ebert<sup>80</sup>, de  $\bar{M}_w$  versus % etanol, obtem-se  $\bar{M}_w$  igual a  $1 \times 10^5$ .

Para efeito de controle o mesmo procedimento foi repetido para amostra de dextrana de peso molecular 40 000, de uma solução 0,04 g/10 ml. O volume de álcool necessário para o aparecimento de turbidez foi de 7,85 ml (média de três titulações), correspondendo a 44% de etanol e a um valor de  $\bar{M}_w$  de  $2 \times 10^4$ .

## 2.8. Ultracentrifugação

### 2.8.1. Metodologia

Com o objetivo de se comparar os resultados de peso molecular de dextrana em solução aquosa, obtidos por osmossedimentação com outro método, também absoluto, passou-se a utilizar o método de determinação do peso molecular de macromoléculas em solução a partir do coeficiente de sedimentação e difusão medidos em ultracentrífuga.

Utilizou-se uma centrífuga analítica MOM - tipo 3170, de rotor de alumínio que permite um número máximo de revoluções de 60000 por minuto. Para a determinação do coeficiente de sedimentação usaram-se células mono-setoriais com peça central de poliamida, janelas de quartzo e ângulo de setor de  $4^{\circ}$ , girando a 50000 rpm e 40000 rpm. Célula bi-setorial, de tipo capilar (fronteira sintética, demais condições idênticas à anterior) foi empregada para determinação do coeficiente de difusão, à rotação de 4000 rpm. Através do sistema ótico Schlieren, registraram-se fotos as quais permitem determinar a distância do centro do rotor à fronteira de soluto na solução em função do tempo durante um determinado experimento. Foram feitos dois tipos de experimentos para determinação do coeficiente de sedimentação. Em algumas experiências foi utilizada uma única célula, com volume total de 0,7 ml (e um contra peso). Num segundo tipo de experiências foram utilizadas simultaneamente duas células mono-setoriais com volumes diferentes de solução. O contra peso permite visualizar como referência duas faixas separadas entre si por uma distância real de 1,6 cm (manchas brancas nas extremidades da figura 23). A distância  $r$  do centro do rotor à fronteira da solução foi determinada ampliando-se a imagem fotográfica obti-

da a partir do sistema Schlieren e medindo-se com um paquímetro a distância entre a 1ª. referência (faixa branca à esquerda na figura 23) e o máximo do pico no nível da linha base. O valor real foi obtido, comparando-se com a distância entre as faixas de referência, na mesma ampliação. Finalmente, somando-se 5,7 cm (valor correspondente à distância entre o centro do rotor e a 1ª. referência), tem-se o valor real de  $r$ , para diversos tempos em cada experiência. Para os experimentos em que se utilizou duas células, tem-se apenas uma faixa de referência com largura de 2 mm. Neste caso mediu-se a distância do pico à referência, calculando-se o valor real de  $r$  e subtraindo-se de 7,2 cm.

As concentrações das soluções foram determinadas por pesagem direta do macrossoluto e do solvente e as experiências feitas na temperatura de  $20,0^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.8.2. Determinação do Coeficiente de Sedimentação da Albumina Bovina.

Com o objetivo de se analisar a confiabilidade dos resultados obtidos na ultracentrífuga, determinou-se o coeficiente de sedimentação da albumina nas mesmas condições apresentadas por G. Kegeles e F. Gutter<sup>81</sup>, em pH igual a 4,4 em 0,02 M acetato de sódio e 0,03 M ácido acético. Preparou-se uma solução de concentração conhecida (0,85 g/100 ml), pesando-se 0,0415 g de albumina, dissolvidas em 4,857 g de solvente. Os experimentos foram feitos a 40000 e 50000 rpm, a  $20,0^{\circ}\text{C}$ , usando-se intervalos de 15, 20 ou 30 minutos, entre tomadas de fotos da célula, através do sistema Schlieren. Os dados obtidos para a albumina estão listados na tabela XIX. Na figura 23 é apresentada

TABELA XIX. Coeficiente de sedimentação da albumina, determinado a partir do logaritmo da distância da fronteira sol-vente-solução em função do tempo, 20,0°C.

| Rotação | $w^2 \times 10^{-7}$ | $\ln r$ | t (s) | $\frac{d \ln r}{dt} \times 10^5$ | $s \times 10^{13}$ (s) |
|---------|----------------------|---------|-------|----------------------------------|------------------------|
| 50000   | 2,7416               | 1,804   | 0     | $1,15 \pm 0,03$                  | $4,19 \pm 0,11$        |
|         |                      | 1,815   | 900   |                                  |                        |
|         |                      | 1,827   | 1800  |                                  |                        |
|         |                      | 1,836   | 2700  |                                  |                        |
|         |                      | 1,846   | 3600  |                                  |                        |
|         |                      | 1,857   | 4500  |                                  |                        |
|         |                      | 1,867   | 5400  |                                  |                        |
|         |                      | 1,877   | 6300  |                                  |                        |
| 40000   | 1,7546               | 1,826   | 0     | $0,73 \pm 0,01$                  | $4,17 \pm 0,06$        |
|         |                      | 1,835   | 1200  |                                  |                        |
|         |                      | 1,844   | 2400  |                                  |                        |
|         |                      | 1,852   | 3600  |                                  |                        |
|         |                      | 1,861   | 4800  |                                  |                        |
|         |                      | 1,870   | 6000  |                                  |                        |
|         |                      | 1,879   | 7200  |                                  |                        |

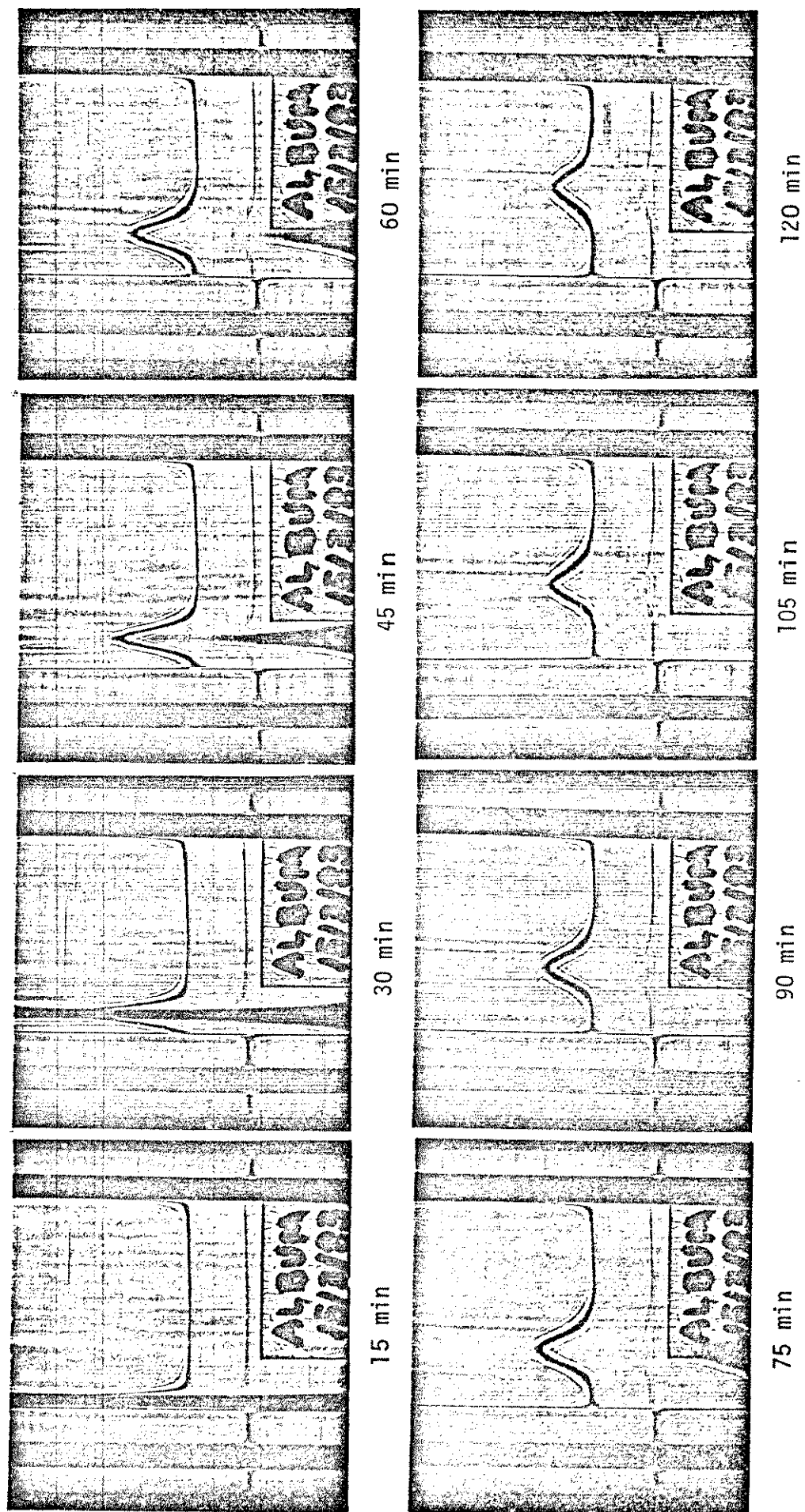


FIGURA 23. Sedimentação de albumina a 50000 rpm, 20°C. São mostradas fotografias Schlieren do conteúdo das células de ultracentrifugação.  
 $c = 8,3 \times 10^{-3}$  g/ml.

uma sequência das fotos registradas para um experimento de determinação do coeficiente de sedimentação a 50000 rpm, a 20,0°C e 0,85 g/100 ml de albumina. O gráfico do logaritmo da distância entre a fronteira solução-solvente, que corresponde ao máximo do pico Schlieren, e o centro do rotor em função do tempo, para uma solução de albumina bovina é apresentado na figura 24. Os valores obtidos de  $s$  são coincidentes, dentro da faixa de erro experimental, com o da literatura<sup>81</sup> que é de  $4,11 \times S$ .

### 2.8.3. Determinação do Coeficiente de Sedimentação da Dextrana.

O procedimento para determinar o coeficiente de sedimentação de dextrana (Sigma - lote 38C-0123) em diversas concentrações foi análogo ao descrito na secção anterior. Os experimentos foram feitos a 50000 rpm e 20,0°C, e os resultados estão listados na tabela XX. O gráfico do inverso do coeficiente de sedimentação em função da concentração (figura 25), fornece o valor de  $s_0$  igual a  $(7,55 \pm 1,05) S$ , obtido por regressão linear. Este valor será útil para o cálculo do peso molecular da macromolécula em estudo.

### 2.8.4. Determinação do Coeficiente de Difusão da Dextrana

Para se determinar o coeficiente de difusão de dextrana em solução aquosa, utilizou-se uma célula bi-setorial, a 4000 rpm na temperatura de 20,0°C. Registrando-se fotograficamente a imagem obtida através do sistema óptico Schlieren, em função do tempo para um determinado experimento (figura 26), observou-se, como era de se esperar, que não houve deslocamento do

TABELA XX. Coeficiente de sedimentação de uma amostra de dextrana, determinado a partir do logaritmo da distância da fronteira solvente-solução em função do tempo, 20,0°C.

| $c \times 10^3 \text{ g/ml}$ | $\ln r$ | $t \text{ (s)}$ | $\frac{d \ln r}{dt} \times 10^5$ | $s \times 10^{13} \text{ (s)}$ | $\frac{1}{s} \times 10^{13} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ |
|------------------------------|---------|-----------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------|
| 7,5                          | 1,862   | 0               |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,872   | 900             |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,883   | 1800            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,895   | 2700            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,905   | 3600            | $1,21 \pm 0,05$                  | $4,42 \pm 0,18$                | 0,226                                                |
| 7,5                          | 1,835   | 0               |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,845   | 900             |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,856   | 1800            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,868   | 2700            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,878   | 3600            | $1,21 \pm 0,04$                  | $4,42 \pm 0,14$                | 0,226                                                |
| 12,0                         | 1,828   | 0               |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,837   | 900             |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,846   | 1800            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,855   | 2700            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,865   | 3600            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,875   | 4500            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,884   | 5400            | $1,04 \pm 0,03$                  | $3,81 \pm 0,11$                | 0,262                                                |
| 12,0                         | 1,801   | 0               |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,811   | 900             |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,820   | 1800            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,829   | 2700            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,840   | 3600            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,848   | 4500            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,858   | 5400            | $1,05 \pm 0,03$                  | $3,83 \pm 0,11$                | 0,261                                                |
| 16,0                         | 1,810   | 0               |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,819   | 900             |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,827   | 1800            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,836   | 2700            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,843   | 3600            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,850   | 4500            |                                  |                                |                                                      |
|                              | 1,859   | 5400            | $0,89 \pm 0,04$                  | $3,26 \pm 0,15$                | 0,307                                                |

Continuação da Tabela XX.

|      |       |      |                 |                 |       |
|------|-------|------|-----------------|-----------------|-------|
| 16,0 | 1,827 | 0    |                 |                 |       |
|      | 1,835 | 900  |                 |                 |       |
|      | 1,843 | 1800 |                 |                 |       |
|      | 1,851 | 2700 |                 |                 |       |
|      | 1,859 | 3600 |                 |                 |       |
|      | 1,866 | 4500 |                 |                 |       |
|      | 1,874 | 5400 | $0,87 \pm 0,02$ | $3,17 \pm 0,07$ | 0,315 |
| 20,0 | 1,829 | 0    |                 |                 |       |
|      | 1,836 | 900  |                 |                 |       |
|      | 1,843 | 1800 |                 |                 |       |
|      | 1,849 | 2700 |                 |                 |       |
|      | 1,855 | 3600 |                 |                 |       |
|      | 1,862 | 4500 |                 |                 |       |
|      | 1,870 | 5400 | $0,74 \pm 0,03$ | $2,71 \pm 0,11$ | 0,369 |
| 20,0 | 1,811 | 0    |                 |                 |       |
|      | 1,818 | 900  |                 |                 |       |
|      | 1,824 | 1800 |                 |                 |       |
|      | 1,830 | 2700 |                 |                 |       |
|      | 1,837 | 3600 |                 |                 |       |
|      | 1,845 | 4500 |                 |                 |       |
|      | 1,851 | 5400 | $0,74 \pm 0,03$ | $2,71 \pm 0,11$ | 0,369 |

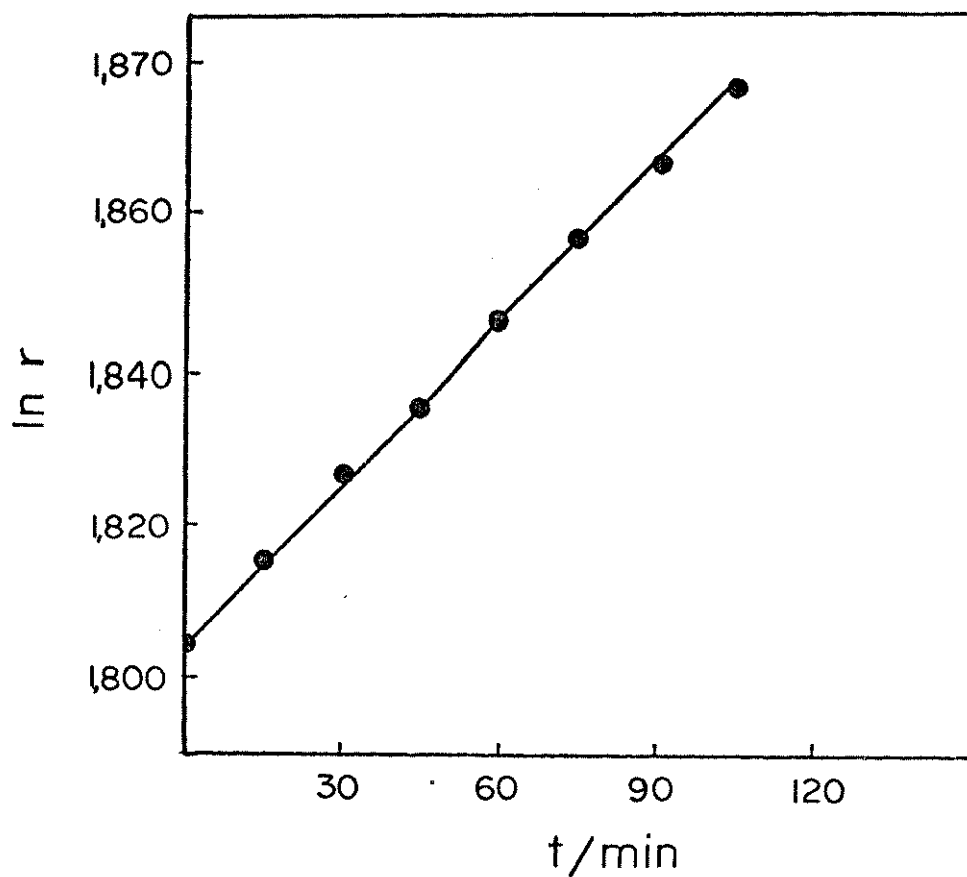


FIGURA 24. Gráfico do logarítmo da distância entre a fronteira solução-solvente (máximo do pico Schlieren) e o centro do rotor em função do tempo, para uma solução aquosa de albumina ( $c = 8,3 \times 10^{-3}$  g/ml,  $t = 20,0^{\circ}\text{C}$ , 50000 rpm).

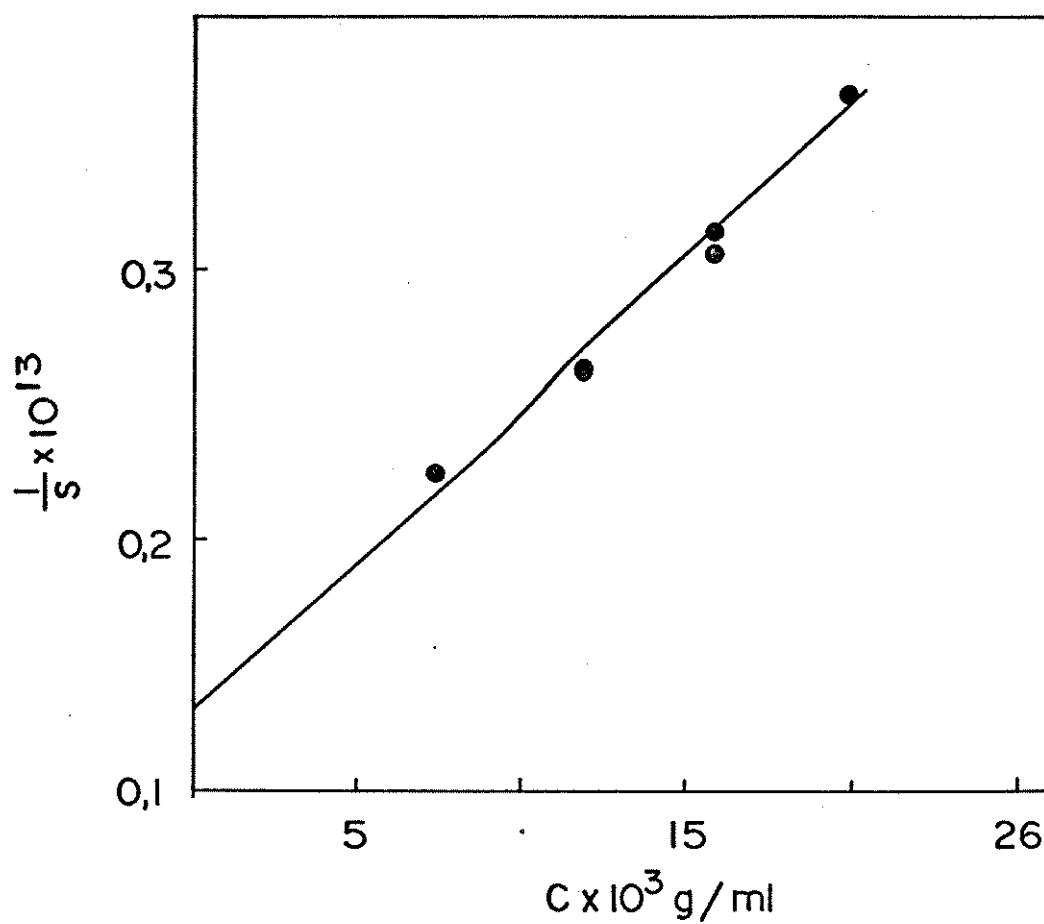


FIGURA 25. Gráfico do inverso do coeficiente de sedimentação em função da concentração para uma amostra de dextrana D 5376 (lote 38C-0123), 20,0°C.

pico mas a altura diminuiu. Entretanto, mesmo à baixa velocidade do rotor ocorreu a sedimentação de uma fração da amostra em estudo. A altura da curva em forma de sino é dada por:

$$\left( \frac{\partial c_2}{\partial x} \right)_{x_0=0} = \frac{c_0}{2(\pi \cdot D \cdot t)^{1/2}} \quad (43)$$

onde  $x$  é o nível da fronteira,  $c_0$  é a concentração inicial e  $D$  é o coeficiente de difusão. Sendo a área sob a curva proporcional à concentração inicial, a equação 43 pode ser reescrita como;

$$\left( \frac{A}{h} \right)^2 = 4\pi \cdot D \cdot t \quad (44)$$

A área da curva foi determinada por leitura direta de uma imagem ampliada da chapa fotográfica, utilizando-se um planímetro e o valor da altura foi obtido com paquímetro. Os valores reais dessas grandezas foram avaliados utilizando-se o valor conhecido da distância entre as faixas de referência mostradas na mesma ampliação. O gráfico do quadrado da razão área/altura em função do tempo permite obter do coeficiente angular da curva o valor de  $D$  para uma determinada concentração de dextrana. Os valores de  $D$  para os diversos experimentos foram calculados por regressão linear, e encontram-se listados na tabela XXI.

O gráfico de coeficiente de difusão em função da concentração é apresentado na figura 27. A reta foi traçada usando-se coeficientes determinados por regressão linear, resultando em um valor de  $D_0$  igual a  $(1,81 \pm 0,46) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

Conhecendo-se os valores dos coeficientes de difusão e sedimentação para dextrana em estudo, a partir da equação 26, tem-se um peso molecular médio em massa para esta amostra de dextra

TABELA XXI. Coeficiente de difusão de uma amostra de dextrana a diversas concentrações.

| $c \times 10^3$ (g/ml) | $(A/h)^2 \times 10^3$ (cm <sup>2</sup> ) | t (s) | $D \times 10^7$ (cm <sup>2</sup> /s) |
|------------------------|------------------------------------------|-------|--------------------------------------|
| 3,0                    | 2,13                                     | 0     | $1,92 \pm 0,38$                      |
|                        | 3,84                                     | 900   |                                      |
|                        | 5,84                                     | 1800  |                                      |
|                        | 7,67                                     | 2700  |                                      |
|                        | 9,27                                     | 3600  |                                      |
|                        | 15,52                                    | 5400  |                                      |
| 5,0                    | 3,85                                     | 0     | $1,56 \pm 0,11$                      |
|                        | 7,84                                     | 1800  |                                      |
|                        | 11,22                                    | 3600  |                                      |
|                        | 15,39                                    | 5400  |                                      |
|                        | 18,19                                    | 7200  |                                      |
|                        | 21,56                                    | 9000  |                                      |
| 7,5                    | 4,84                                     | 0     | $1,17 \pm 0,07$                      |
|                        | 7,02                                     | 1800  |                                      |
|                        | 9,67                                     | 3600  |                                      |
|                        | 12,73                                    | 5400  |                                      |
|                        | 15,04                                    | 7200  |                                      |
|                        | 17,38                                    | 9000  |                                      |
|                        | 20,81                                    | 10800 |                                      |
| 16,0                   | 25,02                                    | 0     | $1,03 \pm 0,28$                      |
|                        | 26,36                                    | 1800  |                                      |
|                        | 28,54                                    | 3600  |                                      |
|                        | 31,13                                    | 5400  |                                      |
|                        | 34,26                                    | 7200  |                                      |
| 20,0                   | 37,08                                    | 0     | $1,00 \pm 0,31$                      |
|                        | 39,24                                    | 1800  |                                      |
|                        | 41,59                                    | 3600  |                                      |

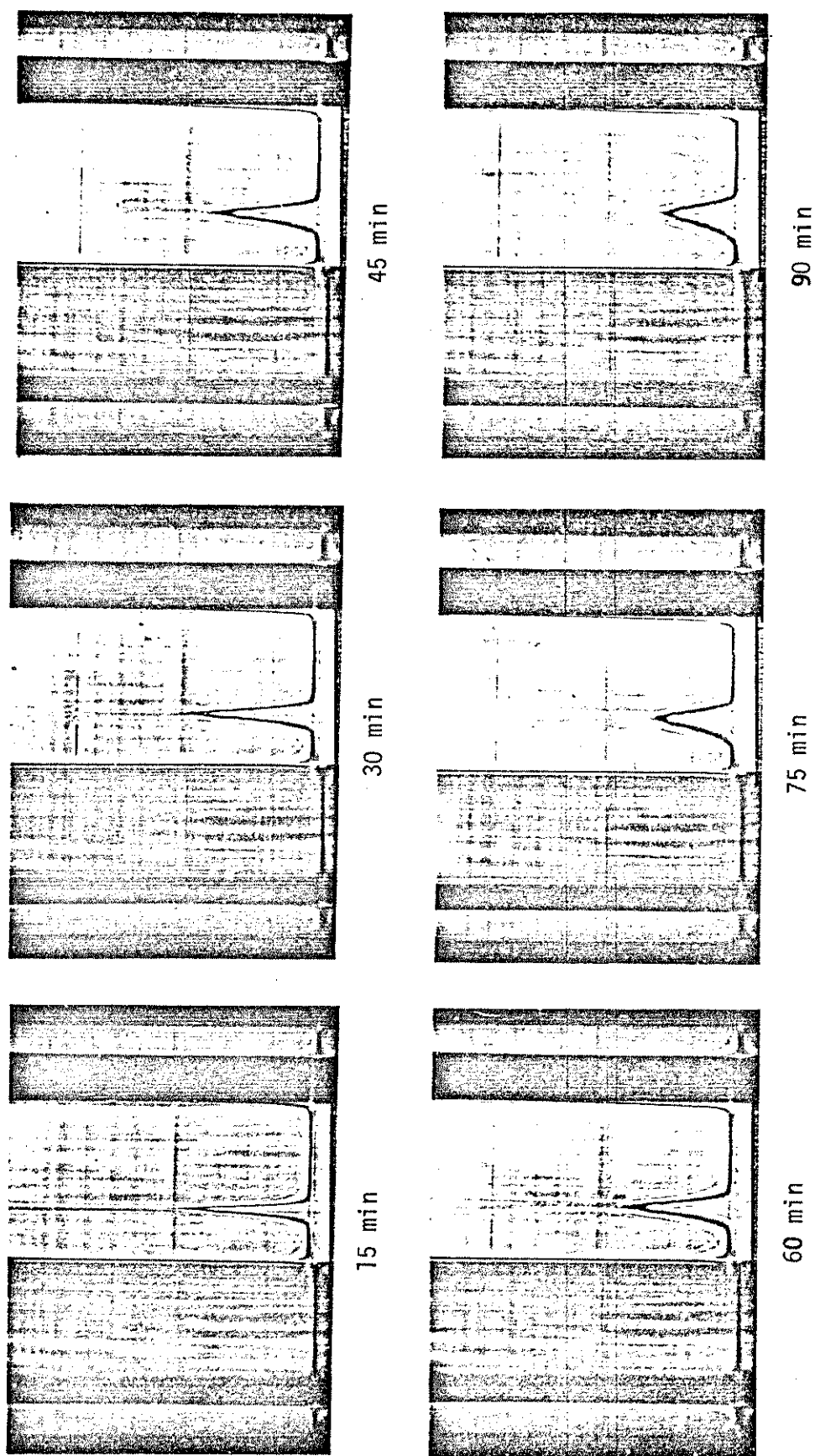


FIGURA 26. Sequência de fotos obtidas durante um experimento de difusão de dextrana a 4000 rpm, 20,0°C.

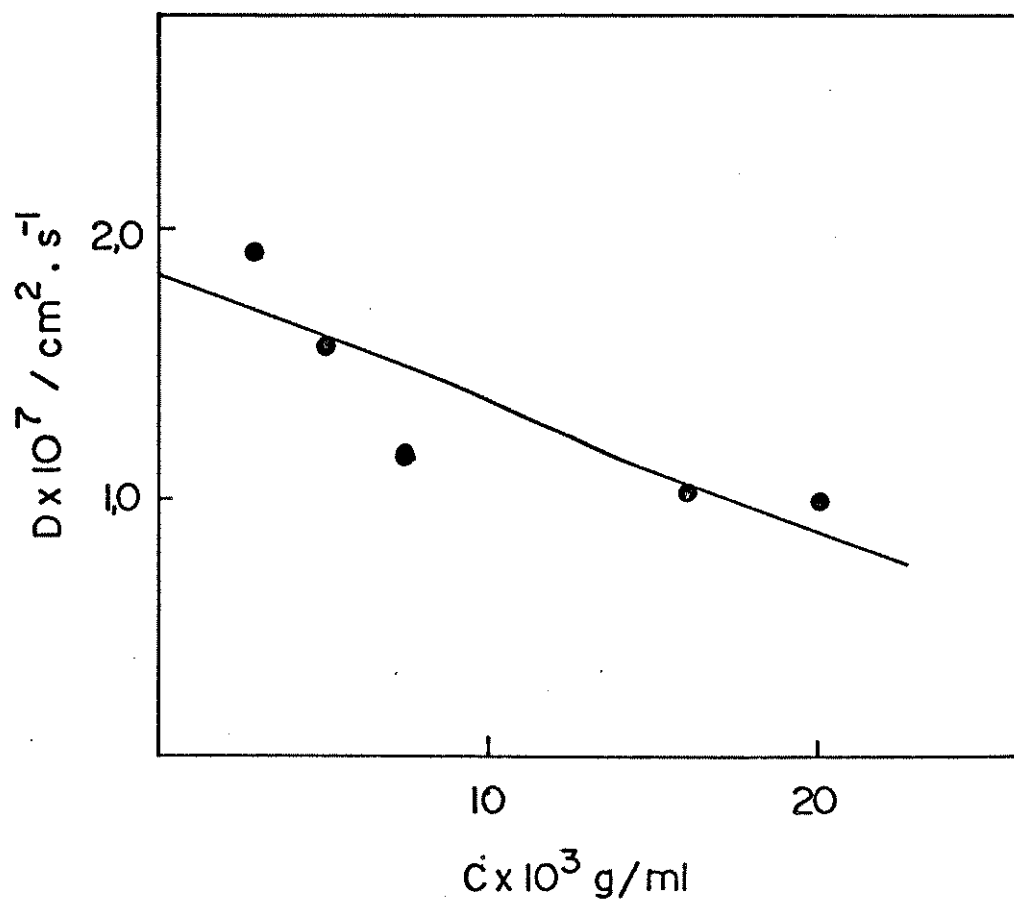


FIGURA 27. Coeficiente de difusão de uma amostra de dextrana em função da concentração. A reta foi traçada por regressão linear.

na de  $2,8 \times 10^5$ .

## 2.9. Fracionamento de Dextrana por Osmossedimentação

O fracionamento de dextrana em solução aquosa foi estudado em célula de osmossedimentação de um metro de altura, com um volume de 1,2 l em cada um dos lados<sup>82</sup>. Foi utilizada dextrana de peso molecular nominal igual a  $2 \times 10^6$  (Sigma, lote nº 58C-0296). O experimento foi feito a temperatura ambiente, durante 62 horas, com uma solução de concentração inicial de 1%. Para se evitar o crescimento de fungos, tanto a solução de dextrana como o solvente continham timerosal a 100 ppm. Retiraram-se oito frações da solução e o solvente para se determinar, respectivamente, a concentração de cada fração em função da profundidade e a quantidade de macrossoluto que atravessou a membrana semipermeável do compartimento da solução para o compartimento do solvente puro. As frações são representadas por números, que decrescem com a profundidade, sendo que 8 corresponde ao topo da célula. Na tabela XXII, estão relacionadas a concentração e a massa de dextrana de cada fração (já corrigidos com relação ao timerosal presente) e do compartimento do solvente. A rejeição da membrana semipermeável para a dextrana foi de 99,3%.

Os pesos moleculares das oito frações e da solução estoque de dextrana foram determinados por osmossedimentação, em células de 16 cm de altura, sob gravidade, na temperatura de  $25,0^\circ\text{C}$ . A metodologia empregada para a obtenção do peso molecular foi a mesma descrita anteriormente. Os valores do peso molecular aparente a diversas concentrações e do correspondente à concentração nula estão listados na tabela XXIII para as diversas frações. Na figura 28 e 29 são ilustrados os gráficos do inverso do peso

TABELA XXII. Massa de dextrana contida nas diversas frações, resultante do experimento de osmossedimentação, sob gravidade, durante 62 horas, à temperatura ambiente.

| Fração   | $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> ) | $c \times 10^3$ (g/cm <sup>3</sup> ) | $v$ (ml) | $m$ (g) | $\sum_i m_i$ (g) |
|----------|-----------------------------|--------------------------------------|----------|---------|------------------|
| 8        | 1,000059                    | 8,10                                 | 134      | 1,09    | —                |
| 7        | 1,000409                    | 9,05                                 | 145      | 1,31    | 2,40             |
| 6        | 1,000624                    | 9,64                                 | 156      | 1,50    | 3,90             |
| 5        | 1,000727                    | 9,91                                 | 147      | 1,46    | 5,36             |
| 4        | 1,000780                    | 10,06                                | 130      | 1,31    | 6,67             |
| 3        | 1,000839                    | 10,22                                | 136      | 1,39    | 8,06             |
| 2        | 1,000918                    | 10,43                                | 144      | 1,50    | 9,56             |
| 1        | 1,000970                    | 10,57                                | 135      | 1,43    | 10,99            |
| solvente | 0,997105                    | 0,07                                 | 1110     | 0,08    | 11,07            |
| estoque  | 1,000688                    | 9,91                                 | 1120     | 11,10   | —                |

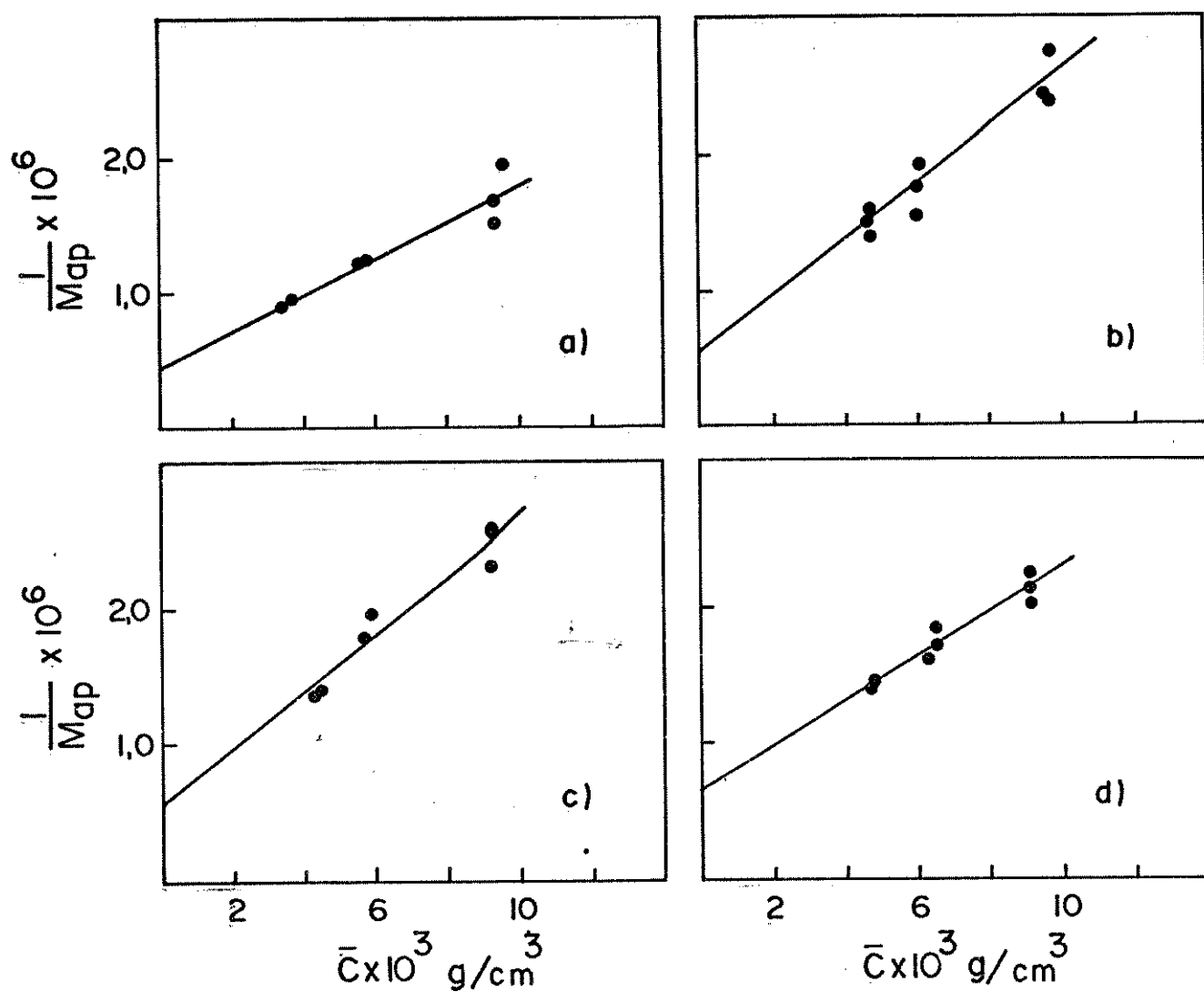


FIGURA 28. Inverso do peso molecular aparente de dextrana em função da concentração, 25,0°C, das frações (a) 8, (b) 7, (c) 6 e (d) 5 da célula de osmossedimentação de 1 metro de altura.

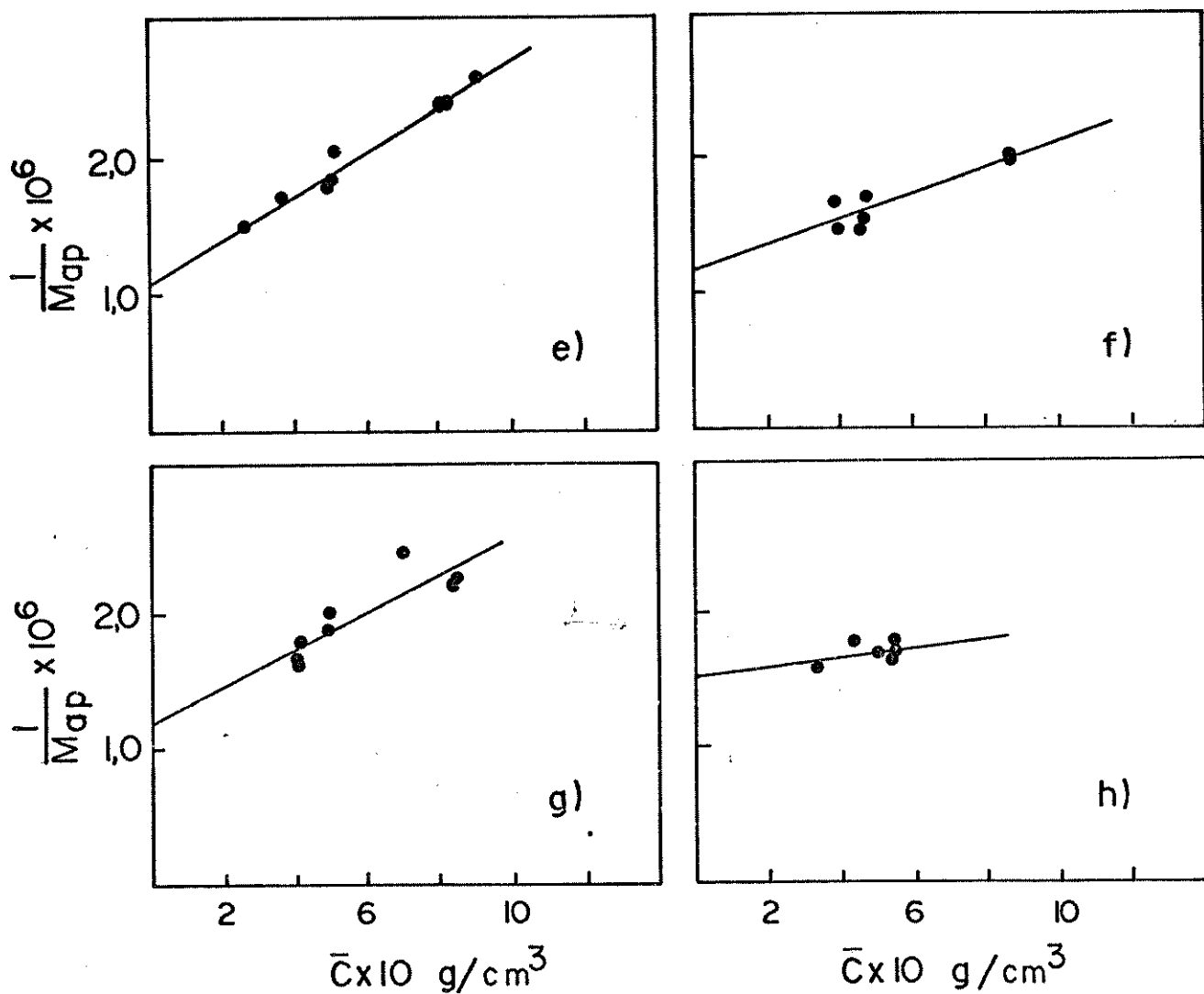


FIGURA 29. Inverso do peso molecular aparente de dextrana em função da concentração, 25,0°C, das frações (e) 4, (f) 3, (g) 2 e (h) 1 da célula de osmossedimentação de 1 metro de altura.

TABELA XXIII. Inverso do peso molecular aparente, calculado a partir da equação 36, em células de 16 cm, para várias concentrações médias de dextrana das diversas frações resultantes do fracionamento sob gravidade.

| Fração | $\bar{c} \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_5 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $c_1 \times 10^3$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{\rho}$<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | $\bar{M} \times 10^{-5}$ | $\frac{1}{\bar{M}} \times 10^6$ | $\bar{M}_w^0 \times 10^{-6}$ |
|--------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 1      | 3,40                                          | 3,15                                      | 4,02                                      | 0,998330                             | 11,0                     | 0,91                            |                              |
|        | 3,68                                          | 3,24                                      | 4,14                                      | 0,998436                             | 10,5                     | 0,95                            |                              |
|        | 5,63                                          | 5,26                                      | 6,33                                      | 0,999152                             | 8,19                     | 1,22                            |                              |
|        | 5,78                                          | 5,34                                      | 6,40                                      | 0,999206                             | 7,90                     | 1,26                            |                              |
|        | 9,33                                          | 8,77                                      | 10,06                                     | 1,000513                             | 5,97                     | 1,67                            |                              |
|        | 9,43                                          | 8,71                                      | 10,15                                     | 1,000549                             | 6,59                     | 1,52                            |                              |
|        | 9,64                                          | 9,09                                      | 10,24                                     | 1,000626                             | 5,15                     | 1,94                            | 2,1                          |
| 2      | 4,65                                          | 4,35                                      | 5,07                                      | 0,998790                             | 6,60                     | 1,52                            |                              |
|        | 4,72                                          | 4,27                                      | 5,05                                      | 0,998780                             | 7,11                     | 1,41                            |                              |
|        | 4,71                                          | 4,41                                      | 5,10                                      | 0,998812                             | 6,25                     | 1,60                            |                              |
|        | 6,00                                          | 5,56                                      | 6,44                                      | 0,999286                             | 6,33                     | 1,58                            |                              |
|        | 6,12                                          | 5,76                                      | 6,55                                      | 0,999331                             | 5,59                     | 1,79                            |                              |
|        | 6,14                                          | 5,81                                      | 6,54                                      | 0,999340                             | 5,12                     | 1,95                            |                              |
|        | 9,52                                          | 9,09                                      | 10,00                                     | 1,000582                             | 4,13                     | 2,42                            |                              |
|        | 9,58                                          | 9,15                                      | 10,08                                     | 1,000602                             | 4,19                     | 2,39                            |                              |
|        | 9,73                                          | 9,27                                      | 10,09                                     | 1,000628                             | 3,67                     | 2,75                            | 1,8                          |
| 3      | 4,32                                          | 4,01                                      | 4,75                                      | 0,998667                             | 7,38                     | 1,35                            |                              |
|        | 4,49                                          | 4,19                                      | 4,93                                      | 0,998732                             | 7,09                     | 1,40                            |                              |
|        | 5,76                                          | 5,45                                      | 6,20                                      | 0,999200                             | 5,56                     | 1,80                            |                              |
|        | 5,88                                          | 5,59                                      | 6,29                                      | 0,999243                             | 5,11                     | 1,96                            |                              |
|        | 9,27                                          | 8,85                                      | 9,78                                      | 1,000493                             | 4,33                     | 2,31                            |                              |
|        | 9,28                                          | 8,90                                      | 9,74                                      | 1,000494                             | 3,90                     | 2,56                            | 1,8                          |
| 4      | 4,70                                          | 4,35                                      | 5,15                                      | 0,998809                             | 7,21                     | 1,39                            |                              |
|        | 4,80                                          | 4,48                                      | 5,24                                      | 0,998846                             | 6,82                     | 1,47                            |                              |
|        | 6,33                                          | 5,97                                      | 6,89                                      | 0,999407                             | 6,27                     | 1,59                            |                              |
|        | 6,47                                          | 6,07                                      | 6,95                                      | 0,999459                             | 5,87                     | 1,70                            |                              |
|        | 6,51                                          | 6,15                                      | 6,98                                      | 0,999476                             | 5,44                     | 1,84                            |                              |
|        | 9,10                                          | 8,69                                      | 9,63                                      | 1,000426                             | 4,46                     | 2,24                            |                              |
|        | 9,11                                          | 8,62                                      | 9,66                                      | 1,000430                             | 4,93                     | 2,03                            |                              |
|        | 9,14                                          | 8,66                                      | 9,65                                      | 1,000441                             | 4,68                     | 2,14                            | 1,5                          |

Continuação da Tabela XXIII.

|         |      |      |      |          |      |      |      |
|---------|------|------|------|----------|------|------|------|
| 5       | 2,69 | 2,54 | 2,96 | 0,998068 | 6,70 | 1,49 |      |
|         | 3,71 | 3,53 | 4,03 | 0,998443 | 5,79 | 1,72 |      |
|         | 5,00 | 4,74 | 5,39 | 0,998919 | 5,60 | 1,79 |      |
|         | 5,13 | 4,86 | 5,51 | 0,998966 | 5,45 | 1,84 |      |
|         | 5,28 | 5,03 | 5,63 | 0,999020 | 4,89 | 2,04 |      |
|         | 8,15 | 7,78 | 8,57 | 1,000078 | 4,18 | 2,39 |      |
|         | 8,24 | 7,89 | 8,69 | 1,000114 | 4,19 | 2,39 |      |
|         | 9,13 | 8,77 | 9,61 | 1,000440 | 3,94 | 2,54 | 0,93 |
| 6       | 3,94 | 3,70 | 4,25 | 0,998528 | 6,06 | 1,65 |      |
|         | 3,97 | 3,71 | 4,35 | 0,998540 | 6,97 | 1,44 |      |
|         | 4,59 | 4,26 | 5,00 | 0,998769 | 6,90 | 1,45 |      |
|         | 4,69 | 4,38 | 5,10 | 0,998807 | 6,59 | 1,52 |      |
|         | 4,82 | 4,55 | 5,22 | 0,998853 | 5,95 | 1,68 |      |
|         | 8,69 | 8,22 | 9,24 | 1,000275 | 5,07 | 1,97 |      |
|         | 8,72 | 8,23 | 9,29 | 1,000288 | 5,24 | 1,91 |      |
|         | 8,72 | 8,23 | 9,29 | 1,000288 | 5,24 | 1,91 | 0,86 |
| 7       | 4,10 | 3,87 | 4,45 | 0,998589 | 6,08 | 1,64 |      |
|         | 4,12 | 3,88 | 4,48 | 0,998597 | 6,26 | 1,60 |      |
|         | 4,22 | 4,01 | 4,56 | 0,998633 | 5,61 | 1,78 |      |
|         | 4,97 | 4,71 | 5,32 | 0,998907 | 5,32 | 1,88 |      |
|         | 5,05 | 4,83 | 5,41 | 0,998938 | 4,89 | 2,05 |      |
|         | 7,01 | 6,75 | 7,41 | 0,999659 | 4,06 | 2,46 |      |
|         | 8,41 | 8,00 | 8,89 | 1,000173 | 4,57 | 2,19 |      |
|         | 8,49 | 8,09 | 8,96 | 1,000204 | 4,47 | 2,24 | 0,84 |
| 8       | 3,39 | 3,12 | 3,62 | 0,998290 | 6,30 | 1,58 |      |
|         | 4,41 | 3,96 | 5,04 | 0,998677 | 5,63 | 1,78 |      |
|         | 5,08 | 4,67 | 5,37 | 0,998925 | 5,94 | 1,68 |      |
|         | 5,47 | 5,05 | 5,83 | 0,999055 | 6,15 | 1,63 |      |
|         | 5,47 | 5,12 | 5,89 | 0,999091 | 6,00 | 1,67 |      |
|         | 5,49 | 5,11 | 5,83 | 0,999062 | 5,65 | 1,77 | 0,66 |
| estoque | 3,62 | 3,42 | 3,95 | 0,995412 | 6,33 | 1,58 |      |
|         | 3,62 | 3,36 | 3,94 | 0,998412 | 6,88 | 1,45 |      |
|         | 3,87 | 3,64 | 4,21 | 0,998503 | 6,37 | 1,57 |      |
|         | 3,89 | 3,65 | 4,26 | 0,998513 | 6,78 | 1,47 |      |
|         | 4,90 | 4,66 | 5,28 | 0,998882 | 5,50 | 1,82 |      |
|         | 5,07 | 4,77 | 5,50 | 0,998944 | 6,25 | 1,60 |      |

Continuação da Tabela XXIII

|      |      |       |          |      |      |      |
|------|------|-------|----------|------|------|------|
| 7,90 | 7,54 | 8,32  | 0,999985 | 4,27 | 2,34 |      |
| 9,32 | 8,91 | 9,79  | 1,000508 | 4,08 | 2,45 |      |
| 9,61 | 9,30 | 10,04 | 1,000614 | 3,31 | 3,02 | 1,50 |

molecular em função da concentração para as diversas frações e solução estoque respectivamente e a figura 31 da solução estoque.

Na figura 30 é apresentado o histograma da variação do peso molecular para esta amostra de dextrana estudada.

## 2.10. Osmocentrifugação

### 2.10.1. Metodologia

Denomina-se osmocentrifugação a osmossedimentação a baixo campo inercial. Experimentos de osmocentrifugação foram realizados com o objetivo de investigar a eficiência do método na concentração de dextrana em solução aquosa.

Utilizou-se nos experimentos de osmocentrifugação células de 12 cm de altura com oito compartimentos interligados (figura 32) em centrífuga refrigerada RC-3B, a 20,0°C. No ponto médio da célula de osmocentrifugação, tem-se uma aceleração inercial correspondendo a 900 x g, para a velocidade do rotor de 2000 rpm.

As membranas assimétricas de acetato de celulose que o método requer foram preparadas conforme apresentado na seção 2.8.1. As concentrações foram determinadas por leitura direta da densidade da solução contida em cada compartimento da célula.

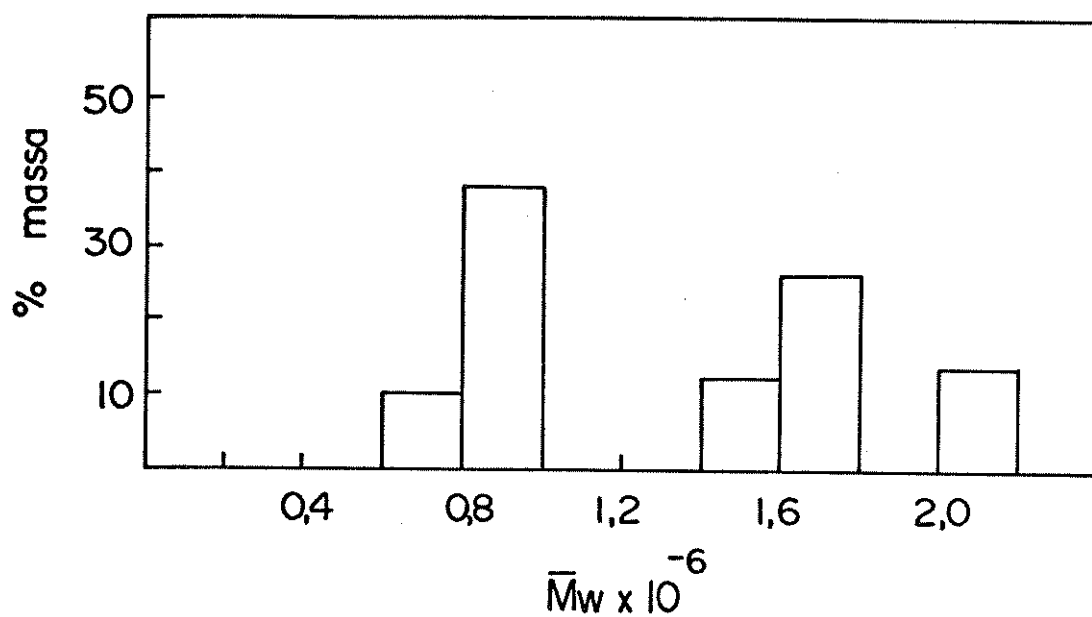


FIGURA 30. Histograma do peso molecular em massa da amostra de dextrana.

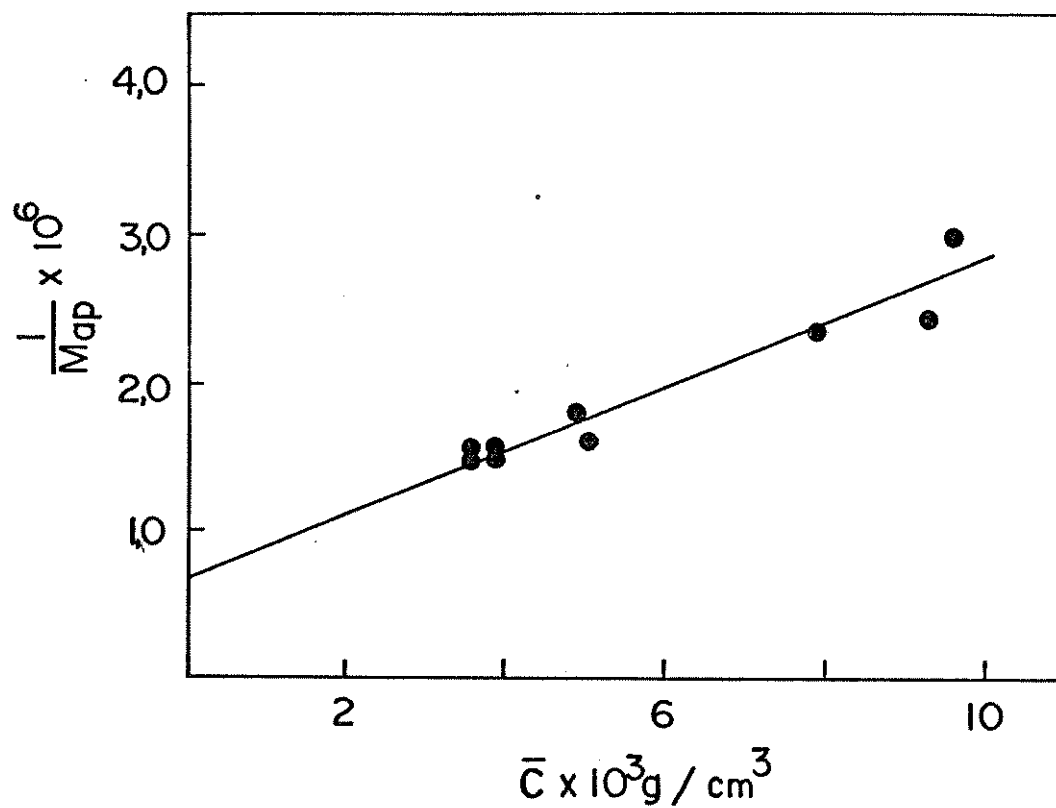


FIGURA 31. Inverso do peso molecular aparente da solução estoque de dextrana, utilizada no fracionamento, em função da concentração, a 25,0°C.

O estudo foi estendido ao efeito da concentração de dextrana ( $\bar{M}_w = 5 \times 10^5$ ) em presença de dextrana azul ( $\bar{M}_w = 2 \times 10^6$ ). A análise destes resultados permite avaliar se a sedimentação de macromoléculas é modificada quando se encontram presentes na solução macromoléculas de menor peso molecular e em maior concentração, ou seja, se há arraste das macromoléculas maiores pela sedimentação das menores. Estes experimentos foram feitos a 3000 rpm, 20,0°C, utilizando-se a célula esquematizada na figura 33. As amostras da solução a diversas alturas foram retiradas com seringa e o efeito da concentração de dextrana azul foi acompanhado espectrofotometricamente a 620 nm.

#### 2.10.2. Osmocentrifugação de Dextrana

Os experimentos de osmocentrifugação de dextrana (lote 38C-0123) foram feitos em duas faixas de concentração e em tempo de centrifugação de 2, 4 e 18 horas. As experiências foram realizadas a 20,0°C e à velocidade do rotor de 2000 rpm. Na tabela XXIV tem-se a fração de massa acumulada a partir do fundo da célula de diálise (a distância entre cada ponto médio entre os compartimentos da célula é de 1 cm) para solução de dextrana numa dada concentração e no tempo de centrifugação correspondente. No controle, a membrana semipermeável foi substituída por um filme de polietileno, atribuindo-se o efeito de concentração da macromolécula somente ao campo inercial aplicado. Nas figuras 34a e 34b são apresentados os gráficos da fração de massa acumulada a partir do fundo em função da altura. Comparando-se as curvas obtidas por osmocentrifugação com o controle, notou-se a maior eficiência do sistema osmoticamente acoplado.

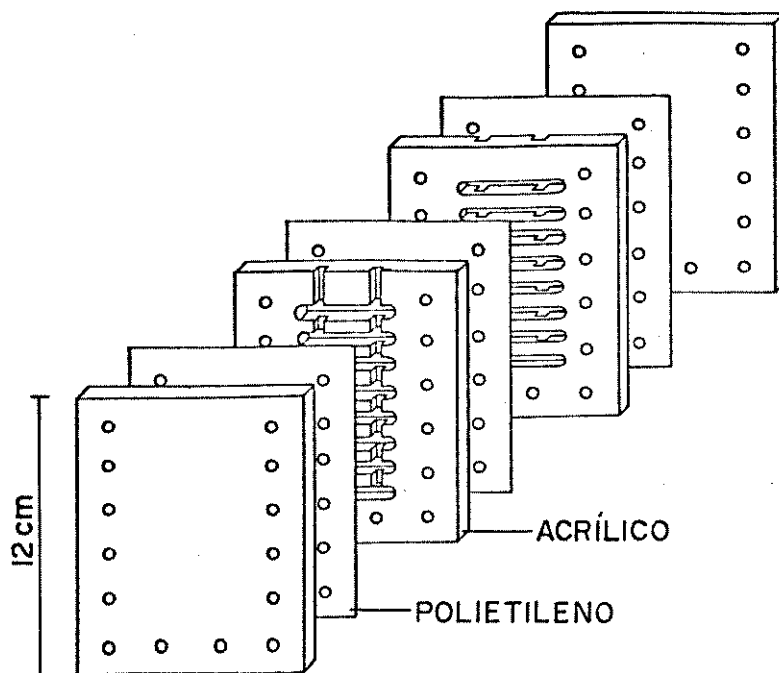


FIGURA 32. Esquema de uma célula de osmocentrifugação utilizada no estudo de concentração de macrossolutos.

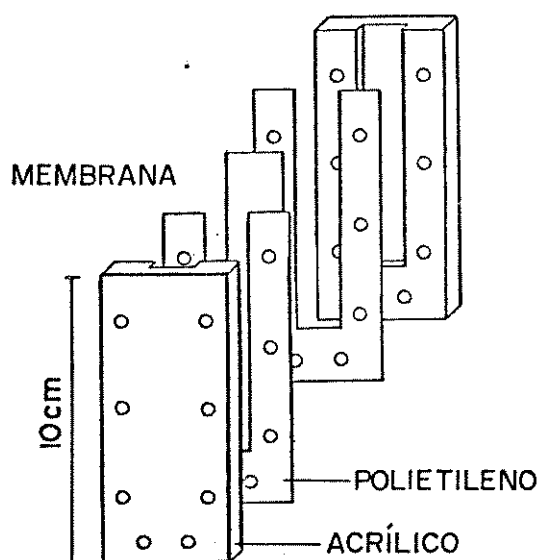


FIGURA 33. Esquema de uma célula de osmocentrifugação utilizada para estudar o arraste de um macrossoluto em presença de um outro macrossoluto.

TABELA XXIV. Osmocentrifugação de solução aquosa de dextrana a 2000 rpm, na temperatura de 20,0°C.

| Conc x 10 <sup>3</sup> (g/ml) | Tempo (h) | % de massa acumulada a partir do fundo da célula |      |       |      |       |      |      |       |
|-------------------------------|-----------|--------------------------------------------------|------|-------|------|-------|------|------|-------|
| 9,5                           | 2         | 29,7                                             | 46,6 | 61,3  | 73,9 | 85,01 | 90,9 | 96,5 | 100,0 |
| 9,4                           | 4         | 35,4                                             | 57,2 | 75,10 | 85,8 | 91,8  | 96,1 | 98,8 | 100,0 |
| 8,5                           | 18        | 43,9                                             | 74,1 | 90,4  | 96,4 | 98,3  | 99,2 | 99,7 | 100,0 |
| 18,4                          | 2         | 23,6                                             | 44,0 | 60,1  | 73,9 | 85,2  | 92,6 | 97,3 | 100,0 |
| 17,3                          | 4         | 29,8                                             | 53,5 | 70,3  | 82,7 | 90,4  | 94,9 | 97,7 | 100,0 |
| 16,5                          | 18        | 32,3                                             | 58,6 | 77,7  | 90,6 | 96,5  | 98,6 | 99,6 | 100,0 |
| controle 18,2                 | 18        | 13,4                                             | 26,4 | 39,3  | 52,2 | 64,8  | 77,2 | 89,2 | 100,0 |

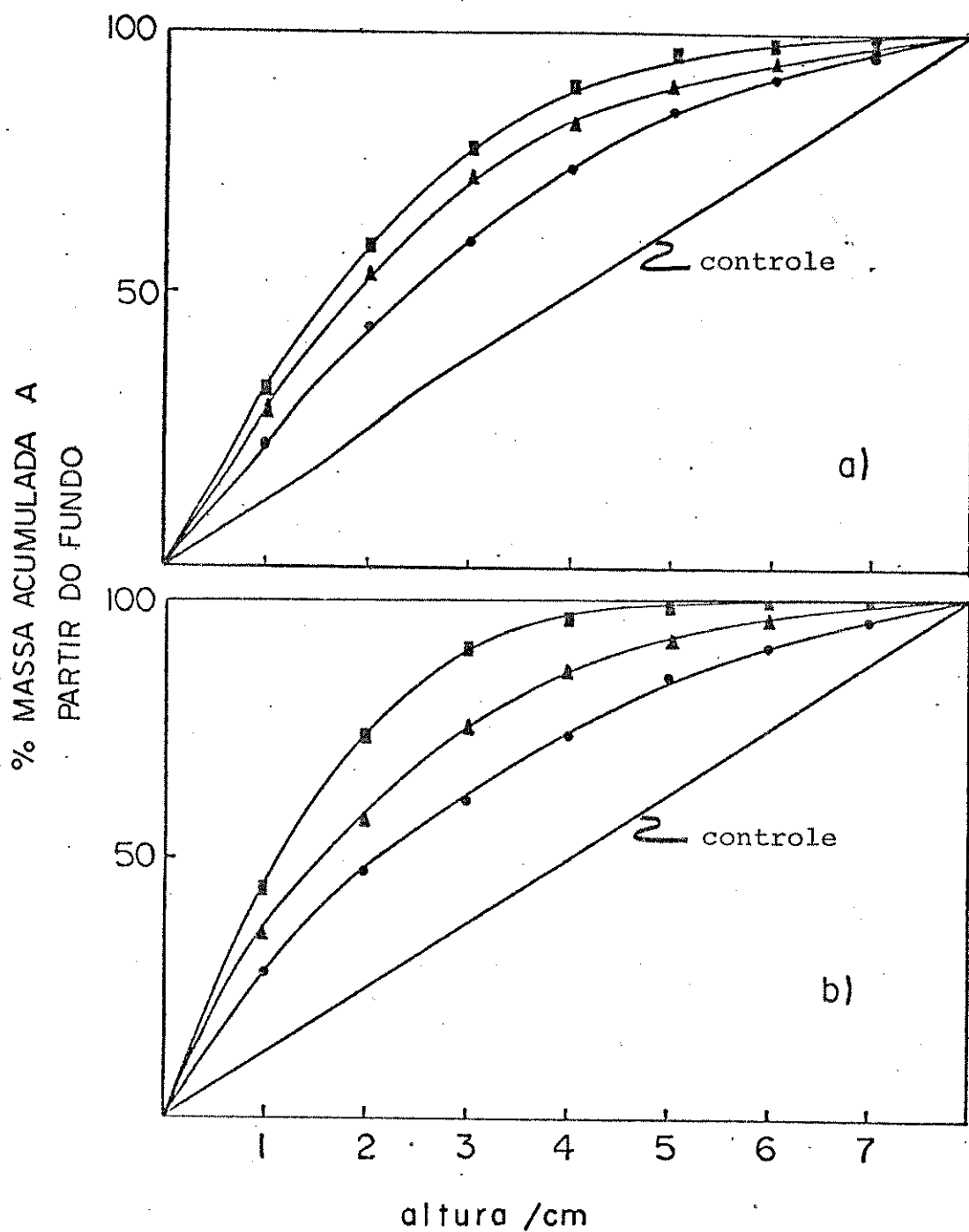


FIGURA 34. Osmocentrifugação de solução de dextrana a concentração inicial (a) 0,9% e (b) 1,7%, a 2000 rpm, durante (●) 2h, (▲) 4h e (■) 18h.

### 2.10.3. Osmocentrifugação de uma Mistura de Dextrana e Dextrana Azul.

Com o objetivo de se analisar o comportamento de um macrossoluto num sistema de três componentes (solvente e duas macromoléculas diferentes), investigou-se o comportamento de dextrana azul (DA) em solução aquosa em presença de dextrana T 500.

A solução de dextrana azul foi preparada por pesagem direta do sólido, dissolvido numa solução 0,1 M de NaCl. Os experimentos foram feitos com soluções de dextrana azul de concentração igual a  $1 \times 10^{-3}$  g/ml em presença de dextrana, na concentração de  $10 \times 10^{-3}$  g/ml. Na tabela XXV estão listados os valores correspondentes a média de duplicatas, da fração de massa acumulada a partir do fundo da célula para soluções de dextrana azul e de dextrana azul em presença de dextrana em tempos de 2, 4 e 16 horas de centrifugação, a 3000 rpm e 20°C.

Na figura 35 tem-se o gráfico da fração de massa da dextrana azul (expressa em percentagem) em função da altura para experimentos realizados a baixo campo inercial. As curvas mostram que existe uma maior eficiência de concentração de dextrana azul em presença de dextrana, principalmente a tempos menores. Ou seja, o soluto em maior concentração parece exercer um efeito de arrastamento sobre o soluto em concentração mais baixa. Este efeito é mais pronunciado quando o tempo de centrifugação é menor.

TABELA XXV. Osmocentrifugação de solução aquosa de dextrana azul (DA) e dextrana (DT 500)-dextrana azul a 300 rpm, na temperatura de 20,0°C.

| Tempo/h | $c \times 10^{-3}$ g/ml DA | $c \times 10^{-3}$ g/ml DT500 | % de DA acumulada a partir do fundo da célula |      |      |       |
|---------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|------|------|-------|
| 2,0     | 1                          | —                             | 35,4                                          | 62,8 | 83,9 | 100,0 |
| 2,0     | 1                          | 10                            | 56,3                                          | 83,5 | 94,7 | 100,0 |
| 4,0     | 1                          | —                             | 50,8                                          | 75,7 | 91,6 | 100,0 |
| 4,0     | 1                          | 10                            | 70,7                                          | 93,6 | 97,9 | 100,0 |
| 16,0    | 1                          | —                             | 78,0                                          | 92,9 | 97,5 | 100,0 |
| 16,0    | 1                          | 10                            | 80,8                                          | 97,9 | 99,3 | 100,0 |

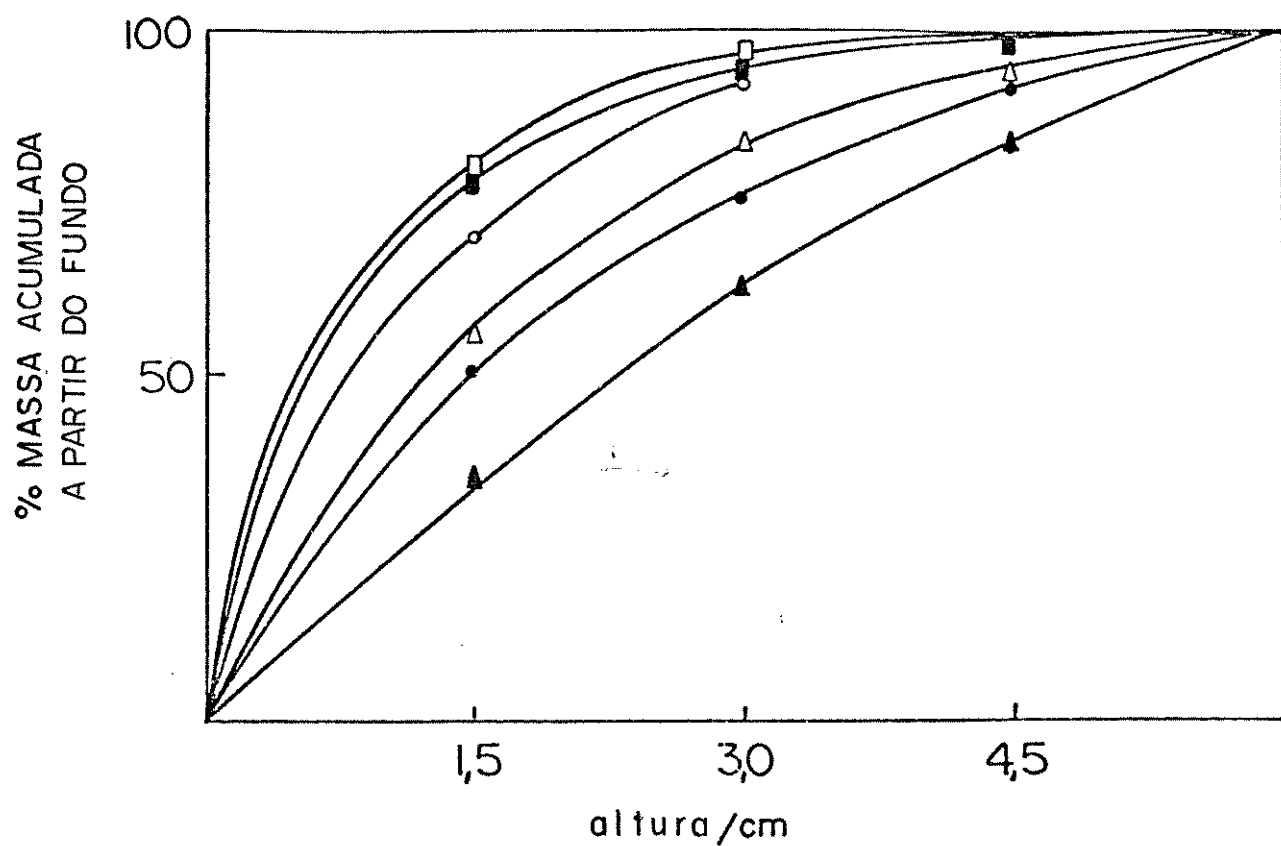


FIGURA 35. Osmocentrifugação de dextrana azul de concentração inicial 0,1%, durante (▲) 2h, (●) 4h e (■) 16h e dextrana azul (0,1 %) em presença de dextrana (1,0%), durante (Δ) 2h, (○) 4h e (◻) 16h, a 3000 rpm.

## III. DISCUSSÃO

## Atingimento do equilíbrio de sedimentação.

Na determinação de parâmetros físico-químicos de macromoléculas em solução através de experimentos de osmossedimentação utilizam-se equações válidas somente se o sistema em estudo se encontra no estado de equilíbrio. Assim, o primeiro objetivo deste trabalho foi a verificação do alcance do equilíbrio em experimentos de osmossedimentação, em células de 20 cm de altura, sob gravidade.

5630/BC Nos experimentos do tipo A e do tipo B, descritos na parte experimental e resultados, os sistemas macromolécula-solvente mesmo partindo de condições iniciais diferentes, deveriam chegar ao mesmo estado final para comprovação do alcance do estado de equilíbrio de sedimentação-difusão. Este estado de equilíbrio para soluções de dextrana foi alcançado em experimentos de osmossedimentação sob gravidade, a 20,0°C, em tempos da ordem de 10 horas, o que corresponde aproximadamente a 1/50000 do tempo requerido em sedimentação normal. Para experimentos do tipo B, o tempo necessário foi de 120 horas. Esta diferença do tempo necessário ao alcance do equilíbrio se deve: i) à distância entre os estados inicial e final do sistema em cada caso; ii) a diferença nos padrões de corrente de massa de solvente.

No início dos experimentos de osmossedimentação do tipo A,  $c_6$  é igual a  $c_1$  ( $c_6/c_1 = 1$ ). Por outro lado, no início dos experimentos tipo B,  $c_6/c_1$  é igual a zero. Atingindo o equilíbrio, nos dois tipos de experimento,  $c_6/c_1$  assume o valor 0,85. Uma comparação dos dois processos é esquematizada na figura 36. Nos

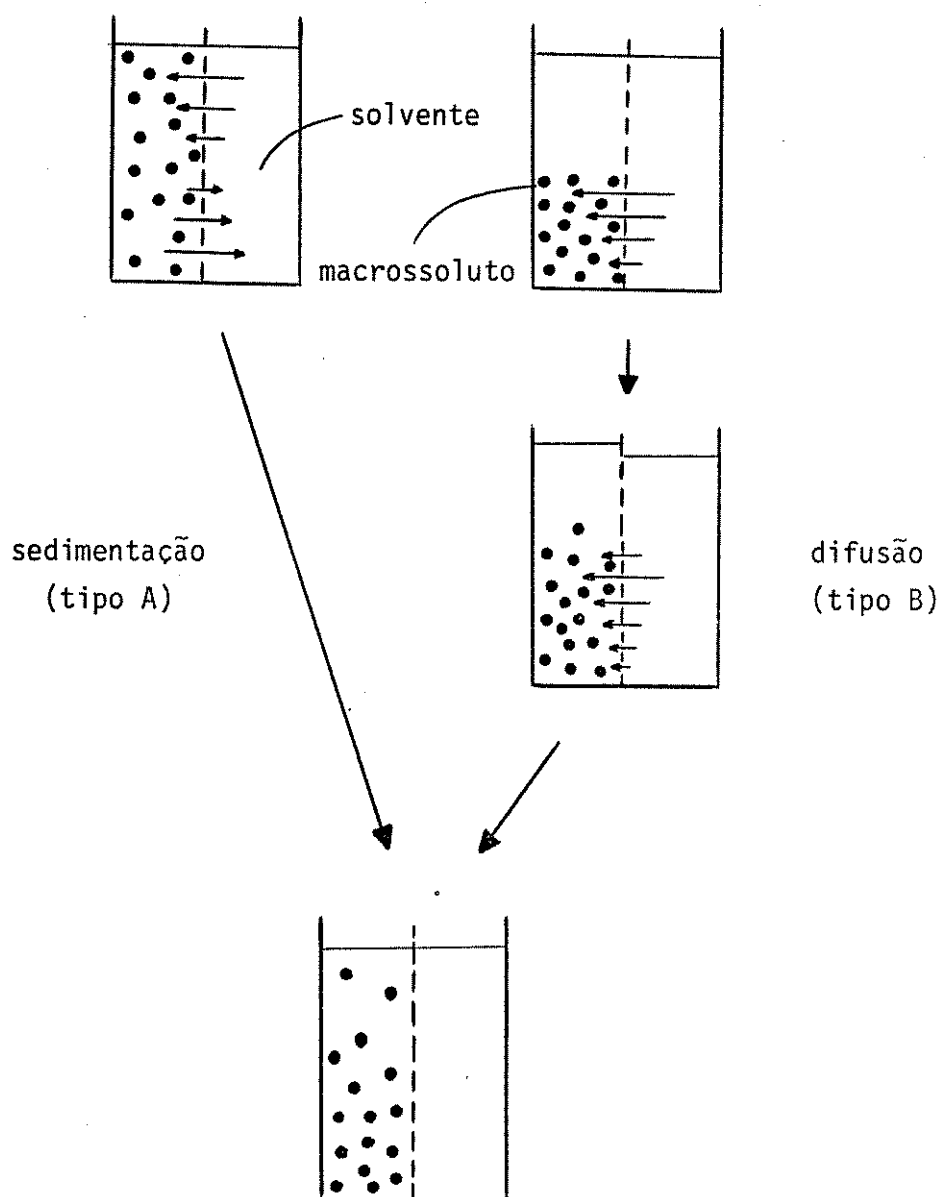


FIGURA 36. Esquema dos processos de sedimentação e difusão em experimentos de osmossedimentação.

experimentos do tipo A, ocorre osmose na parte superior e osmose reversa na parte inferior da célula, desde o início da experiência. Nos do tipo B, no início tem-se este fenômeno somente na metade inferior da célula. Só à medida em que ocorre migração do soluto para a metade superior da célula é que passa a ocorrer fluxo osmótico nessa região.

A área útil da membrana semipermeável é outro fator que contribui para a velocidade de sedimentação-difusão em experimentos de osmosedimentação, e está relacionada com o desenho da célula empregado. Experimentos de osmosedimentação com prata coloidal<sup>83</sup> na concentração de 0,16 g/l em colato de sódio 0,10%, a 27°C, sob gravidade, mostraram que o atingimento do estado de equilíbrio de sedimentação-difusão depende da geometria da célula. Nos experimentos feitos em células que fornecem uma maior relação entre a área da membrana e o volume de solução macromolecular, o estado de equilíbrio foi alcançado mais rapidamente.

Como era de se esperar, pelas mesmas razões discutidas anteriormente, o valor de equilíbrio da razão  $\frac{c_4}{c_3}$  é obtido em um tempo menor do que  $\frac{c_5}{c_2}$  e esta razão em um tempo menor do que  $\frac{c_6}{c_1}$ .

#### Determinação de peso molecular.

O peso molecular de macromoléculas em solução pode ser determinado por diferentes métodos. Alguns métodos, tais como osmometria, espalhamento de luz, equilíbrio de sedimentação e sedimentação-difusão são universais e absolutos. Por outro lado, métodos como cromatografia em meio poroso e eletroforese em géis também têm sido muitíssimo utilizados, mas dependem de curvas de calibração previamente estabelecidas. Isto significa que o er-

ro na determinação do peso molecular de macromoléculas por estes métodos, está diretamente relacionado com o valor do peso molecular utilizado na padronização e algumas vezes é considerável. Por exemplo, um trabalho bastante rigoroso, conduzido por dois laboratórios independentes<sup>84</sup>, usando amostras de poliestireno fornecidas para calibração de colunas cromatográficas mostrou que os seus pesos moleculares, determinados a partir dos coeficientes de sedimentação e difusão do polímero, podem apresentar erros de até 25% para amostras de  $\bar{M}_w$  da ordem de  $2 \times 10^6$ . O erro foi reduzido para 11% quando foram analisadas amostras de peso molecular nominal menor ( $9,8 \times 10^4$ ), mas ainda insatisfatório para que os valores possam ser utilizados em calibrações. Este trabalho coloca sob suspeita um grande número de trabalhos experimentais recentes, em que padrões de calibração fornecidos comercialmente foram utilizados.

Nesta tese determinou-se o peso molecular de diferentes macromoléculas através do método de osmossedimentação, a partir do gradiente de concentração de soluções no estado de equilíbrio. Assim, na determinação do peso molecular de dextrana foi utilizado por conveniência de tempo os experimentos do tipo A, ao invés dos experimentos de difusão (tipo B).

Para sistemas monodispersos que obedecem a equação barométrica (equação 41), o gráfico do logaritmo de concentração da solução em função da profundidade é linear, e sua inclinação depende de parâmetros externos (temperatura, campo inercial) e parâmetros internos, tais como densidade da solução, volume específico parcial e peso molecular do soluto. Para amostras polidispersas de polímeros,  $\ln c$  não é função linear da profundidade. A amostra de dextrana T 500 estudada, que apresenta uma re

lação de  $M_w/M_n$  igual a 1,7 (conforme o fabricante), apresentou um desvio da linearidade nos pontos correspondentes aos extremos da célula de diálise (figura 14). Devido a esta polidispersidade da dextrana, no cálculo do peso molecular foi utilizada a equação 36, aplicada a resultados de experimentos realizados a várias concentrações de macrossoluto. Assim, para cada concentração média de dextrana T 500, determinou-se um peso molecular médio aparente, que foi extrapolado para concentração zero. Para sistemas que não apresentam comportamento ideal, o peso molecular aparente varia com a concentração, mantendo-se os demais parâmetros constantes. Por exemplo, para dextrana em meio aquoso sob mesma pressão, campo inercial e em temperatura superior a temperatura  $\theta$ , um aumento da concentração leva a uma diminuição do peso molecular aparente. Este efeito é mais pronunciado a temperatura mais elevada. Em temperatura inferior a temperatura  $\theta$ , é observado um comportamento inverso, ou seja, o peso molecular aumenta com o aumento da concentração.

Outro fato experimental observado a concentrações altas de macrossoluto é a maior reprodutibilidade nas determinações de peso molecular aparente.

Os pesos moleculares obtidos neste trabalho e os fornecidos na literatura para os macrossolutos estudados encontram-se listados na tabela XXVI.

O peso molecular médio de dextrana T 500, obtido por extração a concentração nula através de experimentos de osmose-dimentação, nas três temperaturas estudadas, concordam com os valores obtidos por Suzuki<sup>85</sup> ( $5,34 \times 10^5$ ) e Soeteman<sup>86</sup> ( $5,46 \times 10^5$ ) por cromatografia de permeação em gel.

TABELA XXVI. Características dos macrossolutos estudados neste trabalho.

| Amostra                       | Temperatura<br>°C | $\bar{M}_w \times 10^{-5}$ | $A_2 \times 10^4$<br>mol cm <sup>3</sup> g <sup>-2</sup> | Ref.          |
|-------------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------|---------------|
| T 500                         | 5,5               | 5,3 ± 0,3                  | -0,34 ± 0,10                                             | este trabalho |
|                               | 20,0              | 5,3 ± 1,2                  | 0,67 ± 0,37                                              | este trabalho |
|                               | 40,0              | 5,3 ± 1,2                  | 2,48 ± 0,63                                              | este trabalho |
|                               |                   | 4,2                        | 6,82 <sup>a</sup>                                        | 74            |
|                               |                   | 5,34 <sup>b</sup>          |                                                          | 85            |
|                               |                   | 5,46 <sup>b</sup>          |                                                          | 86            |
| Sigma<br>(lote 58C-0296)      | 7,1               | 18,9 ± 4,0                 | 0,12 ± 0,01                                              | este trabalho |
| Sigma<br>(lote 38C-0123)      | 10,0              | 7,2 ± 0,5                  | 0,24 ± 0,16                                              | este trabalho |
|                               | 16,0              | 7,5 ± 0,6                  | 0,62 ± 0,15                                              | este trabalho |
|                               | 25,0              | 7,4 ± 0,9                  | 1,40 ± 0,26                                              | este trabalho |
| ICN (5-40 x 10 <sup>6</sup> ) | 25,0              | 12,0 ± 10,3                | 9,03 ± 0,97                                              | este trabalho |
| NRRL B-512                    |                   | 4,45                       | 4,2 <sup>c</sup>                                         | 75            |
|                               |                   | 27,0                       | 2,5 <sup>c</sup>                                         | 75            |
| Lote 64.1658.01               | 4,0               | 0,50                       | 3,20 <sup>c</sup>                                        | 76            |
|                               | 27,0              | 0,52                       | 2,5 <sup>c</sup>                                         | 76            |
| Tiroglobulina                 | 20,0              | 7,1 ± 0,7                  | ~0                                                       | este trabalho |
|                               |                   | 6,7                        | ~0                                                       | 77            |

<sup>a</sup>  $A_2$  determinado por equilíbrio de sedimentação.

<sup>b</sup>  $\bar{M}_w$  determinado por cromatografia de permeação em gel.

<sup>c</sup>  $A_2$  determinado por espalhamento de luz.

O peso molecular calculado a partir da viscosidade intrínseca desta amostra de dextrana, ( $[\eta] = 53,6$ ,  $\bar{M}_w = 5,4 \times 10^5$ , tabela XVIII) acha-se também em concordância com o valor obtido por osmossedimentação.

A determinação do gradiente de concentração obtido por osmossedimentação de soluções de tiroglobulina foi feita no mesmo meio descrito por H. Edelhoch<sup>77</sup>. Nas condições de pH e força iônica utilizadas, a tiroglobulina encontra-se predominantemente na forma denotada por 19S. O comportamento de solução monodispersa pode ser observado na figura 17, ou seja, não existe desvio da linearidade na curva de logaritmo de concentração em função da profundidade, para experimentos individuais de osmossedimentação de tiroglobulina.

A tiroglobulina foi utilizada sem purificação prévia, sendo que a análise espectrofotométrica de amostras da solução e do solvente indicou a presença de um componente de baixo peso molecular que atravessou a membrana semipermeável. Como existe uma grande diferença entre os espectros UV da solução e do solvente pode-se afirmar que este componente que permeia a membrana seja um contaminante. A presença deste componente nos dois lados da célula, modifica o potencial químico do solvente. Nos experimentos de osmossedimentação com a solução de tiroglobulina, preparada sem purificação prévia, não foi determinada diferença na concentração com a profundidade de amostras do solvente, isto é, o componente designado de contaminante encontra-se igualmente distribuído ao longo da célula. No lado da solução uma análise semelhante torna-se difícil. Entretanto, sendo o peso molecular determinado a partir da inclinação da curva do logaritmo de concentração em função da profundidade, mesmo que o contaminan-

te esteja igualmente distribuído ao longo da coluna haverá uma variação da inclinação e conseqüentemente um erro sistemático na determinação do peso molecular calculado. As observações realizadas nos experimentos de osmossedimentação de soluções de tiroglobulina mostraram que a quantidade de contaminante que atravessou a membrana foi em torno de 5% que implicaria numa variação um pouco menor, em torno de 4,5%, na inclinação da curva de logaritmo da concentração em função da profundidade.

Os pesos moleculares calculados para a tiroglobulina em solução aquosa, a 20°C, pH 5,8 e força iônica 0,1 forneceram um valor médio de  $(7,1 \pm 0,5) \times 10^5$  que é coerente com o fornecido na literatura<sup>77</sup> para as mesmas condições, de  $6,7 \times 10^5$ . Este resultado, para tiroglobulina, demonstra a aplicabilidade do método de osmossedimentação para determinação do peso molecular. Entretanto, a viabilização deste método para análise de proteínas, requer ainda a minimização da quantidade do macrossoluto nos experimentos individuais, conforme se discutirá posteriormente.

Para dextrana D 5376 - Sigma (lote nº 38C-012) foi obtido  $\bar{M}_w$  igual a  $(7,2 \pm 0,5) \times 10^5$ ,  $(7,5 \pm 0,6) \times 10^5$  e  $(7,4 \pm 0,9) \times 10^5$  nas temperaturas de 10,0, 16,0 e 25,0°C respectivamente. A sistemática seguida para a determinação destes valores foi a mesma discutida anteriormente para dextrana T 500, sendo que os valores resultantes encontram-se abaixo do fornecido pelo fabricante. Passou-se então a estudar a mesma amostra por outros métodos, tais como velocidade de sedimentação, viscosimetria e titulação potenciométrica.

Conforme apresentado anteriormente, o método de velocidade de sedimentação requer a determinação dos coeficientes de sedimentação e difusão do macrossoluto. O coeficiente de sedimenta

ção é obtido através do deslocamento da fronteira macrossoluto-solvente criada sob ação de um grande campo inercial. Em sistemas paucidispersos, isto é, com estreita distribuição do peso molecular, é observado o efeito Johnston-Ogston<sup>87</sup>. Assim, para componentes com maior velocidade de sedimentação, a curva de  $dn/dx$  em função do deslocamento ( $x$ ) terá uma área menor devido ao gradiente do outro componente ter sido subtraído. Na análise de sedimentação de sistemas macromoleculares polidispersos este efeito torna-se mais acentuado, o que pode ser observado através da formação de curvas não simétricas de  $dn/dx$  vs  $x$ . Este efeito foi observado nas amostras de dextrana estudadas. Por outro lado, o coeficiente de sedimentação é dependente da concentração, além de que, não existe uma correspondência única entre coeficiente de sedimentação e peso molecular.

Segundo Elmgren<sup>53</sup>, no fator de flutuação da equação a utilização da densidade da solução ou a densidade do solvente corrigida por um fator relacionado ao fluxo contrário à sedimentação da macromolécula, fornece valores corretos. Entretanto, em um nível microscópico a densidade do solvente é que realmente atua.

Os experimentos realizados para medida de  $D$ , revelaram a presença de uma pequena fração de dextrana de elevado peso molecular que sedimentou mesmo a baixa velocidade do rotor. Assim, no cálculo de  $\bar{M}_w$  por este método não são computadas todas as frações de diferentes pesos moleculares presentes, o que é feito no método de osmossedimentação. Mesmo assim, o valor  $\bar{M}_w$  obtido por velocidade de sedimentação igual a  $2,8 \times 10^5$  encontra-se em ordem de grandeza distinta do valor nominal fornecido pelo fabricante.

O peso molecular para esta mesma amostra de dextrana foi determinado através da viscosidade intrínseca. Este método de determinação do peso molecular de macrossolutos necessita de calibrações prévias, que estão diretamente relacionadas com a conformação da macromolécula em estudo. Este fato pode ser observado na tabela XVIII onde se verifica que o peso molecular da dextrana varia, dependendo dos valores dos parâmetros  $a$  e  $K$  da equação de Mark-Houwink que foram tomados. Neste ponto é conveniente salientar que a dextrana utilizada para a construção da curva de calibração de  $\log \bar{M}_w$  vs  $[\eta]$  é de origem distinta da que se está analisando. Entretanto, os valores do peso molecular obtido por medidas viscosimétricas da dextrana em estudo também indicam que o peso molecular médio deve ser menor do que o valor nominal fornecido pelo fabricante.

Foi também avaliado o peso molecular para esta mesma amostra de dextrana por titulação turbidimétrica, que é um método útil para estimativas de peso molecular.

O valor de  $\bar{M}_w$  obtida a partir da titulação turbidimétrica da amostra de dextrana com etanol foi de  $1 \times 10^5$ . Este valor é bastante inferior ao valor nominal para esta amostra de dextrana em estudo. Deve ser levado em consideração que o valor foi obtido de uma curva de calibração, apresentada por Basedow e Ebert<sup>80</sup>, para frações de dextrana da Pharmacia Fine Chemicals. Além das amostras comparadas serem de diferentes fabricantes, a curva do logaritmo de  $\bar{M}_w$  em função da concentração de etanol (necessária para que a solução de dextrana fique turva), apresenta uma grande variação de  $\bar{M}_w$  para um pequeno aumento da concentração de etanol e conseqüentemente um maior erro em determinações com amostras de peso molecular elevado. Tomando-se amostra de

dextrana de peso molecular nominal igual a  $4 \times 10^4$  (Pharmacia Fine Chemicals) a titulação turbidimétrica forneceu um valor de  $\bar{M}_w$  igual a  $2 \times 10^4$ . Para esta amostra de dextrana, que é do mesmo fabricante daquele com que fora feita a curva de  $\log \bar{M}_w$  vs % etanol, o peso molecular nominal e o calculado encontram-se numa mesma ordem de grandeza.

Mesmo sendo o método de determinação do peso molecular por titulação turbidimétrica de baixa precisão, mais uma vez constata-se que o peso molecular obtido desta amostra de dextrana, é menor do que o valor nominal.

Já o exame do peso molecular de outra amostra de dextrana com especificações idênticas do mesmo fabricante, mas de outro lote, determinado por osmossedimentação, encontra-se ilustrado na figura 23, sendo obtido o peso molecular médio ( $\bar{M}_w$ ) à concentração zero de  $(1,9 \pm 0,5) \times 10^6$ . Este valor apresenta coerência com os obtidos por cromatografia de permeação em gel ( $2,43 \times 10^6$ ) e por espalhamento de luz ( $1,80 \times 10^6$ ) para esta mesma amostra.

#### Coeficiente de virial e temperatura $\theta$ .

As soluções aquosa de dextrana, nas diversas condições estudadas, não apresentaram comportamento de solução ideal. O desvio da idealidade, caracterizado pelo coeficiente de virial ( $A_2$ ) foi determinado para diferentes amostras de dextrana a temperaturas definidas. Os valores de  $A_2$  obtidos neste trabalho, bem como alguns relacionados na literatura encontram-se listados na tabela XXVI. Para a dextrana T 500, tem-se uma variação do valor de  $A_2$  de  $-0,34 \times 10^{-4}$  a  $2,48 \times 10^{-4}$  mol cm<sup>3</sup> g<sup>-2</sup>. Por interpolação, conforme descrito anteriormente, estima-se a temperatu

ra  $\theta$  em que a solução apresenta um comportamento similar ao de solução ideal, ou seja, um valor de  $A_2$  nulo. As temperaturas  $\theta$  calculadas para dextrana T 500 e Sigma (lote 38C-012) foram 10,1 e 7,2°C respectivamente. Infelizmente, mesmo sendo um parâmetro de grande utilidade no estudo de soluções macromoleculares, na literatura tem-se poucos dados de  $\theta$  para soluções de dextrana. Para uma amostra de dextrana de  $\bar{M}_w$  igual a  $4,97 \times 10^4$ , Joucek e Adams<sup>76</sup> determinaram por osmometria a temperatura teta como igual a 16,2°C.

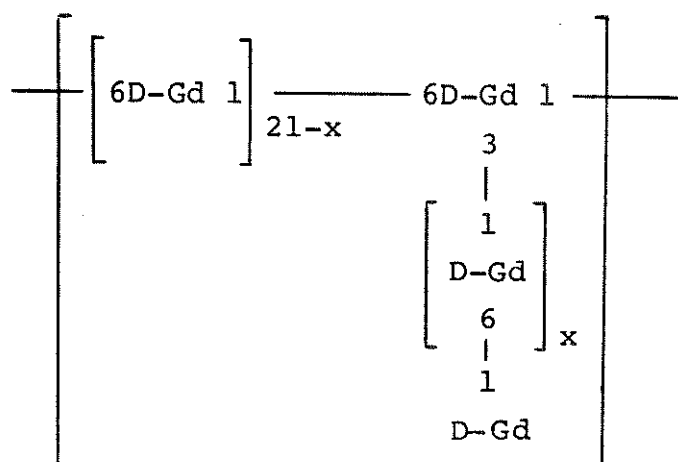
Nos sistemas dextrana-solvente estudados neste trabalho sob temperaturas próximas, o valor de  $A_2$  aumenta com o aumento do peso molecular da dextrana. A dextrana da Sigma (lote 38C-012) com  $\bar{M}_w$  de  $7,4 \times 10^5$  (obtido por osmossedimentação) na temperatura calculada de 7,2°C apresenta um valor nulo de  $A_2$ . Entretanto, a amostra da Sigma (lote 58C-029) com  $\bar{M}_w$  de  $18,9 \times 10^5$ , na temperatura de 7,1°C apresenta um valor positivo para o coeficiente de virial.

#### Ramificação e solvatação de macrossoluto.

Dois fatores de erro intrínseco na determinação do peso molecular de dextrana são: o grau de ramificação e a solvatação da macromolécula.

Van Cleve et al.<sup>88</sup> determinaram a estrutura de dextrana obtida a partir da sacarose em presença de Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512, através de experimentos de metilação. Os resultados indicaram uma estrutura para dextrana NRRL B-512 na qual a unidade média de cadeia consiste de 23 resíduos glicosídicos. Destes, 21 resíduos encontram-se unidos entre si através de ligações do tipo 1,6; um através de ligação do tipo 1,3,6 (ponto

de ramificação) e um outro resíduo glicosídico é o grupo terminal. Este tipo de estrutura é esquematizado abaixo.



Gramath<sup>5</sup>, estudou o grau de ramificação de dextrana através da oxidação com periodato e consequente formação de ácido fórmico. Para dextrana NRRL B-512 determinou uma fração média de 94,2% de ligações 1,6, que se encontra em concordância com o grau de ramificação determinado por Van Cleve et al.

O efeito das ramificações da cadeia principal pode ser notado, por exemplo, na viscosidade intrínseca. Para moléculas lineares em solução nas condições teta, a teoria de Flory e Fox<sup>89</sup> prediz que a inclinação da curva resultante do gráfico de  $\log [\eta]$  vs  $\log M$  deve ser igual a 0,5. Esta predição foi confirmada através de resultados experimentais com poliestireno<sup>90</sup> e polimetilmetacrilato<sup>91</sup>. Para dextrana NRRL B-512, Senti et al.<sup>75</sup> obtiveram uma inclinação de 0,5 para frações de amostra com peso molecular inferior a  $1 \times 10^5$ . Para frações de pesos moleculares superiores eles observaram um decréscimo da inclinação. Este decréscimo a peso molecular elevado é evidentemente devido ao aumento no grau de ramificação com o aumento do peso molecular, que diminui o volume efetivo da macromolécula.

Outro efeito a ser considerado é o fato das moléculas do

solvente interagirem com as macromoléculas dissolvidas.

Dondos e Benoit<sup>92</sup> mostram que na determinação de peso molecular de polímeros o efeito de solvatação só é perceptível para aqueles com peso molecular inferior a 50000.

Para o caso específico de solução aquosa de dextrana, Gekko e Noguchi<sup>93</sup> avaliam o número de moles de moléculas de água unidas a cada radical hidroxila da cadeia do polissacarídeo. Esta razão foi determinada através de medidas da velocidade do som em solução de dextrana de baixo peso molecular. O valor da relação moles  $H_2O/-OH$  decresceu até um valor de 0,5 para um peso molecular de até 2000. Para frações de dextrana de peso molecular superior a este valor a razão manteve-se constante e igual a 0,5. O decréscimo do número de ligações entre as moléculas de água com o aumento dos segmentos de cadeia pode ser considerado como sendo devido ao decréscimo do número de radicais hidroxilas livres, que podem entrar em contato com as moléculas de água. Esta diminuição está relacionada com a formação de pontes de hidrogênio intramolecular entre os radicais  $-OH$  ou com efeito estérico entre unidades de glicose.

Segundo McBain<sup>94</sup>, o erro devido a solvatação em medidas do peso molecular em observações na ultracentrifuga pode chegar a ser superior a 100%. Em oposição a este resultado, Lasing e Kraemer<sup>95</sup> demonstram que mesmo que ocorra uma grande solvatação, esta não leva a erros tão grandes no peso molecular. Por exemplo, a partir da equação 45 onde  $M_1$  e  $M'$  são os pesos moleculares do soluto não solvatado e aparente, respectivamente, e  $s$  a massa do solvente combinada com 1 grama do soluto, eles estima-

$$M_1 = M' \frac{1 - c_1}{1 - c_1 - sc_1} \quad (45)$$

ram que para uma concentração em torno de 0,001 g/ml, uma solvatação em torno de 990% acarretaria um erro de 1% no valor do peso molecular da macromolécula não solvatada. Lansing e Kraemer, mostraram que o efeito de solvatação é o mesmo tanto para os métodos que utilizam ultracentrífuga como para os demais métodos convencionais e que o erro devido a solvatação é independente do volume específico.

Portanto, mesmo considerando-se que na determinação de parâmetros físico-químicos de dextrana foram utilizadas baixas concentrações de macrossoluto, que poderiam acarretar um valor de solvatação máximo, não há razão para esperar que os resultados obtidos tenham sido significativamente afetados por problemas de solvatação.

#### Fracionamento de dextrana por osmossedimentação.

As primeiras observações de que existe fracionamento de amostra macromolecular polidispersa em experimentos de osmossedimentação<sup>96</sup> foram obtidas em células de diálise de 25 cm de altura, com solução aquosa de dextrana. Os resultados experimentais obtidos neste trabalho, em célula de diálise de 1 metro de altura, confirmam a existência de fracionamento de uma amostra polidispersa de dextrana, sob gravidade. O histograma apresentado na figura 30, mostra que a dextrana estudada apresenta a maior fração de massa em duas faixas distintas de peso molecular, 38% entre  $0,8 \times 10^6$  e  $1,0 \times 10^6$  e 26% entre  $1,6 \times 10^6$  e  $1,8 \times 10^6$ . Um histograma mais apurado poderia ser construído utilizando-se dados de etapas sucessivas de fracionamento.

Conforme foi discutido anteriormente, na determinação do peso molecular de dextrana (Sigma -  $M_w$  nominal igual a  $2 \times 10^6$ ) ob

tiveram-se para duas amostras de diferentes lotes mas de mesmo número de catálogo e de especificações idênticas, os valores de  $7,4 \times 10^5$  e  $1,9 \times 10^6$ . Estes resultados de peso molecular médio em massa são da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos para as duas frações predominantes no experimento de fracionamento. Considerando-se, então, que uma determinada amostra de dextrana contém grande quantidade de moléculas em duas faixas de peso molecular distintas, o peso molecular médio total da amostra será bastante influenciado pela predominância de uma ou outra faixa. Assim, lotes diferentes, embora com especificações iguais, podem conter maior quantidade de moléculas em faixas distintas e apresentar uma disparidade no valor do peso molecular.

O método de osmossedimentação pode, portanto, ser aplicado ao fracionamento de amostra polidispersa, apresentando um custo muito baixo, pois requer somente uma célula de diálise, membrana semipermeável e solvente, podendo ser utilizado volume grande de solução.

#### Diálise associada a osmossedimentação.

A tabela II mostra que a diálise em centrífuga é mais eficiente que a diálise em fluxo sob gravidade para eliminar solutos de baixo peso molecular. Embora a capacidade das células utilizadas sob gravidade seja maior (6,5 vezes maior) pode-se avaliar que para volumes iniciais de solução iguais e em mesmo tempo de experimento, a massa de soluto de peso molecular pequeno eliminada é maior quando a diálise é efetuada em centrífuga.

A eficiência da diálise poderia ser ainda aumentada com um acréscimo da relação entre área útil da membrana e volume de solução.

### Concentração de macrossolutos.

Os resultados experimentais de osmocentrifugação de uma solução de dextrana, tabela XXIV, mostram a eficiência de se concentrar um macrossoluto a baixo campo inercial, utilizando-se células de diálise com membranas apropriadas. A figura 34 ilus-tra estes resultados. Em tempo correspondente a 18 horas de osmocentrifugação de solução aquosa de dextrana (concentração inicial de 0,9%) tem-se até 4 cm do fundo da célula de diálise ou seja, na sua metade inferior, 90% da massa inicial de macrossoluto. Para sedimentação não osmoticamente acoplada, na mesma altura da célula de diálise tem-se uma fração de massa do ma-crossoluto de 50%.

A concentração de macrossolutos por osmocentrifugação pode ser de grande aplicabilidade, uma vez que necessita de tempos menores do que sob sedimentação normal e não há acúmulo de macrossoluto sobre a membrana, que se encontra posicionada vertical-mente na célula. Este efeito de acúmulo de macrossoluto sobre a membrana diminui sensivelmente a eficiência do processo de ultrafiltração, também utilizado na concentração de macrossolutos.

Uma particularidade destes experimentos de osmocentrifugação é que o efeito de concentração é mais acentuado para concentrações mais altas. Em experimentos de sedimentação normal, observa-se o contrário, uma vez que geralmente o coeficiente de sedimentação diminui com o aumento da concentração de macromolécula em solução.

O estudo da concentração de macrossolutos a baixo campo i-nercial (2000 e 3000 rpm) foi estendido a dextrana azul e gama-globulina,<sup>97</sup> com resultados semelhantes aos obtidos para solução de dextrana.

Experimentos de osmocentrifugação foram estendidos ao estudo da sedimentação de sistemas ternários, onde se tem dois macrossolutos diferentes e um solvente.

Na literatura tem-se estudos da variação do coeficiente de sedimentação de um componente macromolecular na presença de um terceiro componente<sup>98</sup>.

Acosta et al.<sup>99</sup> estudaram o efeito da sedimentação de uma solução diluída de dextrana azul em presença de um segundo componente macromolecular (dextrana ou hidroxipropil celulose) em várias concentrações. Os resultados experimentais obtidos por Acosta et al. mostram que graficando o inverso do coeficiente de sedimentação da dextrana azul ( $1/s_{DA}$ ) em função da concentração de dextrana azul ( $c_{DA}$ ), a várias concentrações de dextrana ( $c_D$ ), obtêm-se retas paralelas entre si, variando o coeficiente linear. Um aumento da concentração de dextrana numa solução de dextrana azul leva a uma diminuição no coeficiente de sedimentação desta. Estas observações mostram que em sistemas de multicomponentes a interação termodinâmica e hidrodinâmica entre os macrossolutos influi na velocidade de transporte.

Em experimentos de osmocentrifugação, o efeito observado é o oposto, conforme está descrito neste trabalho. Conforme os dados listados na tabela XXV, a dextrana azul sedimenta mais rapidamente em presença de dextrana T 500. A velocidade de sedimentação aumenta com o aumento da concentração de dextrana, que atua portanto como um carregador.

#### IV. CONCLUSÕES

Os resultados experimentais de osmossedimentação de solução aquosa de dextrana demonstram que o estado de equilíbrio foi obtido a partir de condições iniciais diferentes, sob gravidade. O tempo necessário para se alcançar este estado é muito pequeno se comparado com sistemas não osmoticamente acoplados, para os quais o alcance do equilíbrio é praticamente inviável.

A eficiência da osmossedimentação como método analítico foi comprovada através da determinação dos pesos moleculares e de coeficientes viriais de dextranas e tiroglobulina. Os resultados obtidos concordam com valores relacionados na literatura, ou obtidos por outros métodos.

A osmossedimentação mostrou-se útil também para finalidades preparativas, tais como concentração e fracionamento de amostra polidispersa de dextrana.

#### Perspectivas

O desenvolvimento de membranas semipermeáveis mais seletivas e que possam ser utilizadas em solventes não aquosos, está sendo realizado neste laboratório e permitirá estender a aplicação analítica do método de osmossedimentação para uma faixa maior de macromoléculas.

Por outro lado, há algumas macromoléculas que podem ser estudadas por osmossedimentação mas as quantidades acessíveis são muito pequenas. Para estes casos, a redução do volume de solução necessário para cada experimento poderá ser obtida de duas maneiras distintas: i) tornar os compartimentos da célula de diálise menores, sem diminuir a relação entre volume de solução

e área da membrana, ii) diminuir a altura das células, utilizando-as em centrífugas à baixa rotação.

Para efeito prático e de minimização do erro na determinação do gradiente de concentração seria interessante a adaptação de um sistema óptico para leituras de concentração (por espectrofotometria, refratometria, interferometria) diretamente na célula de diálise.

## REFERÊNCIAS

1. MORAWETZ, H. *Macromolecules in Solution*, 2 ed., Wiley-Interscience, New York, 1975.
2. TAGER, A. *Physical Chemistry of Polymers*, Mir Publishers, Moscow, 1972.
3. BOVEY, F.A. & WINSLOW, F.H. *The Nature of Macromolecules*. In: BOVEY, F.A. & WINSLOW, F.H., editor. *Macromolecules. An Introduction to Polymer Science*. Academic Press, 1979.
4. KRIGBAUM, W.R. & FLORY, P.J. Statical Mechanism of Polymer Solutions IV. Variation of the Osmotic Second Coefficient with Molecular Weight. Journal of the American Chemical Society, 75, 1775, 1953.
5. GRANATH, K.A. Solutions Properties of Branched Dextrans. Journal Colloid Science, 13, 308, 1958.
6. FLORY, P.J. Thermodynamics of High Polymer Solutions. Journal Chemical Physics, 10, 51, 1942.
7. HUGGINS, M.L. Thermodynamic Properties of Solutions of Long-chain Compounds. Am. N.Y. Academic Science, 43, 1, 1942.
8. HUGGINS, M.L. Some Properties of Solutions of Long-chain Compounds. Journal Physical Chemistry, 46, 151, 1942.
9. OROFINO, T.A. & FLORY, P.J. Relationship of the Second Virial Coefficient to Polymer Chain Dimensions and Interaction Parameters. Journal Chemical Physics, 26, 1067, 1957.
10. BRANDRUP, J. & IMMERGUT, E.H. editors. *Polymer Textbook* 2 ed. New York, John Wiley and Sons, 1975.
11. FLORY, P.J. & KRIGBAUM, W.R. Statistical Mechanics of Dilute Polymer Solutions. Journal Chemical Physics, 18, 1086, 1950.
12. BILLMEYER JR., F.W. *Textbook of Polymer Science*, 2 ed., New York, Wiley-Interscience, 1971.

13. GRAESSLEY, W.W. The Entanglement Concept in Polymer Rheology. Advances in Polymer Science, 16, 1, 1974.
14. COTTON, J.P. et alii. Experimental Determination of the Temperature Concentration Diagram of Flexible Polymer Solutions by Neutron Scattering. Journal Chemical Physics, 65, 1101, 1976.
15. GRAESSLEY, W.W. Polymer Chain Dimensions and the Dependence of Viscoelastic Properties on Concentration, Molecular Weight and Solvent Power. Polymer, 21, 258, 1980.
16. SHAEFER, D.W. et alii. Dynamics of Semiflexible Polymers in Solutions. Macromolecules, 13, 1280, 1980.
17. NYSTRÖM, B. & ROOTS, J. Scaling Concepts in the Interpretation of Diffusion and Sedimentation Phenomena in Semidilute Polymer and Polyelectrolyte Solutions, Prog. Polymer Science, 8, 333, 1982.
18. COTTON, J.P. Polymer excluded volume exponent: an experimental verification of the  $n$  vector model for  $n = 0$ . J. Phys. Lett., 41, 231, 1980.
19. WOLFF, C. Molecular Weight Dependence of the Relative Viscosity of Solutions of Polymers at the Critical Concentration. European Polymer Journal, 13(9), 739, 1977.
20. DAOUD, M. et alii. Solutions of Flexible Polymers. Neutron Experiments and Interpretation. Macromolecules, 8, 804, 1975.
21. ADAM, M. & DELSANTI, M. Dynamical Properties of Polymer Solutions in Good Solvent by Rayleigh Scattering Experiments. Macromolecules, 10, 1299, 1977.
22. NYSTRÖM, B. & ROOTS, J. Molecular Transport in Semidilute Macromolecular Solutions, Journal Macromolecular Science Rev. Macromol. Chem., C19(1), 35, 1980.
23. MEYER, C.T. et alii. Crossover from the Dilute to the Semidilute Regime as Determined from NMR of poly-(ethylene oxide) chains. Polymer, 19, 1107, 1978.

24. ROOTS, J. & NYSTRÖM. Dilute and Concentrated Solutions of Polystyrene in Trans-decalin Close to and Far from the  $\theta$  Temperature II. Osmotic Pressure Measurements. European Polymer Journal, 14, 773, 1978.
25. GANDHI, K.S. & WILLIAMS, M.C. Effect of Solvent Character on Polymer Entanglements. Journal Applied Polymer Science, 16, 2721, 1972.
26. DESTOR, C. et alii. Crossover Between Semidilute and Dilute Solution Behavior of Flexible Polymers as Determined by Ultraviolet Spectrometry. Journal Polymer Science, Polymer Letters-Edition, 16, 229, 1978.
27. NYSTRÖM, B. et alii. Sedimentation in Concentrated Polystyrene Solutions and the Observation of an "Anomaly" in a Good Solvent. European Polymer Journal, 13, 683, 1977.
28. NYSTRÖM, B. et alii. Sedimentation Velocity Measurements Close to the Upper Critical Solution Temperature and at  $\theta$ -conditions. Polystyrene in Cyclopentane Over a Large Concentration Interval. Polymer, 20(2), 157, 1979.
29. HEHRE, E.J. Enzymic Synthesis of Polysacharides: A Biological Type of Polymerization. In: NORD, F.F., editor. Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry, Interscience Publishers Inc., New York, V.XI, 1951, p. 297-337.
30. JEANES, A. & WILLIAM, C.A. Periodate Oxidation of Dextran. Journal of the American Chemical Society, 72, 2655, 1950.
31. GROWALL, A. Dextran and its Use in Colloidal Infusion Solutions. Academic Press, New York, 1957, p. 156.
32. GELIN, L.E. & INGELMAN, B. Acta Chirurgica Scandinavica 122, 294, 1961. APUD: Encyclopedia of Polymer Science and Technology. New York. Interscience Publishers, 1976, V. 4, p. 818.
33. GRÖWALL, A.J.T. et. al. Compounds Inhibiting the Coagulation of Blood. Swedish Pat. 118014, 1947.

34. WADSWORTH, D.V. & HYGES, M.F. Sugar Sirup. U.S. Patent 2.409.816, 1946.
35. ALBERTSSON, P.A. Partition Methods for Fractionation of Cell Particles and Macromolecules. In: GLICK, D., editor, Methods of Biochemistry Analysis, V.X, Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons Inc., New York, 1962, p. 229-262.
36. FLODIN, P. Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration. Meijels Boldndustri, Halmstad, Uppsala, 1962, p. 85, p. 156.
37. "Sephadex". Literature references, n<sup>o</sup> 1, Pharmacia Fine Chemicals Ind., New York, 1964, p. 27.
38. WHISTLER, R.L. & SMART, C.L. Polysacharide Chemistry, Academic Press Inc., New York, 1953, p. 379.
39. BIXLER, G.H. et alii, Dextran. Ind. Eng. Chem., 45, 692, 1953.
40. GALEMBECK, F. et alii. Rapid Sedimentation under Gravity. Basic Theory and Experimental Demonstrations. Journal of Physical Chemistry, 84(1), 112, 1980.
41. WILLIAMS, J.W., VAN HOLDE, K.E., BALDWIN, R.L. & FUJITA, H. Part. I. The Sedimentation-Diffusion Equilibrium. Chemical Review, 58, 715, 1958.
42. VAN HOLDE, K.E. & BALDWIN, R.L. Rapid Attainment of Sedimentation Equilibrium, Journal Physical Chemistry, 62, 734, 1958.
43. MASON, M. & WEAVER, W. The Settling of Small Particles in a Fluid. Physical Reviews, 23, 412, 1924.
44. WEAVER, N. The Duration of the Transient State in the Settling of Small Particles, Physical Review, 27, 499, 1926.
45. WEBER, F.N. et alii, Molecular Weight: Measurements with Gravity Cells. Science, 134, 837, 1963.
46. MYNLIEFF, P.F. & JASPERS, W.J.M. Solvent Permeability of Dissolved Polymer Material. Its Direct Determination from Sedimentation Measurements. Transactions of the Faraday Society. 67, 1537. 1971.

47. NYSTRÖM, B. & BERGMAN, R. Velocity Sedimentation Transport Properties in Dilute and Concentrated Solutions of Hydroxypropylcellulose in Water at Different Temperatures up to Phase Separation. European Polymer Journal, 14(6), 431, 1978.
48. POUYET, G. & DAYANTIS, J. Velocity Sedimentation in the Semidilute Concentration Range of Polymers Dissolved in Good Solvents. Macromolecules, 12, 293, 1979.
49. DESTOR, C. & RONDELEZ, F. Sedimentation Velocity of Polymers in Good. Solvents. Journal Polymer Science, Polymer Letters Edition, 17(8), 527, 1979.
50. NYSTRÖM, B. & SUNDELOF, L.O. Comments on Concentration and Pressure Dependent Sedimentation. Chimica Scripta, 10, 16, 1976.
51. ANDERSON, G.R. Pressure Dependence of the Partial Specific Volume of Macromolecules in Solution by Compression Measurements in the Range 1-8000 Atmospheres. Arkiv Kemi, 20, 513, 1963.
52. ELMGREN, H. Frictional Coefficients in Polymer Solutions and the Applicability of Scaling Laws to Experimental Data. Journal Polymer Science, Polymer Letters Edition, 21, 669, 1983.
53. ELMGREN, H. Buoyancy and Relative Flow Rates in Ultracentrifugation. Journal Polymer Science, Polymer Letters Edition, 20, 57, 1982.
54. YAMAKAWA, H. Modern Theory of Polymer Solutions, Haper and Row, New York, 1971.
55. SVEDBERG, T. & NICHOLS. Determination of Size and Distribution of Size of Particles by Centrifugal Methods. Journal of the American Chemical Society, 45, 2919, 1923.
56. SVEDBERG, T. & RINDE, H. The Ultra-centrifuge, A Now Instrument for the Determination of Size and Distribution of Size of Particles in Amicroscopic Colloids. Journal of the American Chemical Society, 46, 2677, 1924.

57. TELLER, D.C. Characterization of Protein by Sedimentation Equilibrium in the Analytical Ultracentrifuge. Methods in Enzymology, 27, 346, 1973.
58. RICHARDS, E.G. et alii. Ultracentrifuge Studies with Rayleigh Interference Optics. II. Low Speed Sedimentation Equilibrium of Homogeneous Systems. Biochemistry, 7(3), 1054, 1965.
59. YPHANTIS, D.A. Equilibrium Ultracentrifugation of Dilute Solutions. Biochemistry, 3(3), 297, 1964.
60. RICHARDS, E.G. & SCHACHMAN, H.K. Ultracentrifuge Studies with Rayleigh Interference Optics. I. General Applications. Journal Physical Chemistry, 63, 1578, 1959.
61. SCHACHMAN, H.K. Ultracentrifugation in Biochemistry, 1 ed. Academic Press, 1959.
62. TRAUTMAN, R. et alii. The Determination of Concentration in the Ultracentrifugation of the Two Components Systems. Journal Chemical Physics, 22, 555, 1954.
63. KOK, C.M. & RUDIN, A. Prediction on Flory-Huggins Interaction Parameters from Intrinsic Viscosities. Journal of Applied Polymer Science, 27, 353, 1982.
64. SHOEMAKER, D. & GARLAND, C.W. Experiments in Physical Chemistry. 2 ed. Tokyo, Mc Graw-Hill. Kogakusha, 1967, cap. 11.
65. GALEMBECK, F. et alii. Transport in Osmotically Coupled Systems. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 51, 173, 1979.
66. 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.
67. GALEMBECK, F. et alii. Osmotic Coupling: the Key to Faster Mass Transport Experiments. In: MITTAL & FENDLER. Solution Behavior of Surfactants: Plenum Publishers Corporation, V. 2, 1982, p. 1465-1475.

68. PIRES, A.T.N. et alii. Osmotically Assisted Sedimentation: A New Mass Transfer Technique. 28th. Macromolecular Symposium da IUPAC. University of Massachusetts, Amherst, 1982.
69. NUNES, S.P. & GALEMBECK, F. Preparation and Characterization of Cellulose Acetate Membranes for Osmosedimentation. Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 21, 49, 1983.
70. ANDERSON, G.R. A Study of the Pressure Dependence of the Partial Specific Volume of Macromolecules in Solution by Compression Measures in the Range 1-800 atm., Arkiv för Kemi, 20, 513, 1963.
71. W. BROWN et al. Self-Diffusion and Sedimentation of Dextran in Concentrated Solutions, Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, 20, 1771, 1982.
72. TRATHNIGG, B. & JORDE, C. Densimetric Detection in Gel Permeation Chromatography. VI. An Integration Densimetric Detector, Journal of Chromatography, 241, 147, 1982.
73. DRAPER, N.R. & SMITH, H. Applied Regression Analysis, 2 ed., John Wiley & Sons, New York, 1981.
74. EDMOND, E. et alii. The Osmotic Behaviour of Shephadex and its Effects on Chromatography. Biochemistry Journal, 108, 775, 1968.
75. SENTI, F.R. et alii. Viscosity, Sedimentation, and Light-Scattering Properties of Fractions of an Acid Hydrolyzed Dextran. Journal of Polymer Science 17, 527, 1955.
76. SOUCEK, D.A. & ADAMS Jr., E.T. Molecular Weight Distributions from Sedimentation Equilibrium of Nonideal Solution. Journal Colloid and Interface Science, 55(3), 571, 1976.
77. EDELHOCH, H. The Properties of Thyroglobulin. I. The Effects of Alkali. The Journal of Biological Chemistry, 235, 1326, 1960.

78. DANIELS, F. et alii. Experimental Physical Chemistry 6 ed. Tokyo. McGraw-Hill Kogakusha, cap. 13, 1962, p. 296-300.
79. Catálogo da Pharmacia Fine Chemicals.
80. BASEDOW, A.M. & EBERT, K.H. Production, Characterization and Solution Properties of Dextran Fractions of Narrow Molecular Weight Distributions. Journal Polymer Science: Polymer Symposium 66, 101, 1979.
81. KEGELES, G. & GUTTER, F.J. The Determination of Constants from Fresnel Diffraction Patterns. Journal of the American Chemical Society, 73, 3770, 1951.
82. LOYOLA H., L.D. Tese de Doutorado em andamento.
83. JOEKES, I. Equilíbrio de Osmossedimentação sob Gravidade: Polidispersões Aquosas de Prata, Tese de Doutorado, UNICAMP, 1983, 153 p.
84. PETRUS, V. & PORSCHE, B. Absolute Determination of Molecular Weights of Standard Polystyrenes by Means of Sedimentation-Diffusion Measurements in Toluene, Makromol. Chem., 183, 1279, 1982.
85. SUZUKI, N. & WADA, A. Study of Dextran Solutions by Quasi-elastic Light-Scattering. Carbohydrate Research, 109, 249, 1982.
86. SOETEMAN, A.A. & PEETERS, F.A.H. Diffusie-, Viscos en GPC-Gedrag Van Dextranen in Water als Functie Van hun Molecuulge wicht. Bull. Soc. Chim. Belg., 91(11), 875, 1982.
87. WILLIAMS, J.W. Part IV. Ultracentrifugation and Other Experimental Methods. Sedimentation Analysis and Some Related Problems. Journal Polymer Science, 12, 351, 1954.
88. VAN CLEVE, J.W. et alii. The Structure of NRRL B512. Dextran Methylation Studies. Journal of the American Chemical Society, 78, 4435, 1956.
89. FLORY, P.J. & FOX Jr., T.G. Treatment of Intrinsic Viscosities. Journal of the American Chemical Society, 73, 1904, 1951.

90. FOX, Jr., T.G. & FLORY, P.J. Intrinsic Viscosity-Temperature Relationships for Polyisobutylene in Various Solvents. Journal of the American Chemical Society, 73, 1009, 1951.
91. FOX, Jr., T.G. & MANDELKERN, L. Dilute Solution Hydrodynamic Behavior of Flexible Chain Molecules: Polymethyl Methacrylate. Journal Chemistry Physics, 21, 187, 1953.
92. DANDOS, A. & BENOIT, H. Preferential Solvation. Effect on Polymer Dimensions. In: Karel Solc, editor, Order in Polymer Solutions, Gordon and Breach Science Publishers. Paris, 1976, p. 175-207.
93. GEKKO, K. & NOGUCHI, H. Physicochemical Studies of Oligodextran. I. Molecular Weight Dependence of Intrinsic Viscosity, Partial Specific Compressibility and Hydrated Water, Biopolymers, 10, 1513, 1971.
94. MCBAIN, J.W. The Determination of Bound Water by Means of the Ultracentrifuge. Journal of the American Chemical Society, 58, 315, 1936.
95. LANSING, W. & KRAEMER, Solvation and the Determination of Molecular Weights by Means of the Svedberg Ultracentrifuge. Journal of the American Chemical Society, 58, 1471, 1936.
96. PINHEIRO, E.A. Sedimentação Acelerada por Acoplamento Osmótico: Modelo Teórico e Verificação Experimental, Tese de Mestrado. São Paulo, 1982, 71 p.
97. NUNES, S.P., PIRES, A.T.N. and GALEMBECK, F. Concentration of Dextran and Gammaglobulin by Osmocentrifugation, Chemica Scripta, 00, 000, 1984.
98. SUNDELÖF, L-O. Sedimentation in Multicomponent Systems. I. Some Theoretical Considerations. Chemica Scripta, 13, 29, 1978-79.
99. ACOSTA, R. et alii. Sedimentation in Multicomponent Systems. II. Sedimentation of Blue Dextran in Aqueous Solutions of Dextran and of Hydroxypropyl Cellulose. Chemica Scripta, 18, 7, 1981.