



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

RODRIGO GABRIEL SIMAS

ESTUDO DO MECANISMO DE PRECIPITAÇÃO DE POLIRIBOSIL-RIBITOL-
FOSFATO NA PRESENÇA DE SAIS E SOLVENTES ORGÂNICOS

STUDY OF THE POLYRIBOSYL-RIBITOL-PHOSPHATE PRECIPITATION
MECHANISM IN THE PRESENCE OF SALTS AND ORGANIC SOLVENTS

CAMPINAS

2017

RODRIGO GABRIEL SIMAS

ESTUDO DO MECANISMO DE PRECIPITAÇÃO DE POLIRIBOSIL-RIBITOL-
FOSFATO NA PRESENÇA DE SAIS E SOLVENTES ORGÂNICOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Co-orientadora: Dra. Mickie Takagi

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO RODRIGO GABRIEL SIMAS, ORIENTADA PELO PROF. DR. EVERSON ALVES MIRANDA.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Fundação Butantan; BNDES; CAPES

ORCID: orcid.org/0000-0003-0682-2446

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Si42e Simas, Rodrigo Gabriel, 1991-
Estudo do mecanismo de precipitação de poliribosil-ribitol-fosfato na presença de sais e solventes orgânicos / Rodrigo Gabriel Simas. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientadores: Everson Alves Miranda e .
Coorientador: Mickie Takagi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
Em regime interinstitucional com: .

1. Precipitação. 2. Polissacarídeos. 3. Coloides - Estabilidade. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Takagi, Mickie. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the polyribosyl-ribitol-phosphate precipitation mechanism in the presence of salts and organic solvents

Palavras-chave em inglês:

Precipitation

Polysaccharides

Colloid - Stability

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Everson Alves Miranda [Orientador]

Luís Fernando Mercier Franco

Marlus Pinheiro Rolemberg

Data de defesa: 04-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Este exemplar corresponde à redação final da **Dissertação de Mestrado** defendida por **Rodrigo Gabriel Simas**, aprovada pela Comissão Julgadora em 04 de agosto de 2017, na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

Prof. Dr. Everson Alves Miranda – FEQ/UNICAMP

Presidente da Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luís Fernando Mercier Franco – FEQ/UNICAMP

Membro Titular

Prof. Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg– UNIFAL

Membro Titular

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do discente.

AGRADECIMENTO

A Deus, que guia os meus caminhos e me capacita.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda, por quem tenho grande admiração, pela orientação e amizade. Agradeço pela oportunidade e por me motivar a escolher sempre o caminho da excelência. O valor que o senhor dá para o desenvolvimento profissional e pessoal dos seus orientados é surpreendente.

À Dra. Mickie Takagi, pela orientação e principalmente pela confiança. Obrigado por fornecer todas as condições para que eu pudesse desenvolver o projeto durante meu horário de trabalho.

Ao Celso Preto Cardoso Júnior e seu grupo de trabalho, por toda a dedicação e auxílio na realização das fermentações.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Processos do Instituto Butantan, por construírem um ambiente de trabalho tão agradável. É uma satisfação fazer parte desse grupo.

Ao Carlos Eduardo e à Cláudia, pelo auxílio técnico e pela amizade.

Aos técnicos Sr. Hélio, Sr. Loury e Ana por todo o auxílio e convívio.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos da Unicamp, com os quais eu convivi no início do meu mestrado: Cris, Marina, Nemailla, Juliano, Ericksen e Max.

À minha esposa Sâmela, por toda a paciência, apoio e carinho.

Aos meus pais Luiz e Patricia, pelo amor e por dedicarem as suas vidas à criação dos filhos. Tudo o que vocês fizeram foi essencial para que eu pudesse chegar até aqui.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao BNDES, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta dissertação.

Se por estarmos em Cristo nós temos alguma motivação, alguma exortação de amor, alguma comunhão no Espírito, alguma profunda afeição e compaixão, completem a minha alegria, tendo o mesmo modo de pensar, o mesmo amor, um só espírito e uma só atitude. Nada façam por ambição egoísta ou por vaidade, mas humildemente considerem os outros superiores a vocês mesmos. Cada um cuide, não somente dos seus interesses, mas também dos interesses dos outros.

Filipenses 2:1-4

RESUMO

Haemophilus influenzae tipo b é uma bactéria patogênica, que causa pneumonia, septicemia e meningite em seres humanos. A maneira mais efetiva de prevenir a sua infecção é por meio da vacinação com o polissacarídeo capsular da bactéria, poliribosil-ribitol-fosfato (PRP), como antígeno vacinal. O processo de purificação do PRP envolve algumas etapas de precipitação com etanol na presença de sais, semelhante à purificação de outros polissacarídeos iônicos, como xantana, pectina e alginato. Contudo, o mecanismo de precipitação de polissacarídeos carregados na presença de sais ainda é pouco compreendido. No caso do PRP, não há relatos de estudos específicos sobre sua solubilidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a precipitação do PRP em soluções aquosas na presença de sais e solventes orgânicos, visando contribuir para a elucidação de seu mecanismo molecular. Devido à natureza coloidal do PRP, as variáveis estudadas foram aquelas que mais afetam a estabilidade de sistemas coloidais. Primeiramente estudou-se o efeito da concentração inicial do PRP (100 a 1000 mg/L) na sua solubilidade. Maiores concentrações iniciais resultaram em maiores concentrações do polímero na fase líquida no equilíbrio, sendo este efeito mais acentuado a baixas concentrações salinas. A segunda variável testada foi pH, que mostrou-se irrelevante na alteração da solubilidade do PRP nas condições estudadas (pH 6,0 e 7,0). A seguir foi estudado o efeito de sais (NaCl, NH₄Cl e MgCl₂) e de solventes orgânicos (etanol, acetona e isopropanol) na solubilidade do PRP. A relação entre concentração salina e o inverso da constante dielétrica necessária para 50% da precipitação do PRP foi exponencial, conforme previsto pela teoria DLVO. Os dados experimentais suportam a ideia de que a natureza do solvente tem pouca influência no balanço de forças eletrostáticas do sistema. A natureza dos sais, contudo, foi um fator determinante na alteração da solubilidade do PRP, conforme predito por Hofmeister. Os resultados da precipitação de PRP com NaCl ou MgCl₂ e etanol foram analisados com o modelo de condensação iônica de Manning, que indicou que a precipitação ocorre a uma fração fixa de neutralização de cargas do polímero.

Palavras-chave: Precipitação, polissacarídeos, coloides - estabilidade, condensação iônica.

ABSTRACT

Haemophilus influenzae type b is a pathogenic bacterium that causes pneumonia, septicemia, and meningitis in humans. The most effective way to prevent its infection is through vaccination with the bacteria capsular polysaccharide polyribosyl-ribitol-phosphate (PRP) as the vaccine antigen. The PRP purification process comprises several ethanol precipitation steps in the presence of salts. Similar strategies are also used in downstream processes of other charged polysaccharides, such as xanthan, pectin and alginate. However, the mechanism of precipitation of charged polysaccharides remains only partially understood. In the case of PRP, there are no specific reports about its solubility. Therefore, the aim of this work was to study the PRP precipitation from aqueous solutions containing organic solvents and salts in order to contribute to the elucidation of its molecular mechanism. Due to the colloidal nature of PRP, the variables investigated were those which affect the stability of colloidal systems. The effect of the PRP initial concentration (100-1,000 mg/L) on its solubility in water-ethanol was first investigated: the higher the initial PRP concentration, the higher was the polymer concentration in the liquid phase at equilibrium. This effect was more pronounced at low salt concentrations. The pH, the second variable investigated, was not relevant in changing PRP solubility at the pH values studied (6.0 and 7.0). We also examined the effect of salts (NaCl, NH₄Cl, and MgCl₂) and organic solvents (ethanol, acetone, and isopropanol) on the PRP solubility. The relation between salt concentration and the inverse of dielectric constant required for 50% PRP precipitation was exponential, as predicted by the DLVO theory. Experimental data support the idea that the nature of the solvent has negligible influence on the balance between electrostatic forces acting on each particle. However, the type of salt was crucial in modifying PRP solubility. The results from PRP precipitation with ethanol and NaCl or MgCl₂ were analyzed with the Manning's counterion condensation model, which indicated that precipitation occurs at a fixed fraction of polymer charge neutralization.

Keywords: Precipitation, polysaccharides, colloids - stability, ion condensation.

LISTA DE SÍMBOLOS

b	Distância axial entre grupos carregados do polieletrólito
c	Concentração salina
c_{Keesom}	Constante referente à força de Keesom
c_{Debye}	Constante referente à força de Debye
c_{London}	Constante referente à força de London
C_p	Concentração do polieletrólito
e	Número de Euler
F	Constante de Faraday
F_{dca}	Força da dupla camada elétrica
F_{DLVO}	Força DLVO
F_{vdW}	Força de van der Waals
\bar{g}_{el}	Energia livre da dissociação dos prótons em um polieletrólito
\bar{g}_{mix}	Energia livre da mistura de compostos iônicos
H	Constante de Hamaker
I	Força iônica
K	Coeficiente de partição
k	Constante de Boltzmann
L	Produto de solubilidade
L_a	Número de Avogadro
N	Valência do coíon (condensação iônica)
N'	Valência do contraíon (condensação iônica)
q	Carga elementar do elétron
q_i	Carga da partícula i
r	Raio do coloide
R	Constante universal dos gases
T	Temperatura
v	Coeficiente estequiométrico do coíon (condensação iônica)
v'	Coeficiente estequiométrico do contraíon (condensação iônica)
V_p	Volume da região que cerca o polieletrólito
x	Distância entre partículas coloidais

z	Valência do íon (no cálculo de κ)
β	Densidade de cargas de um polieletrólito
γ	Coeficiente de atividade
ε	Constante dielétrica
ε_0	Permissividade no vácuo
θ_N	Número de contraíons de valência N associados a um grupo carregado do polieletrólito
θ_P	Fração de cargas do polieletrólito neutralizada
κ	Comprimento recíproco de Debye
κ^{-1}	Comprimento de Debye
ξ	Parâmetro estrutural adimensional
σ	Densidade de cargas do coloide
ψ	Potencial elétrico na superfície coloidal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. O PRP e suas características	13
1.2. Colocação do problema	14
1.3. Objetivo	14
1.4. Estratégia.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Coloides	16
2.1.1. Estabilidade de sistemas coloidais liofóbicos	17
2.1.1.1. Forças de van der Waals	18
2.1.1.2. A dupla camada elétrica.....	19
2.1.1.3. Teoria DLVO	23
2.1.1.4. Série de Hofmeister	27
2.2. Condensação iônica.....	29
2.2.1. Modelagem matemática da condensação iônica.....	30
2.2.2. Exemplos e implicações da teoria da condensação iônica	33
2.3. Polissacarídeos.....	37
2.3.1. Poliribosil-ribitol-fosfato	38
2.4. Métodos de redução de solubilidade de polissacarídeos	40
2.4.1. Efeito do pH na solubilidade de polissacarídeos	41
2.4.2. Efeito da presença de sais na solubilidade de polissacarídeos	42
2.4.2.1. Regime de concentrações salinas baixas	42
2.4.2.2. Regime de concentrações salinas médias.....	43
2.4.3. Efeito da composição do solvente na solubilidade de polissacarídeos ..	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. Produção e purificação de PRP	49
3.1.1. Cultivo de Hib	49
3.1.2. Recuperação e purificação de PRP	50
3.2. Métodos analíticos	51
3.2.1. Determinação da concentração de proteínas e ácidos nucleicos.....	51
3.2.2. Determinação da concentração de PRP	52

3.2.3. Determinação da massa molecular de PRP	52
3.3. Experimentos de precipitação	53
3.3.1. Análise do precipitado por microscopia	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Influência da concentração inicial de PRP na sua solubilidade.....	55
4.2. Influência do pH na solubilidade do PRP	59
4.3. Influência da concentração de sais e da natureza do solvente na solubilidade do PRP	60
4.4. Condensação iônica na precipitação de PRP	67
4.5. Influência da concentração de NaCl e da natureza do solvente na morfologia do precipitado	74
4.6. Influência da natureza dos cátions na solubilidade do PRP.....	77
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
5.1. Conclusões	82
5.2. Sugestões para trabalhos futuros	83
6. REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. O PRP e suas características

Haemophilus influenzae tipo b (Hib) é uma espécie de bactéria patógeno humano, Gram-negativa, que causa diversas doenças, entre elas, pneumonia e meningite. Infecções por Hib são mais comuns em crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos (KNISKERN; MARBURG; ELLIS, 1995) para os quais a vacinação é o principal meio de prevenção. A vacina contra Hib contém em sua composição um polissacarídeo capsular, que na formulação final é conjugado com uma proteína para atingir a imunogenicidade desejada (KELLY; MOXON; POLLARD, 2004). O composto antigênico é denominado poliribosil-ribitol-fosfato (PRP – do inglês *polyribosyl ribitol phosphate*), principal componente da cápsula bacteriana de Hib, que está localizada na região externa de sua parede celular. Esse polímero é linear e homogêneo, apresentando um grupo fosfato, um grupo ribosil e um grupo ribitol em cada monômero (CRISEL; BAKER; DORMAN, 1975), conferindo assim carga negativa à macromolécula em condições de pH acima de 2. Devido a sua estrutura, PRP é instável em ambientes com pH superior a 7,0 (CINTRA; TAKAGI, 2015).

A produção de PRP para fins industriais se dá pelo cultivo de Hib em biorreatores no regime de batelada alimentada, utilizando-se meios complexos de crescimento em condições aeróbicas (TAKAGI et al., 2006). Nessas condições, o cultivo ocorre em um período de até 24 h e o PRP apresenta massa molecular entre 300 e 700 kDa (CINTRA, 2014). Após o processo de purificação, o polímero apresenta massa molecular maior que 100 kDa e a relação entre a massa de PRP e a massa de ácidos nucleicos ou proteínas deve ser maior que 100, de acordo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000). Para isso, processos de purificação devem ser projetados de forma que essas exigências sejam cumpridas.

O processo de purificação de PRP tradicionalmente envolve etapas de precipitação e filtração. Esse processo se inicia pela remoção de células, através de centrifugação ou microfiltração, ficando o produto presente na fase líquida. Diversos processos foram desenvolvidos para a purificação do PRP (ALBANI et al., 2015; HAMIDI; BEURRET, 2009; KUO, 1980; MARBURG; TOLMAN; KNISKERN, 1987), sendo que em todos eles as etapas fundamentais do processo são as de precipitação com um álcool na presença de sais e/ou detergentes. Essas etapas visam a precipitação diferencial do produto e das impurezas.

1.2. Colocação do problema

A precipitação de macromoléculas iônicas pela combinação de etanol e sais é utilizada tanto na purificação de polissacarídeos iônicos como na de proteínas e ácidos nucleicos. No processo de purificação de PRP, são utilizadas geralmente duas precipitações com etanol na presença de NaCl, acetato de sódio e fosfato de sódio, sendo essas operações unitárias as principais responsáveis pela redução de impurezas do produto final. As condições em que são realizadas essas precipitações são determinadas de forma empírica e pontual, nas quais geralmente se escolhe o sal e o álcool e verificam-se as condições em que são obtidos os melhores resultados, visando à alta recuperação e pureza do produto final. Essa abordagem é limitada na explicação do fenômeno e dá pouca margem para a melhoria do processo. Não há relatos de estudos específicos visando à compreensão do mecanismo molecular de precipitação do PRP na presença de sais, assim como no caso de outros polissacarídeos. Sabe-se que a interação polímero-polímero é importante, mas a relação entre as forças eletrostáticas, de van der Waals e efeitos de hidratação na estabilização dos polímeros solúveis ainda não foi completamente elucidada (AHMAD; DALBY, 2011).

1.3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar a precipitação de PRP em soluções aquosas contendo sais e solventes orgânicos, visando a contribuir para a elucidação de seu mecanismo molecular e assim fornecer subsídios para o desenvolvimento de processos mais eficientes para a sua purificação.

1.4. Estratégia

A estratégia fundamental escolhida foi estudar a solubilidade de PRP pela análise da sua precipitação em diferentes sistemas contendo o PRP, solvente orgânico, sal e água. As principais variáveis consideradas são aquelas que afetam a estabilidade de uma dispersão coloidal, como composição do solvente, pH e efeito da concentração e natureza dos sais presentes em solução. Além destas, estudou-se o efeito da concentração inicial de PRP, que apresentou influência inesperada na sua precipitação. Utilizou-se como material de partida o PRP purificado através do método descrito por Albani et al. (2015), cuja pureza é superior a 99% em relação a proteínas totais e ácidos nucleicos. A concentração de PRP na solução estoque era 3,89 g/L e sua massa molecular 92 kDa.

O estudo da influência de cada fator foi realizado segundo a estratégia OVAT (do inglês *one-variable-at-a-time*), na qual apenas uma variável foi estudada por vez. Inicialmente estudou-se o efeito da concentração inicial do PRP e do pH do solvente na sua solubilidade. A seguir, optou-se por verificar a relação entre a concentração de solvente necessária para promover a precipitação de PRP e a concentração salina do sistema, utilizando os solventes etanol, acetona e isopropanol e os sais NaCl, NH₄Cl e MgCl₂. Por último, verificou-se o efeito de diferentes cátions na precipitação de PRP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Devido às suas dimensões, polissacarídeos são classificados como coloides e por isso estão sujeitos a todas as forças que atuam sobre sistemas coloidais. A redução da solubilidade e agregação desses polímeros ocorre devido ao balanço de forças de atração e repulsão que atuam sobre cada partícula coloidal. Nos próximos itens serão descritas as características gerais de coloides, quais forças atuam sobre os sistemas coloidais e quais as principais variáveis que afetam a estabilidade desses sistemas. Para isso serão apresentadas a teoria de estabilidade de dispersões coloidais e a teoria da condensação iônica. A primeira teoria propõe a quantificação da influência das principais variáveis nas forças que atuam sobre cada partícula e a segunda aborda o modo e a extensão que ocorre a ligação entre os coloides carregados e os contraíons do sistema. Serão discutidas também as características gerais e estratégias de redução de solubilidade de polissacarídeos.

2.1. Coloides

Sistemas coloidais são caracterizados por apresentar um soluto insolúvel disperso em uma fase líquida contínua. Esse comportamento é observado devido às dimensões do soluto, denominado coloide, cujo comprimento de pelo menos uma das dimensões se encontra na escala nanométrica, aproximadamente entre 1 nm e 1 μm (HUNTER, 2001). Dispersões coloidais podem ser formadas por fase dispersa e meio dispersante sólido, líquido ou gasoso (Tabela 1). Dispersões de macromoléculas orgânicas, como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos suspensos em solução aquosa são exemplos clássicos de sistema coloidais.

Segundo a proposta de Freundlich (1926), coloides podem ser classificados como liofóbicos ou liofílicos, de acordo com a sua capacidade de interação com o solvente. Coloides liofóbicos apresentam baixa afinidade pelo

Tabela 1 - Exemplos de sistemas coloidais. Adaptado de Hunter (2001).

Meio dispersante	Fase dispersa	Nome técnico	Exemplos
Gás	Sólido	Aerosol	Fumaça
	Líquido	Aerosol	Desodorante spray
Líquido	Sólido	Dispersão	Sangue
	Líquido	Emulsão	Leite
	Gás	Espuma	Espuma de barbear

solvente e formam dispersões instáveis, sujeitas à agregação das partículas e separação de fases. Compostos liofílicos apresentam alta afinidade pelo solvente e formam dispersões estáveis. Claramente, a classificação segundo esse conceito não é baseado em uma propriedade intrínseca do coloide, mas depende do solvente que constitui o sistema. No caso de sistemas aquosos, coloides liofóbicos e liofílicos são denominados hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente. Kruyt (1952) emprega a mesma classificação e adiciona o conceito de reversibilidade na agregação dos sistemas coloidais, para o qual o termo liofílico se refere a processos reversíveis, enquanto que liofóbico indica a irreversibilidade do processo. Apesar de essa classificação apresentar apenas dois extremos, existem sistemas que apresentam uma mistura dos dois tipos de comportamentos (HUNTER, 2001). Enquanto sistemas coloidais liofílicos se encontram em um estado de energia mínima de Gibbs, sendo portanto estáveis termodinamicamente, os sistemas coloidais liofóbicos atingem o equilíbrio termodinâmico com a agregação irreversível das partículas. Contudo, dispersões de coloides liofóbicos podem encontrar-se em regiões pseudo-estáveis, de equilíbrio cinético apenas (NORDE, 2011). Devido à instabilidade desses sistemas, coloides liofóbicos são os principais objetos de estudo da ciência dos coloides. Conceitos de estabilidade desses sistemas serão apresentados na sessão 2.1.1.

2.1.1. Estabilidade de sistemas coloidais liofóbicos

Sistemas coloidais liofóbicos são naturalmente instáveis e sujeitos a agregação irreversível das partículas, devido à minimização da energia livre.

Entretanto, existem condições de pseudo-estabilidade, nas quais o balanço de forças que atuam sobre o sistema resulta no favorecimento da dispersão. Essas forças podem ser divididas entre repulsivas e atrativas, cujas principais responsáveis são as forças de Coulomb e forças de van der Waals, respectivamente. A magnitude de cada uma delas depende das características do coloide, como forma, tamanho e densidade de cargas, assim como as características da fase dispersante, como presença de compostos solúveis, força iônica e constante dielétrica. Nos itens a seguir, serão apresentados os principais fatores que afetam a estabilidade de coloide liofóbicos, como as forças de van der Waals e da dupla camada elétrica, assim como a natureza dos sais presentes no sistema.

2.1.1.1. Forças de van der Waals

Interações de van der Waals, ou de dispersão, são forças de longo alcance de atração entre moléculas, que incluem o conjunto de três interações resultantes da natureza dos dipolos da fase dispersa: Keesom, Debye e London. Interações de Keesom ocorrem entre dipolos permanentes e orientam as moléculas espacialmente. Interações de Debye se referem à formação de dipolo em um composto não polar, induzido pela presença de um dipolo permanente. Finalmente, interações de London são aquelas nas quais há a formação de dipolos transientes induzidos por moléculas não polares (PARSEGIAN, 2006). A totalidade da Força de van der Waals, F_{vdW} , pode então ser compreendida como a soma das três interações (Equação 2.1):

$$F_{vdW} \propto \frac{C_{Keesom}}{x^6} + \frac{C_{Debye}}{x^6} + \frac{C_{London}}{x^6} \quad (2.1)$$

em que c_i é uma constante característica de cada interação e x é a distância entre as partículas.

Em sistemas nos quais a interação entre corpos relativamente grandes, como no caso de sistemas coloidais, a interação de London é a grande responsável pela totalidade da força de van der Waals, sendo que para coloides carregados, a interação de Debye também contribui expressivamente para a totalidade dessa força

(HUNTER, 2001). Uma estimativa das forças de dispersão é dada pela aproximação de Derjaguin (TREFALT; PALBERG; BORKOVEC, 2017), conforme a Equação 2.2:

$$F_{vdW} = \frac{-H \cdot r}{12x^2} \quad (2.2)$$

na qual H é a constante de Hamaker (HAMAKER, 1937), r é o raio da partícula e x é a distância entre as partículas.

A constante de Hamaker considera a natureza das partículas suspensas e a natureza do solvente, assumindo valores aproximadamente constantes em um determinado sistema. Dessa forma, a interação entre dipolos é afetada majoritariamente pela distância entre os coloides e também pela facilidade com que forças eletrostáticas são propagadas pelo meio, característica representada pela constante dielétrica do solvente (HAMAKER, 1937).

A principal força repulsiva, que se contrapõe as forças de van der Waals é denominada força da dupla camada elétrica, que será apresentada no item a seguir.

2.1.1.2. A dupla camada elétrica

Coloides suspensos podem apresentar cargas em sua superfície, advindas da dissociação ou associação de íons (NORDE, 2011). Quando o sistema encontra-se em equilíbrio, as cargas da superfície coloidal são neutralizadas por contraíons presentes na fase adjacente, levando à minimização da energia livre do sistema. A força motriz dessa interação é a força eletrostática entre as partículas, descrita pela lei de Coulomb. Segundo essa lei, proposta por Charles Augustin Coulomb em 1783, o módulo da força eletrostática F entre duas partículas com carga q_1 e q_2 é dada pela Equação 2.3:

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{x^2} \quad (2.3)$$

na qual ϵ_0 é a permissividade no vácuo e x é a distância entre as partículas.

O conjunto da superfície carregada e a camada iônica adjacente é comumente denominada dupla camada elétrica (VERWEY; OVERBEEK, 1948). A distribuição dos íons na segunda camada tem sido amplamente estudada e três

modelos descrevem a possível disposição dos compostos carregados em solução. São eles o modelo do condensador molecular, desenvolvido por Helmholtz (HELMHOLTZ, 1853), o modelo Gouy-Chapman da dupla camada difusa, nomeado segundo seus desenvolvedores, Chapman (1913) e Gouy (1910), e o modelo Gouy-Chapman-Stern desenvolvido por Stern (STERN, 1924), que adaptou o conceito da dupla camada difusa.

O modelo do condensador molecular considera que todos os contraíons estão posicionados adjacentes à superfície, a uma distância (d) igual à soma dos raios dos íons da superfície e dos contraíons, hidratados ou não (Figura 1). Neste modelo, o potencial elétrico a uma distância x da superfície, $\psi(x)$, decai linearmente e atinge o potencial nulo à distância d .

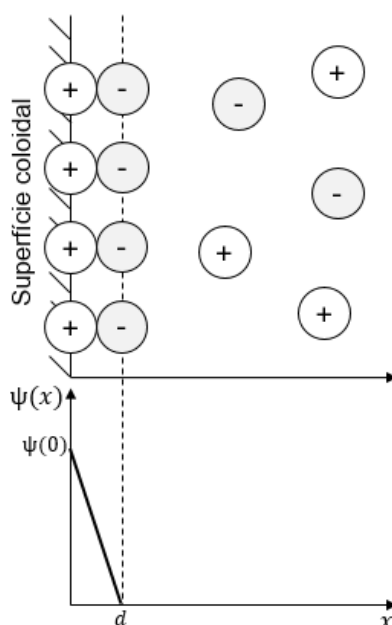


Figura 1 – Representação da dupla camada elétrica segundo o modelo do condensador molecular. Adaptado de Norde (2011).

O modelo Gouy-Chapman considera que a disposição das cargas elétricas próximas à superfície é resultante do equilíbrio de forças eletrostáticas e não-eletrostáticas, que tendem a dispersar os íons homoganeamente pela solução, principalmente pela manutenção da carga líquida nula em todo o sistema (LYKLEMA, 1995; NORDE, 2011). O balanço entre essas forças faz com que a variação na queda do potencial elétrico seja exponencial à medida que se distancia da superfície (Figura 2).

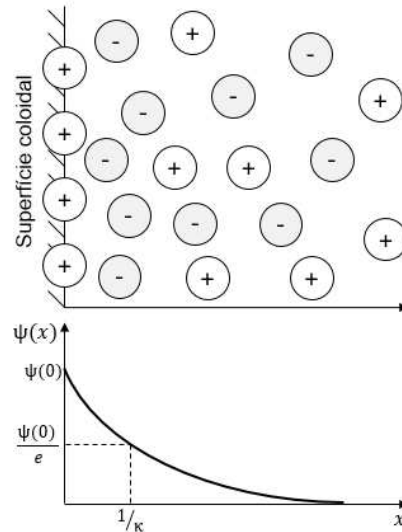


Figura 2 - Representação da dupla camada elétrica segundo o modelo Gouy-Chapman. Adaptado de Norde (2011).

Em situações onde o potencial elétrico na superfície não é muito elevado, o seu valor em função da distância para a superfície coloidal pode ser calculado segundo a Equação 2.4 (NORDE, 2011):

$$\psi(x) = \psi_0 e^{-\kappa x} \quad (2.4)$$

em que ψ_0 é o potencial elétrico na superfície, x é a distância para a superfície e κ é o comprimento recíproco de Debye, que pode ser calculado como função da concentração e carga dos íons em solução e da constante dielétrica do meio, conforme a Equação 2.5 (NORDE, 2011; TREFALT; PALBERG; BORKOVEC, 2017):

$$\kappa^2 = \frac{F^2 \sum_i c_i z_i^2}{\epsilon \epsilon_0 R T} = \frac{q^2 L_a \sum_i c_i z_i^2}{\epsilon \epsilon_0 k T} = \frac{2e^2 L_a I}{\epsilon \epsilon_0 k T} \quad (2.5)$$

em que F é a constante de Faraday, c_i é a concentração do íon i , z_i é a valência do íon i , I é a força iônica, ϵ é a constante dielétrica do meio, ϵ_0 é a permissividade no vácuo, R é a constante dos gases, T é a temperatura, q é a carga elementar, L_a é a constante de Avogadro e k é a constante de Boltzmann. O comprimento recíproco de Debye (κ) é proveniente da teoria de Debye-Hückel, que descreve soluções eletrolíticas diluídas. Neste trabalho também utilizaremos o termo comprimento de Debye ($1/\kappa$), cuja unidade é o Angström (Å).

A partir dos conceitos de decaimento do potencial elétrico da superfície (Equação 2.4) e do comprimento recíproco de Debye (Equação 2.6), é possível calcular a força atuando sobre as partículas devido à dupla camada elétrica (F_{dce}), segundo a aproximação de Derjaguin (TREFALT; PALBERG; BORKOVEC, 2017):

$$F_{dce} = 2\pi R\epsilon\epsilon_0\kappa\psi_0^2 e^{-\kappa x} \quad (2.6)$$

Pela análise das Equações 3 e 4, verifica-se que o comprimento de Debye é a distância em que o potencial elétrico atinge o valor ψ_0/e e que a extensão da dupla camada, representada por $1/\kappa$, é reduzida com o aumento da força iônica, com o aumento da valência dos contraíons e com a diminuição da constante dielétrica do meio, conforme exemplificado na Figura 3.

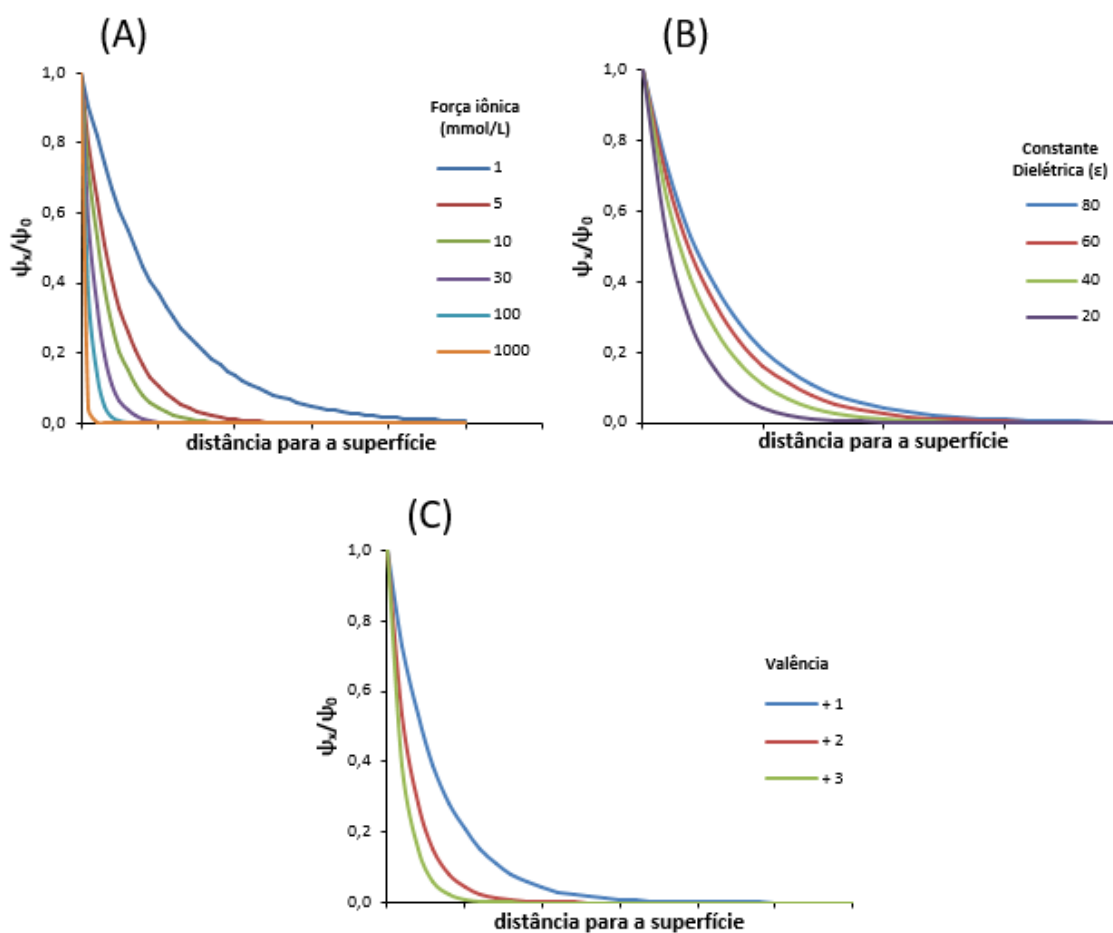


Figura 3 – Representação da relação entre potencial elétrico da dupla camada elétrica e a força iônica (A), constante dielétrica (B) e valência dos íons (C).

O modelo de Gouy-Chapman-Stern consiste em considerar um volume finito aos contraíons, de forma que a camada de contraíons adjacente à superfície coloidal se comporte como o modelo do condensador molecular, enquanto que fora dessa camada, a distribuição das cargas ocorre segundo o modelo da camada difusa (NORDE, 2011). A representação desse modelo é apresentada na Figura 4, em que a distância m equivale ao raio do contraíon e d equivale ao raio do contraíon hidratado.

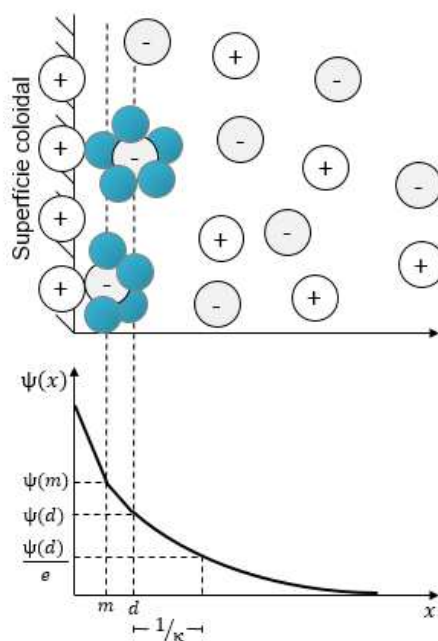


Figura 4 - Representação da dupla camada elétrica segundo o modelo Gouy-Chapman-Stern. Adaptado de Norde (2011).

2.1.1.3. Teoria DLVO

Coloides em dispersão estão em constante movimentação e conseqüentemente sujeitos a forças de atração e repulsão. Como visto anteriormente, forças de van der Waals estão sempre presentes e geralmente resultam em atração entre moléculas de um mesmo material (OVERBEEK, 1966). A estabilidade de uma solução coloidal depende então da presença de forças que se contrapõem às interações de van der Waals. No caso de partículas carregadas, como em soluções coloidais eletrolíticas, a principal força que faz esse papel é a chamada dupla camada elétrica, também descrita anteriormente. A relação quantitativa entre essas duas forças de longo alcance foi proposta separadamente

por Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overbeek (1948) e hoje é conhecida como teoria DLVO, nomeada segundo seus desenvolvedores.

De forma geral, a teoria DLVO trata da explicação do fenômeno de interação entre partículas coloidais e a sua agregação através do cálculo da força resultante que atua sobre os coloides, denominada nesse trabalho de força DLVO (F_{DLVO}). Sua intensidade pode ser calculada pela soma das contribuições das energias livres das interações de van der Waals (F_{vdW}) e das interações das duplas camadas elétricas (F_{dce}) (NORDE, 2011; TREFALT; PALBERG; BORKOVEC, 2017). Uma boa aproximação da força DLVO que atua sobre cada partícula é função da distância (x) entre as moléculas, conforme a Equação 2.7, em que F_{vdW} e F_{dce} podem ser calculadas de acordo com as Equações 2.2 e 2.6:

$$F_{DLVO}(x) = F_{vdW}(x) + F_{dce}(x) \quad (2.7)$$

Como resultado, o perfil típico das forças que atuam sobre um sistema coloidal é apresentado na Figura 5.

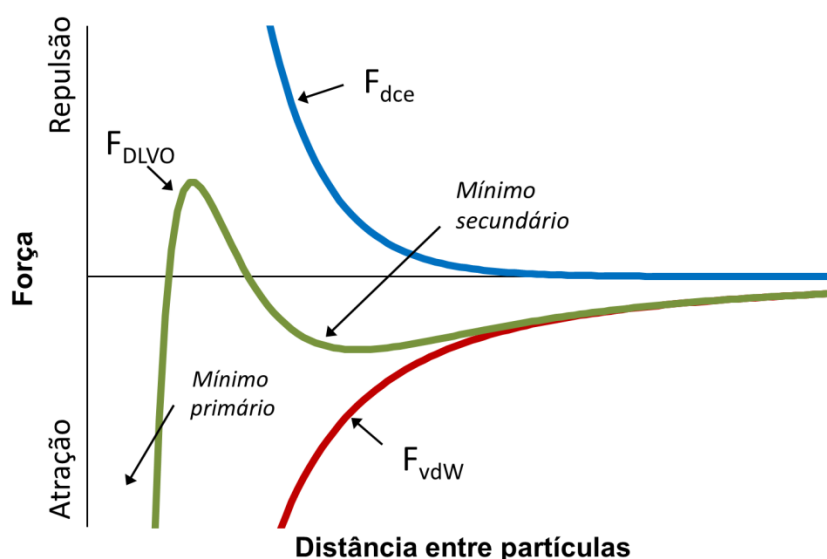


Figura 5 – Representação das forças que atuam sobre cada colóide, em função da distância entre partículas.

Na Figura 5 pode-se verificar que próximo ao contato entre as moléculas, existe um mínimo de força, denominado como *mínimo primário*, que é determinado pela grande contribuição das forças de van der Waals, o que resulta em agregação irreversível entre os coloides (NORDE, 2011). O distanciamento das partículas

resulta em um pico, seguido por um segundo mínimo, menos acentuado que o primeiro, denominado *mínimo secundário*. Essa região é considerada metaestável, pois devido à minimização da energia de Gibbs, ocorre a agregação reversível dos colóides. O pico é formado devido a forte contribuição das forças de repulsão, sendo este verificado a uma distância próxima ao comprimento de Debye.

A análise da força DLVO para diferentes sistemas mostra que os principais fatores que a afetam são a força iônica e a densidade de cargas do colóide (σ), que por sua vez é diretamente proporcional a constante dielétrica do sistema, conforme indicado na Equação 2.8 (TREFALT; PALBERG; BORKOVEC, 2017):

$$\sigma = \varepsilon \varepsilon_0 \kappa \psi_0 \quad (2.8)$$

Para a exemplificação da influência dos principais parâmetros em um sistema coloidal, os valores da força DLVO foram calculados segundo as equações 2.2, 2.6 e 2.7, em sistemas variando a força iônica (Figura 6), a constante dielétrica do meio (Figura 7) e a valência do cátion (Figura 8). Em todas as situações foram utilizados os valores para as constantes e variáveis do sistema conforme a Tabela 2.

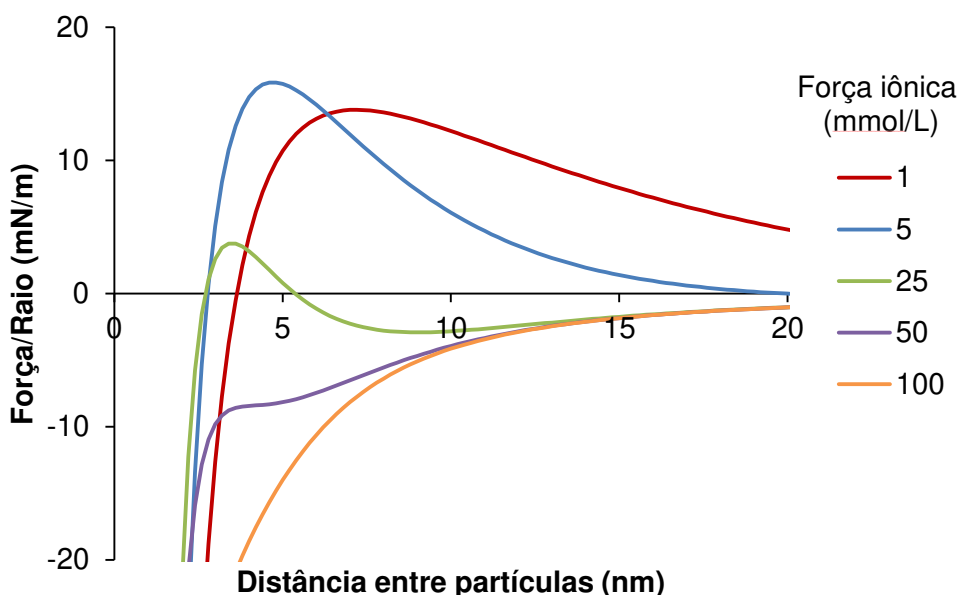


Figura 6 – Força DLVO sobre partículas em um sistema coloidal na presença de diferentes concentrações de eletrólito monovalente. Constante dielétrica igual a 80.

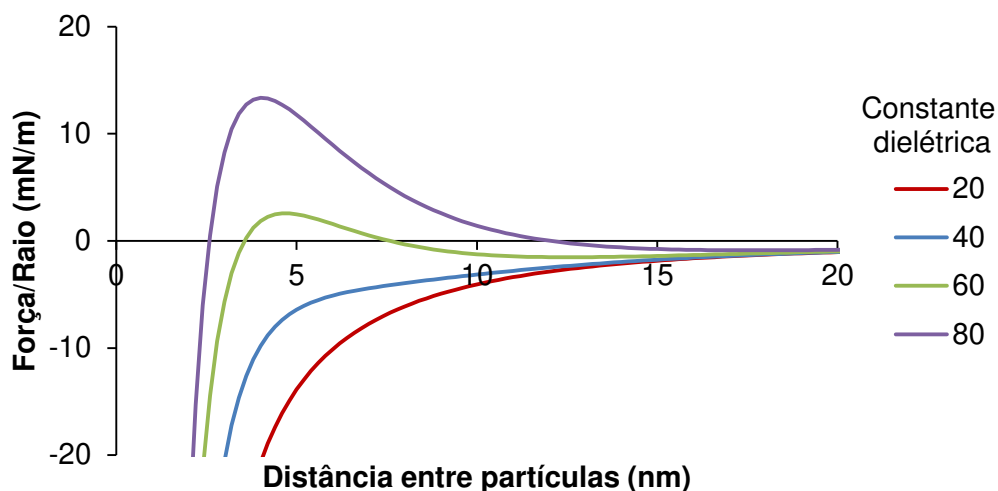


Figura 7 – Força DLVO sobre partículas em um sistema coloidal com diferentes constantes dielétricas do solvente. Força iônica, 10 mmol/L.

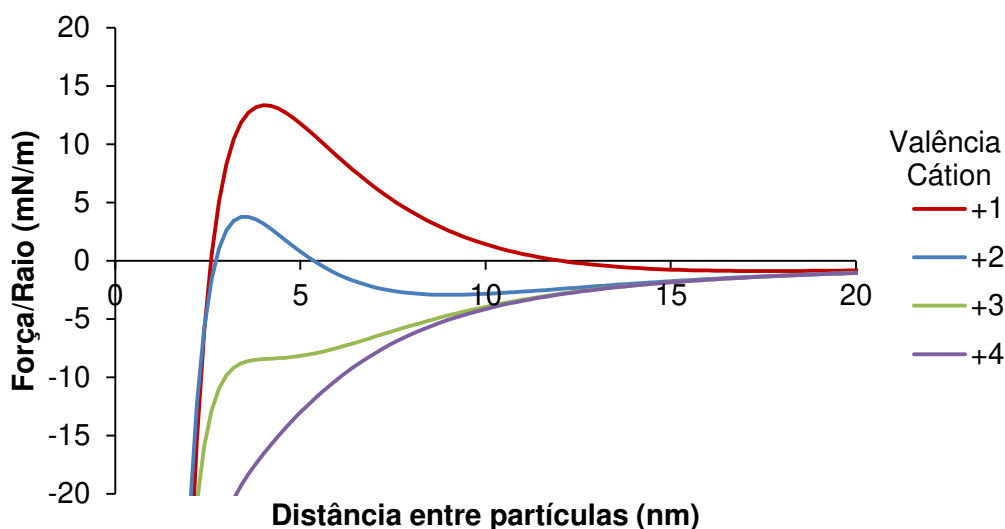


Figura 8 - Força DLVO sobre partículas em um sistema coloidal na presença de sais de cátions valências distintas. Concentração salina, 10 mmol/L; constante dielétrica, 80.

Como se pode observar na representação da Figura 6, sistemas coloidais são muito sensíveis a variações de força iônica. Enquanto que em concentrações baixas de eletrólitos a força DLVO é definida majoritariamente pelas forças da dupla camada elétrica, à medida que se aumenta a concentração salina, o sistema passa rapidamente a ser definido exclusivamente pelas forças de van der Waals, o que resulta em instabilidade do sistema e conseqüente agregação dos coloides.

O efeito da alteração da constante dielétrica do sistema pode ser observado na Figura 7. Neste caso, valores mais altos da constante dielétrica

Tabela 2 - Constantes e variáveis utilizadas para o cálculo das forças DLVO.

Composto	Valor	Unidade
Constante dos gases (R)	8,3145	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
Constante de Boltzmann (k)	$1,3806\cdot 10^{-23}$	$\text{m}^2\cdot\text{kg}\cdot\text{s}^{-2}\cdot\text{K}^{-1}$
Permissividade no vácuo (ϵ_0)	$8,8542\cdot 10^{-12}$	$\text{F}\cdot\text{m}^{-1}$
Carga elementar (q)	$1,6022\cdot 10^{-19}$	C
Constante de Avogadro (L_a)	$6,0221\cdot 10^{23}$	mol^{-1}
Constante de Hamaker (H)	$5,0\cdot 10^{-21}$	J
Potencial da dupla camada (ψ_0)	-10	mV
Temperatura (T)	298,15	K

favorecem a repulsão entre os coloides e a consequente estabilização da dispersão. A diminuição da constante dielétrica do sistema, resultante na prática da simples alteração na constituição da fase dispersante, diminui também o efeito da dupla camada elétrica e a força DLVO passa a ser definida majoritariamente pelas forças de van der Waals.

O último fator fundamental que afeta a magnitude da força DLVO que será abordado nesse trabalho é a valência dos íons em solução. Conforme descrito na Equação 2.5, não há distinção entre cátions e ânions na formulação da teoria da dupla camada elétrica. A fim de simplificar a descrição do fenômeno, consideramos a valência do ânion igual a -1. Assim, verifica-se que o aumento da valência do cátion resulta em drástico aumento da contribuição das forças de van der Waals no sistema (Figura 8). Apesar de o modelo DLVO prever a influência da força iônica do sistema, ele não é adequado para descrever a diferença entre a estabilidade de sistemas na presença de íons de diferentes naturezas, pois considera apenas a valência destes.

2.1.1.4. Série de Hofmeister

A teoria DLVO é extremamente importante na descrição de fenômenos em sistemas coloidais. Entretanto, a influência de sais é contabilizada apenas pela sua valência e concentração, não havendo qualquer distinção entre coíons e

contraíons. O único efeito específico considerado é na teoria de Stern, que leva em conta o raio dos contraíons na camada adsorvida ao coloide. De uma maneira geral, falhas na formulação da teoria DLVO estão relacionadas à simplificação das forças de dispersão – majoritariamente tidas como forças de van de Waals – e por negligenciar a contribuição de forças não eletrostáticas importantes, como polarização e hidratação de íons, interações íon-solvente e íon-íon (BOSTRÖM et al., 2005). Antes da formulação da teoria DLVO, em 1888, Hofmeister já havia relatado em uma série de artigos o papel fundamental da natureza dos sais na estabilidade de proteínas em solução. Seus experimentos mostraram que os sais podem ser ordenados de acordo com a sua efetividade em promover a estabilização ou desestabilização dos polímeros em soluções aquosas (KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004). Segundo esse critério, os sais podem ser definidos como cosmotrópicos e caotrópicos. Apesar de ser formulada para sais, a série de Hofmeister, ou série liotrópica, é geralmente representada para cátions e ânions separadamente, conforme esquematizado na Figura 9.

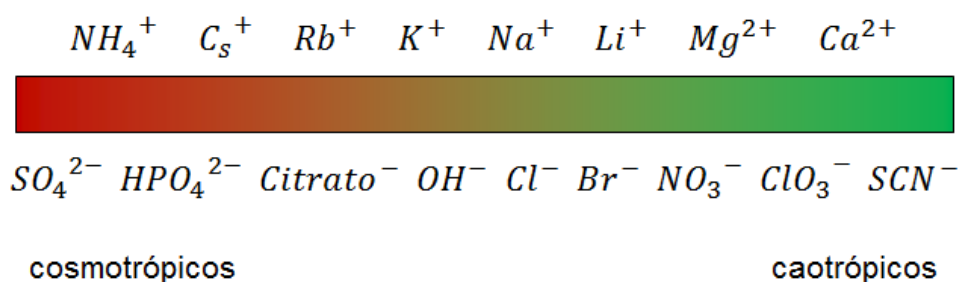


Figura 9 – Ordem típica da série de Hofmeister para cátions e ânions. Adaptado de Kunz (2010).

Desde o primeiro relato, verificou-se que diversos fenômenos na presença de sais seguem a série de Hofmeister, com apenas algumas eventuais modificações. Entre eles, podemos destacar a atividade enzimática, a estabilidade e a cristalização de proteínas, as interações entre proteínas, a agregação de polímeros e o crescimento microbiano (ZHANG; CREMER, 2006). Segundo Collins e Washabaugh (1985), os efeitos da série de Hofmeister em soluções aquosas são importantes quando a concentração salina encontra-se entre 0,01 e 1,0 mol/L e o efeito dos ânions é mais acentuado que o efeito dos cátions.

Embora exista uma vasta gama de aplicação da série de Hofmeister, a razão pela qual os íons são organizados dessa forma ainda não foi completamente

elucidada. Sabe-se que alguns fatores são fundamentais na especificidade dos íons, como sua densidade de cargas, a estrutura e disposição do solvente, a composição do meio, a natureza dos contraíons, a estrutura e composição das superfícies e a concentração salina (KUNZ, 2010).

Como complemento a teoria DLVO e às observações de Hofmeister, será descrita a seguir a teoria da condensação iônica.

2.2. Condensação iônica

A teoria de condensação iônica é um complemento da teoria DLVO e propõe descrever o modo e a extensão que os contraíons se ligam aos grupos carregados de coloides, que neste trabalho serão considerados apenas polieletrólitos. Essa teoria foi desenvolvida por Manning em uma série de artigos (MANNING, 1969a, 1969b, 1969c, 1977) e é aplicável a polieletrólitos cujos grupos carregados se distribuem uniformemente ao longo da molécula. Nessa classe, estão inclusos polímeros lineares, como ácidos nucleicos e alguns polissacarídeos carregados, como o PRP. Assim como a teoria DLVO, o fenômeno de condensação molecular de contraíons a polieletrólitos é regido pela interação entre cargas presentes em solução, conforme descrito inicialmente na teoria de Debye-Hückel (MANNING, 1969b). Contudo, existem diferenças significativas entre sistemas de eletrólitos pequenos e polieletrólitos. A idealidade da teoria de Debye-Hückel se encontra em soluções infinitamente diluídas. Devido à alta densidade de cargas de polieletrólitos, independente da sua concentração, sempre haverá inúmeros contraíons ligados aos grupos iônicos dos polieletrólitos. Assim se torna impossível experimentalmente o estudo de soluções diluídas do polímero (MANNING, 1969b). Dessa forma, uma nova abordagem se fez necessária, de modo a descrever o comportamento polieletrólitos. Este modelo assume as seguintes premissas (MANNING, 1969b):

- (a) A cadeia do polieletrólito é considerada uma linha carregada, infinita e homogênea, cuja densidade de cargas, β , é constante.
- (b) A interação entre duas ou mais cadeias de polieletrólito é negligenciada, independente da concentração de sal adicionado ao sistema.

- (c) A constante dielétrica do sistema, ε , é considerada como a do solvente puro, sem a presença de sal.
- (d) Para soluções diluídas, a condensação de íons aos grupos carregados do polieletrólito ocorre para a diminuição do parâmetro de densidade de cargas, ξ , para o valor unitário.
- (e) O comportamento físico dos íons móveis não condensados pode ser descritos pela aproximação de Debye-Hückel

2.2.1. Modelagem matemática da condensação iônica

A condensação iônica em um determinado polieletrólito é função de sua densidade axial de cargas, que por sua vez é função do espaçamento médio entre cargas, b . O parâmetro estrutural adimensional de um polímero é proporcional à densidade de cargas e é definido pela Equação 2.9 (FLOCK; LABARBE; HOUSIER, 1996; MANNING, 1978):

$$\xi = \frac{q^2}{4\pi \varepsilon \varepsilon_0 k T b} \quad (2.9)$$

onde q é a carga elementar, ε é a constante dielétrica do solvente, ε_0 é a permissividade no vácuo, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em Kelvin e b é a distância axial entre grupos carregados do polímero

Segundo Manning (1978), a partir do conceito de ξ é possível definir condensação iônica como “O modo de ligação de contraíons de valência N a um polieletrólito é chamado de condensação se, em um ambiente contendo apenas uma única espécie de contraíon, a fração de cargas do polieletrólito é igual ao valor constante $(N\xi)^{-1}$ em uma ampla faixa de concentração”.

Como consequência, a carga efetiva de cada grupo carregado do polieletrólito, q_{ef} , pode ser descrita como a fração da carga inicial, q_0 , reduzida pelo número de contraíons de valência N ligados a cada carga do polieletrólito, θ_N , conforme representado na Equação 2.10 (MANNING, 1978):

$$\frac{q_{ef}}{q_0} = 1 - N\theta_N = (N\xi)^{-1} \quad (2.10)$$

A definição da condensação iônica considera apenas a presença de concentrações muito baixas de contraíons. Nessas condições, a extensão da condensação iônica permanece inalterada. Contudo, pode-se verificar experimentalmente que o aumento da concentração salina do sistema resulta em maior ligação dos contraíons aos grupos carregados do polieletrólito. Isso ocorre, pois soluções de polieletrólitos estão sujeitos às mesmas interações eletrostáticas que compostos iônicos menores. Portanto, a modelagem do sistema de polieletrólitos precisa considerar as interações de Coulomb entre os seus grupos carregados e o efeito conjunto desses grupos sobre os contraíons.

Examinando o efeito de Debye-Hückel para a redução do campo elétrico entre cargas, temos que a contribuição de cada par de cargas do polieletrólito, i e j , para a energia livre do sistema é dado pela expressão 2.11 (MANNING, 1978):

$$\frac{q_{ef}}{\varepsilon(|i-j|b)} e^{-\kappa|i-j|b} \quad (2.11)$$

na qual o comprimento recíproco de Debye, κ , e a força iônica, I , são apresentados nas Equações 2.12 e 2.13, em que c_i e z_i são a concentração e a valência dos grupos iônicos i presentes no sistema:

$$\kappa^2 = \frac{L_a q^2 I}{\varepsilon \varepsilon_0 k T} \quad (2.12)$$

$$I = \frac{1}{2} \sum_1^n c_i z_i^2 \quad (2.13)$$

Segundo Manning (1978), a energia livre do sistema pode ser calculada pela soma de duas contribuições principais: a energia necessária para carregar os grupos do polieletrólito através da sua desprotonação e a energia livre da mistura de todos os compostos iônicos em solução com o solvente. Em sistemas nos quais a força iônica do sistema é muito maior que a concentração de grupos carregados do polieletrólito, a energia livre da dissociação dos prótons de cada grupo do polieletrólito (\bar{g}_{el}) é dada pela Equação 2.14, resultante da soma da Equação 2.11 em todos os pares de cargas vizinhas (i, j) em um polímero linear:

$$\bar{g}_{el} = -(1 - N\theta_N)^2 \xi \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (2.14)$$

Outra contribuição para a energia livre do sistema (\bar{g}_{mix}) ocorre pelo efeito da mistura de contraíons M^N livres e ligados, e moléculas do solvente, de acordo com a Equação 2.15 (MANNING, 1978):

$$\bar{g}_{mix} = \theta_N \ln(10^3 \theta_N / (C_N - \theta_N C_P) V_P) \quad (2.15)$$

na qual V_P é o volume da região onde os contraíons estão ligados aos grupos carregados no polieletrólito, c_N é a concentração de cátions de valência N e c_N é a concentração de polímero. V_P é dado em cm^3/mol do polímero, e c_N em mol/L .

As Equações 2.14 e 2.15 nos mostram que \bar{g}_{el} diminui com o aumento de θ_N e tende à máxima associação de íons entre os grupos carregados do polímero com o aumento da força iônica, ou seja, $N\theta_N \rightarrow 1$. O valor de \bar{g}_{mix} , por sua vez, aumenta com o aumento de θ_N , sendo que o aumento da força iônica tenderia a dissociação completa, e conseqüente $N\theta_N \rightarrow 0$. O estado de equilíbrio no qual ocorre a minimização da soma das energias \bar{g}_{el} e \bar{g}_{mix} resulta em um estado intermediário de dissociação incompleta.

De uma forma geral, o estado de equilíbrio de associação de contraíons a um polieletrólito é atingido pela minimização da energia livre, cujas contribuições foram apresentadas nas Equações 2.14 e 2.15. O resultado é uma equação transcendente em função de θ_N (Equação 2.16) (FLOCK; LABARBE; HOUSSIER, 1996; MANNING, 1978):

$$1 + \ln\left(\frac{10^3 \theta_N}{V_P(C_N - \theta_N C_P)}\right) = -2 N \xi (1 - N\theta_N) \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (2.16)$$

No limite de concentração de contraíon tendendo a zero, o valor de θ_N que satisfaz a Equação (2.16) pode ser calculado pela Equação (2.17), em que θ_p é a fração de cargas neutralizada do polímero:

$$\theta_p = N\theta_N = 1 - (N\xi)^{-1} \quad (2.17)$$

Considerando a condição de baixas concentrações salinas, V_P é dado pela Equação 2.18, obtida através das equações 2.12, 2.16 e 2.17 (MANNING, 1977, 1978):

$$V_P = 4\pi e L_a N' v^{-1} (v + v') (\xi - N^{-1}) b^3 \quad (2.18)$$

na qual N' , N , v' e v são as valências dos coíons e contraíons e seus respectivos coeficientes estequiométricos na fórmula molecular do sal, respectivamente.

2.2.2. Exemplos e implicações da teoria da condensação iônica

A formulação da teoria de condensação iônica está fundamentada no fato de que polieletrólitos lineares podem ser considerados como infinitos, devido ao seu grande número de grupos carregados e pequena distância média entre eles, b , resultando assim em alta densidade linear de cargas. Exemplos de b para diferentes polieletrólitos são apresentados na Tabela 3. Esses valores independem das principais variáveis do sistema, como força iônica e constante dielétrica, mas podem variar de acordo com a estrutura tridimensional do polímero.

Tabela 3 – Exemplos de polieletrólitos e suas respectivas distâncias médias entre grupos carregados.

Polieletrólito	b (Å)	Referência
Polissacarídeo capsular de <i>Klebsiella</i> sp.	1,4	(ISAAC et al., 1979)
DNA nativo	1,7	(RECORD; ANDERSON; LOHMAN, 1978)
Dextrana Sulfato	2,6	(WELLS, 1973)
Heparina	2,9	(RABENSTEIN; ROBERT; PENG, 1995)
Xantana (dupla hélice)	2,9	(JONES et al., 1987)
DNA desnaturado	4,3	(RECORD; ANDERSON; LOHMAN, 1978)
Poligalacturonato	5,2	(WINZOR et al., 2004)
Xantana (hélice simples)	5,8	(JONES et al., 1987)
Xantana (<i>random coil</i>)	6,4	(JONES et al., 1987)

Devido à estrutura do DNA, a facilidade de sua purificação e a ampla disponibilidade de métodos de análise de sua estrutura, esse composto é o principal modelo para o estudo da condensação iônica. Portanto, neste trabalho analisaremos resultados experimentais utilizando DNA descritos na literatura, com o objetivo de explicar fenômenos que ocorrem em diversos polieletrólitos, inclusive o PRP.

Conforme a formulação teórica apresentada na Equação 2.9, o parâmetro estrutural adimensional, ξ , é inversamente proporcional a b . No limite de baixas concentrações, θ_p e V_p podem ser calculados pelas Equações 2.17 e 2.18, respectivamente. No caso de contraíons com alta densidade de cargas, assume-se que a condensação seja territorial, ou seja, os íons não perdem a sua camada de hidratação original e ficam “livres” para circular em um volume definido próximo à cadeia do polieletrólito (MANNING, 1979). Conforme exemplificado na Tabela 4, verifica-se que, respeitando o limite de baixas concentrações salinas, o aumento de b resulta em menor neutralização do polímero e maior volume onde os contraíons estão ligados.

Tabela 4 – Valores calculados de ξ , θ_p e V_p no limite de baixas concentrações ($c_1 \rightarrow 0$), para um polieletrólito com espaçamento médio entre cargas b na presença de um sal monovalente. Temperatura de 298,15 K e ε igual a 78,5.

b (Å)	ξ	θ_p	V_p (cm ³ /mol)
0,5	14,3	0,93	68
1,0	7,1	0,86	253
1,7*	4,2	0,76	647
3,0	2,4	0,58	1533
4,0	1,8	0,44	2067
5,0	1,4	0,30	2201

* espaçamento médio entre grupos fosfato do DNA.

A modelagem do sistema segundo a teoria da condensação iônica considera que os grupos carregados vizinhos atuam em conjunto para a atração eletrostática dos contraíons. Devido à pequena distância entre as cargas do polieletrólito, essa simplificação é válida para baixas concentrações salinas, em que a extensão de influência do campo eletrostático de cada grupo, representado por κ^{-1} , é muito maior que b (MANNING; RAY, 1998).

Conforme visto anteriormente, o aumento da força iônica resulta em uma maior blindagem eletrostática do sistema, diminuindo assim o valor de κ^{-1} . Conseqüentemente, em sistemas com altas concentrações salinas, κ^{-1} pode se tornar menor que b , descaracterizando assim a simplificação inicial. Como regra

prática, o modelo de condensação iônica pode ser utilizado com precisão em sistemas em que o valor de κb é menor do que a unidade (MANNING; RAY, 1998; MANNING, 1978). Em contraste com a teoria de Debye-Hückel, em diversos sistemas essa condição limitante só é atingida quando a concentração salina é superior a 1 mol/L (MANNING; RAY, 1998). Na Tabela 5 é apresentado um exemplo da influência da concentração de um sal monovalente sobre θ_p , juntamente com os valores de κ^{-1} e κb . Pode-se perceber que até o limite de 0,1 mol/L, que é a condição limitante de Debye-Hückel, θ_p não apresenta grandes variações. A partir desse ponto, há um aumento gradativo dessa variável. Nesse exemplo, a condição limitante, quando o valor de κb aproxima-se da unidade, só é atingido a concentrações salinas superiores a 2 mol/L.

Tabela 5 – Valores calculados de θ_p , κ e κb de um polieletrólito na presença de diferentes concentrações de sal monovalente. Espaçamento entre cargas, b , igual a 2 Å. Temperatura 298,15 K e $\varepsilon = 78,5$.

c_1 (mol/L)	θ_p	κ^{-1} (Å)	κb
0,0001	0,72	304,2	0,01
0,001	0,72	96,2	0,02
0,01	0,72	30,4	0,07
0,1	0,74	9,6	0,21
0,5	0,77	4,3	0,46
1,0	0,82	3,0	0,66
2,0	0,90	2,2	0,93

Além do efeito da presença de sais, o modelo da condensação iônica considera também a contribuição da constante dielétrica do sistema, tanto na neutralização de cargas do polímero, quanto na dissociação iônica do sal (FLOCK; LABARBE; HOUSIER, 1996; MEL'NIKOV et al., 1999). Pela análise gráfica das soluções da Equação 2.16 para diferentes combinações de ε e força iônica, é possível constatar que o perfil de θ_p é o mesmo, independente do valor de ε (Figura 10). É possível constatar também que, conforme discutido anteriormente, para concentrações salinas menores que 0,1 mol/L, θ_p é praticamente constante.

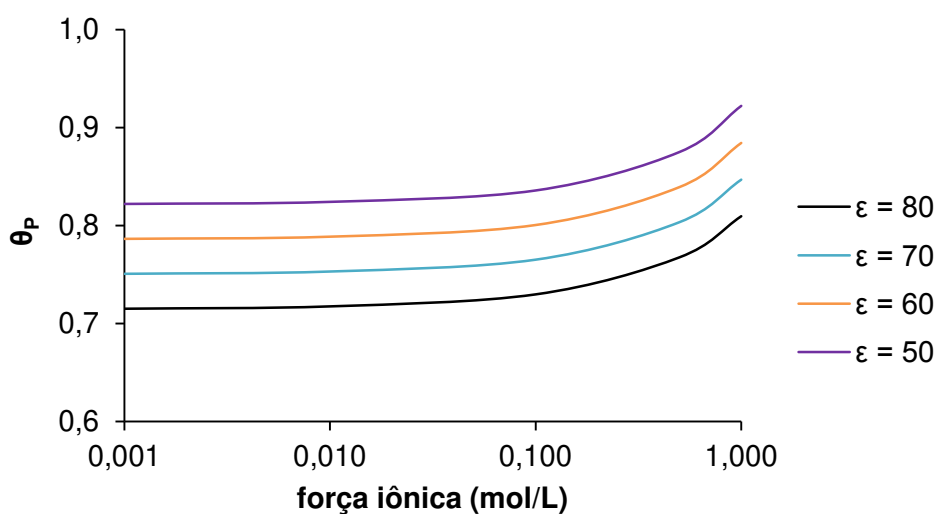


Figura 10 – Fração de contração monovalente ligada a cada grupo carregado de um polieletrólito com b igual a 2 Å em função da constante dielétrica do solvente e da força iônica do sistema.

Outra consequência da formulação teórica é a relação linear entre θ_p e ϵ , decorrente da relação linear entre θ_p e ξ (Figura 11). Uma aplicação prática de tal análise gráfica é que uma determinada fração de polieletrólito neutralizado pode ser alcançada por diversas combinações entre força iônica e ϵ .

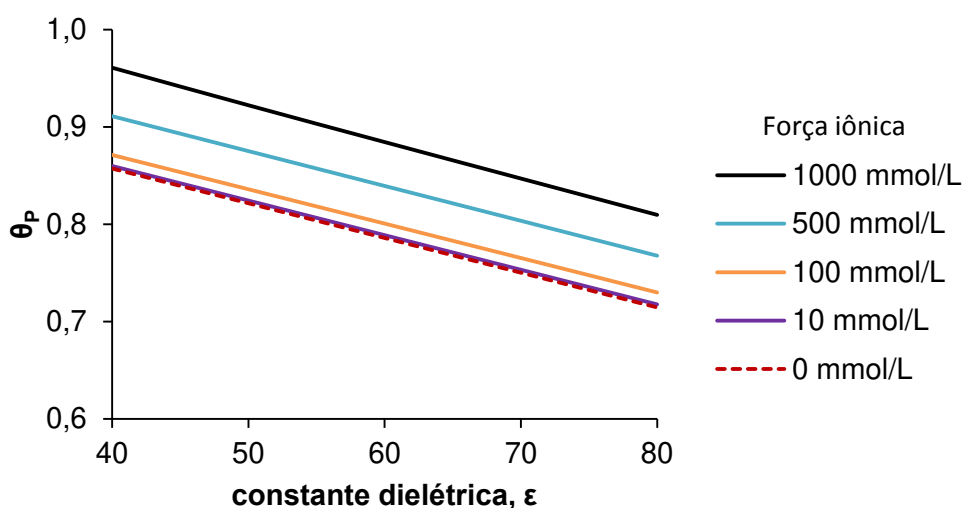


Figura 11 – Fração de contração monovalente ligada a cada grupo carregado de um polieletrólito (θ_p) com b igual a 2 Å em função da constante dielétrica do solvente e da força iônica.

Diversos estudos de agregação de DNA na presença de solventes orgânicos e sais apontam que o colapso das moléculas ocorre a uma fração fixa de cargas neutralizadas do polímero. Resultados de diversos autores mostram que independente da força iônica e da constante dielétrica do sistema, a precipitação do DNA ocorre quando 88% a 91% dos grupos fosfato estão neutralizados (ARSCOTT et al., 1995; BLOOMFIELD; MA; ARSCOTT, 1993; FLOCK; LABARBE; HOUSSIER, 1996). A agregação ocorre majoritariamente devido as características eletrostáticas do sistema, apesar de existirem outras variáveis envolvidas, como hidratação, flutuação de contraíons e ligações sítio específicas (BLOOMFIELD; MA; ARSCOTT, 1993). A contribuição específica do solvente, além do efeito da constante dielétrica, é considerada inexistente (FLOCK; LABARBE; HOUSSIER, 1996) ou pouco perceptível (BLOOMFIELD; MA; ARSCOTT, 1993). O efeito específico do íon, por sua vez, é considerado de grande importância na condensação iônica. O modelo geralmente se aplica para contraíons com alta densidade de cargas, como Na^+ , K^+ e Mg^{2+} . Nesses casos, os contraíons permanecem hidratados e não apresentam interações sítio-específicas com o polieletrólito (MANNING, 1979).

2.3. Polissacarídeos

Polissacarídeos são biopolímeros formados por unidades monossacarídicas unidas em uma cadeia principal. Essas cadeias podem ser homogêneas, nas quais há apenas um tipo de monômero, ou heterogêneas, em que dois ou mais monômeros estão presentes. Quanto à estrutura, polissacarídeos podem ser lineares ou ramificados. Alguns exemplos são apresentados na Tabela 6.

A natureza dos grupos monoméricos e a forma com que estão ligados em cadeia também permite classificar os polissacarídeos como polióis, poliésteres e em alguns casos, poliácidos. Grupos ionizáveis estão presentes em muitos polissacarídeos, sendo provenientes dos monômeros da cadeia principal ou de substituições e/ou derivatizações. Quanto à presença de tais grupos, polissacarídeos podem ser classificados como neutros ou carregados. Quanto aos grupos carregados, os polímeros ainda podem ser subdivididos como catiônicos, aniônicos ou anfólitos. Os grupos iônicos mais comuns são carboxila e sulfato, como por exemplo, em alginato e carragenina, respectivamente (WALTER, 1997).

Tabela 6 – Exemplos de polissacarídeos, classificados de acordo com a origem e monômeros presentes na cadeia principal. Adaptado de Nwodo; Green; Okoh (2012) e Walter (1997).

Origem	Polissacarídeo	Cadeia principal
Plantas terrestres	Amido	Glicose
	Celulose	Glicose
	Pectina	Ácido galacturônico
Plantas marinhas	Agar	Galactose e galactopiranosose
	Alginato	Ácido gulurônico e ácido manurônico
	Carragenana	Galactose
Bactérias	Dextrana	Glicose
	Curdlana	Glicose
	Xantana	Glicose, manose, ácido glucurônico
Fungos	Pululana	Glicose
Animais	Ácido hialurônico	Ácido glucurônico e acetilglicosamina
	Glicogênio	Glicose
	Quitina	Acetilglicosamina

Devido às suas dimensões e à alta afinidade por água, polissacarídeos são classificados como hidrocoloides (SMITH; PACETT, 1982). Portanto, soluções de polissacarídeos são na verdade dispersões coloidais, sujeitas a todas as forças descritas no Capítulo 2.1. Quando dispersos em água, a maioria dos polissacarídeos é considerada liofílica, estando o sistema em equilíbrio termodinâmico. A desestabilização desses sistemas envolve a alteração da composição do solvente para que os coloides passem a ser liofóbicos e, portanto, instáveis no sistema em questão.

2.3.1. Poliribosil-ribitol-fosfato

O poliribosil-ribitol-fosfato (do inglês PRP) é a denominação simplificada do polímero poli((3)- β -D-ribose-(1-1)-ribitol-5-fosfato), um polissacarídeo capsular linear produzido pela bactéria *H. influenzae* sorotipo b (EGAN et al., 1982;

KNISKERN; MARBURG; ELLIS, 1995). Sua estrutura foi apresentada por Crisel, Baker e Dorman (1975), conforme representado na Figura 12. Esta estrutura se assemelha à do ácido ribonucleico (RNA), para o qual a cadeia também é formada de unidades de fosfato, ribose e polioliol. Devido a seu grupo fosfato, o polímero apresenta carga negativa quando o pH do meio é maior que 1 (STUART; DE VRIES; LYKLEMA, 2005).

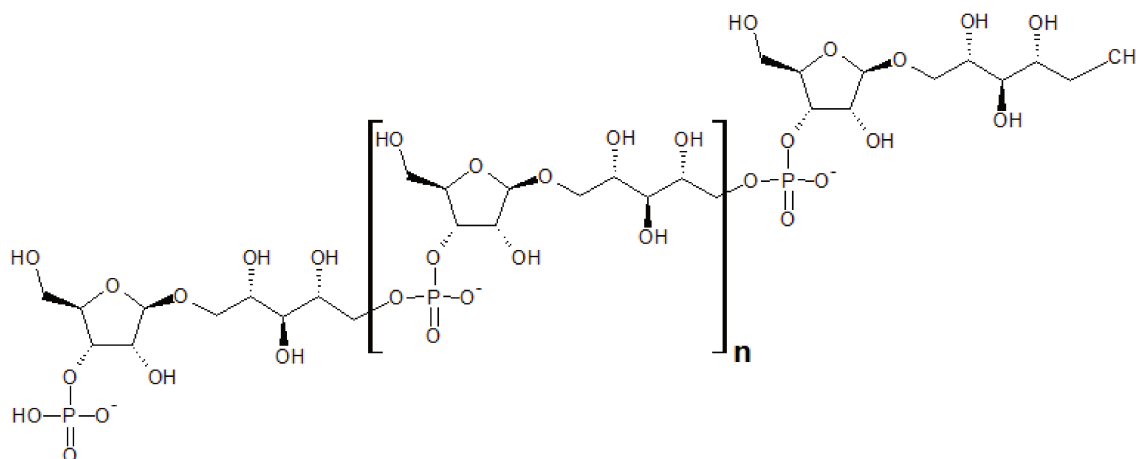


Figura 12 – Estrutura do PRP. Adaptado de Egan et al. (1982).

Industrialmente, o PRP é cultivado em regime de batelada alimentada utilizando-se meios de cultura complexos (TAKAGI *et al.*, 2006), apresentando ao final do cultivo massa molecular entre 300 e 700 kDa (CINTRA, 2014). Para a utilização em vacinas, o polissacarídeo deve ser purificado e apresentar menos que 1% (m/m) de contaminação para cada um dos contaminantes, proteínas e ácidos nucleicos (WHO, 2000). Esse processo envolve diversas etapas de filtração tangencial, em combinação com etapas de precipitação com etanol na presença de detergentes (brometo de cetil trimetilamônio, dodecil sulfato de sódio e/ou deoxicolato) e sais (acetato de sódio, fosfato de sódio e/ou cloreto de sódio) (ALBANI et al., 2012; COSTANTINO, 2014; HAMIDI; BEURRET, 2009; LANDER, 2002).

A massa molecular de uma unidade repetitiva de PRP é 345,2 Da, ou seja, um polímero de 100,1 kDa apresenta 290 unidades repetitivas e conseqüentemente, 290 cargas negativas. A concentração de monômeros em uma solução com 1,0 g/L de polissacarídeo é de 2,90 mmol/L.

A hidrólise de PRP na presença de sais segue o mecanismo análogo à hidrólise enzimática dependente de Mg^{2+} de ésteres de ácido fosfórico (EGAN et al., 1982). No caso específico do PRP, em meios contendo sais e grupos OH^- livres, a ligação fosfodiéster é clivada, causando assim a redução da massa molecular do polímero. O mesmo mecanismo de degradação é proposto para a hidrólise de RNA (LI; BREAKER, 1999). Neste caso, a temperatura, a concentração de íons divalentes e a concentração de grupos OH^- têm grande influência na constante de hidrólise. Um estudo da degradação de PRP desenvolvido por Cintra e Takagi (2015) mostra que sua hidrólise ocorre apenas em meios nos quais o pH é maior que 6,5 e é fortemente dependente da temperatura. Em meios ácidos, cátions divalentes têm pouca influência na hidrólise, enquanto que o aumento na concentração de NaCl contribui com o aumento da velocidade de hidrólise.

Assim como outros polissacarídeos carregados, PRP apresenta alta solubilidade em água, sendo necessária a adição de antissolventes e/ou sais para que ocorra a sua precipitação.

2.4. Métodos de redução de solubilidade de polissacarídeos

Polissacarídeos pertencem a um grupo heterogêneo de coloides hidrofílicos, que podem ser divididos em diversos subgrupos com características similares. Nesse trabalho, iremos tratar da estabilidade das dispersões polissacarídicas, em especial aqueles que possuem grupos iônicos, a partir de exemplos específicos, com o objetivo de extrair características gerais que podem ser aplicadas ao entendimento da estabilidade de PRP.

A agregação de polissacarídeos possui diversas aplicações de interesse industrial, principalmente na recuperação e purificação desses polímeros. Nesses processos, uma operação unitária muito comum é a precipitação, na qual a desestabilização do sistema promove a agregação das moléculas e conseqüente separação de fases. Nos próximos tópicos serão descritas as estratégias mais comuns de desestabilização de uma dispersão de polissacarídeos com o objetivo de precipitar e recuperar o produto final. Essas estratégias envolvem a manipulação de variáveis que têm maior influência sobre as forças entre partículas, como o pH, a força iônica e a constante dielétrica do solvente.

2.4.1. Efeito do pH na solubilidade de polissacarídeos

Polissacarídeos iônicos possuem grupos ionizáveis, ou grupos carregados, ligados covalentemente a sua estrutura. Enquanto alguns desses polieletrólitos apresentam apenas um tipo de grupo carregado, outros podem apresentar dois ou mais. Além disso, polissacarídeos carregados podem ser classificados de acordo com esses grupos como sendo aniônicos, catiônicos ou anfólitos, que contêm grupos negativos, positivos ou ambos, respectivamente. Os grupos carregados apresentam alta afinidade com meios aquosos e estão sujeitos a interações eletrostáticas no sistema em que estão inseridos, sendo, portanto, sensíveis ao pH e ao tipo de outros eletrólitos presentes em solução (STUART; DE VRIES; LYKLEMA, 2005).

A solubilidade dos polieletrólitos depende da ionização de seus grupos carregados, que é definida pela constante de dissociação de prótons. A diferença entre a afinidade pelo solvente dos grupos protonados e não protonados define também a diferença na solubilidade. Exemplos típicos de grupos ionizáveis de polissacarídeos são apresentados na Tabela 7, juntamente com o cologaritmo da sua constante de dissociação (pK). Exemplos clássicos de polissacarídeos carregados, cujas solubilidades são fortemente afetadas pelo pH, são alginato (HAUG; LARSEN, 1963), quitosana (FILION; LAVERTU; BUSCHMANN, 2007; SOGIAS; KHUTORYANSKIY; WILLIAMS, 2010) e pectina (SAWAYAMA et al., 1988).

Tabela 7 – Exemplos de grupos ionizáveis presentes em polieletrólitos comuns. Adaptado de (STUART; DE VRIES; LYKLEMA, 2005).

Grupo	Reação	pK	Exemplo
-NH₃⁺ (alifático)	$-NH_3^+ \leftrightarrow NH_2 + H^+$	10,5 – 11,0	Poli-alilamina
-COOH	$-COOH \leftrightarrow -COO^- + H^+$	4 - 5	Poli-ácido acrílico
-PO₄H₂	$-PO_4H_2 \leftrightarrow -PO_4H^- + H^+$	0 - 1	PRP
-PO₄H⁻	$-PO_4H^- \leftrightarrow -PO_4^- + H^+$	0 - 1	DNA
-SO₃H	$-SO_3H \leftrightarrow -SO_3^- + H^+$	< 0	Carrageana

2.4.2. Efeito da presença de sais na solubilidade de polissacarídeos

A adição de sais ao sistema coloidal tem como objetivo alterar a sua “blindagem” eletrostática, de forma que haja alteração nas forças que atuam sobre as partículas, favorecendo assim, a agregação ou a estabilização dos coloides. Conforme visto anteriormente, baixas concentrações salinas favorecem a estabilização das partículas suspensas pela forte contribuição das forças da dupla camada elétrica. À medida que a concentração salina aumenta, o valor de κ^{-1} é reduzido (Equação 2.5), resultando em menor contribuição da força repulsiva da dupla camada elétrica, favorecendo assim a agregação das macromoléculas.

A variação da concentração de sais e a consequente alteração da força predominante que age sobre as partículas faz com que o comportamento do sistema possa ser classificado de acordo com sua força iônica total (SMITH; PACETT, 1982). Nessa classificação, existem três regimes distintos: sistemas com força iônica baixa, média e alta. Para os propósitos desse trabalho, o efeito da força iônica sobre dispersões polissacarídicas serão estudadas em duas categorias distintas, de acordo com a concentração salina presente no sistema: (i) concentrações baixas, nas quais apenas os efeitos eletrostáticos determinam o comportamento do sistema; e (ii) concentrações salinas médias, nas quais além das interações eletrostáticas, a natureza dos compostos iônicos também desempenham um papel fundamental na estabilidade dos coloides. O terceiro regime, caracterizado pela alta concentração salina, não se aplica ao escopo desse trabalho. Os valores de concentração que caracterizam cada um dos regimes serão apresentados a seguir.

2.4.2.1. Regime de concentrações salinas baixas

Esse regime é observado apenas em dispersões diluídas de polissacarídeos carregados, em que a contribuição dos próprios polímeros à força iônica total pode ser negligenciada (CHO et al., 2006; SAGOU; AHUALLI; THOMAS, 2015). Nesse caso, a presença de concentrações salinas baixas (tipicamente menor que 10^{-2} mol/L) em uma dispersão de polissacarídeos geralmente é insuficiente para induzir a agregação dos coloides, o que indica que as forças predominantes sobre as moléculas são as da dupla camada elétrica. Nesse caso, pode-se considerar que a concentração e a valência dos compostos iônicos solúveis são os principais

fatores que determinam a estabilidade da dispersão coloidal (PICULELL; NILSSON, 1990).

Nesse regime, o aumento da força iônica promove a redução da viscosidade, até uma concentração crítica, na qual a viscosidade passa a ser independente da concentração salina, o que indica a mudança de regime, no qual prevalecem as forças de van der Waals e os efeitos íon específicos (BRUNCHI; MORARIU; BERCEA, 2014). A redução da viscosidade se dá pela compressão das bicamadas elétricas, conforme previsto na teoria DLVO, que reflete na redução do comprimento de Debye e no raio de giração dos polímeros (CHO et al., 2006).

2.4.2.2. Regime de concentrações salinas médias

Esse regime é verificado tipicamente em sistemas coloidais cuja força iônica varia entre 10^{-4} e 2 mol/L (SMITH; PACETT, 1982), no qual além das forças eletrostáticas, a natureza dos sais em solução determina as características dos sistemas coloidais. Nesse caso, a estabilidade das partículas suspensas é dependente da interação entre polímero iônico-contraíon, denominada condensação iônica (MANNING, 1978). A extensão dessa interação é regida pelo equilíbrio entre os grupos carregados, que em termos matemáticos pode ser sintetizado pela constante de associação entre esses compostos (SMITH; PACETT, 1982). A afinidade entre os grupos iônicos e os contraíons depende da valência dos contraíons e da densidade de cargas do coloide, conforme descrito pela teoria DLVO, mas também da natureza, polaridade e volume dos grupos iônicos do polímero e dos contraíons (PICULELL; NILSSON, 1990; SMITH; PACETT, 1982).

Em geral, a natureza dos contraíons e sua eficiência na redução da estabilidade dos polissacarídeos dispersos segue a série liotrópica para cátions e ânions (GUO et al., 2016; SMIDSRØD; HAUG, 1967; WALTER, 1997), conforme descrito por Hofmeister. O mecanismo proposto para esse fenômeno é a substituição da água de hidratação do polímero pelos sais solúveis, como forma de minimizar a energia livre do sistema (COLLINS, 2004; NINHAM; DUGNAN; PARSONS, 2011). O aumento da concentração iônica tende a reduzir a contribuição da força da dupla camada elétrica e a efetividade dos cátions e ânions passa a ser igual à série liotrópica, como observado na precipitação de proteínas por *salting-out*.

É oportuno destacar que o tipo de grupo iônico do polímero pode resultar em pequenas alterações na série liotrópica.

2.4.3. Efeito da composição do solvente na solubilidade de polissacarídeos

A solubilidade de polissacarídeos está intimamente relacionada à constante dielétrica do solvente no qual está disperso, devido às forças de estabilização e desestabilização de sistemas coloidais. Portanto, a adição de antissolventes aos sistemas tem o objetivo de manipular essa variável, pela simples combinação de compostos com propriedades distintas. As constantes dielétricas de alguns solventes são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Constantes dielétricas a 25°C de solventes selecionados. Valores obtidos de Wohlfarth (2008).

Composto	ϵ
água	79,50
glicerol	42,49
metanol	32,66
propilenoglicol	28,67
etanol	24,43
1,3-butilenoglicol	22,57
acetona	20,59
isopropanol	19,45
terc-butanol	12,34

Conforme exemplificado na Figura 7 do capítulo 2.1.1.3, a diminuição da constante dielétrica da solução diminui a blindagem eletrostática e favorece a neutralização das cargas do coloide, que resulta na diminuição da repulsão entre os coloides e consequente agregação das partículas. Contudo, a agregação também depende da concentração de contraíons no sistema, pois sua ausência resultaria em repulsão entre as cargas do polieletrólito e consequente estabilização da dispersão. Portanto, o estudo da solubilidade de polieletrólitos na presença de antissolventes está geralmente associado à presença de sais no sistema.

Diversos estudos experimentais mostram que a desestabilização da dispersão aquosa de polissacarídeos pela adição de antissolventes promove a

agregação das macromoléculas em uma faixa estreita de concentração do solvente, na qual a variação é em torno de 10% (v/v), independente do antissolvente utilizado. Alguns exemplos envolvem a precipitação de xantana (FLAHIVE; FOUFOPOULOS; ETZEL, 1994), goma lactana (FOUFOPOULOS; ETZEL, 1996) e alginato (SMIDSRØD; HAUG, 1967) na presença de etanol, isopropanol, butanol e metanol. Essa faixa estreita de concentração do solvente não é observada na precipitação de proteínas, na qual a alteração gradual da composição do solvente promove uma alteração mais sutil da solubilidade das macromoléculas (GONZALES et al., 1990), sugerindo assim um diferente mecanismo de precipitação para estas duas classes de biomoléculas. A queda abrupta da solubilidade de um sistema é relacionada com a constante dielétrica do solvente nesse ponto de transição, comportamento facilmente verificável, tendo em vista que quanto menor a constante dielétrica do antissolvente, menor é o volume necessário para a indução da precipitação dos polímeros.

Tendo em vista que a agregação dos polímeros ocorre devido ao balanço de forças do sistema e que o efeito do solvente na força DLVO se dá unicamente pela sua constante dielétrica, presume-se que a agregação ocorrerá em um sistema com uma determinada constante dielétrica, independente da composição do solvente. Ou seja, dado um sistema com concentração de polissacarídeos e força iônica definida, deve haver uma constante dielétrica crítica para a precipitação abrupta das macromoléculas, independente do solvente utilizado. Nesses casos, consideramos como precipitação abrupta a precipitação completa do polissacarídeo em uma estreita faixa de concentração de solvente, geralmente menor do que 10% (v/v). Esse comportamento foi sugerido por Flahive et al. (1994) e Foufopoulos e Etzel (1996) e diversos outros trabalhos experimentais corroboram essa hipótese (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; GONZALES et al., 1990; SANO et al., 1999). Como exemplo, a constante dielétrica crítica para a precipitação de goma xantana em dois sistemas aquosos contendo sais e um antissolvente é apresentado na Tabela 9. Nesses casos, a diferença nas constantes dielétricas críticas observadas é decorrente da presença de concentrações salinas distintas em cada grupo de ensaios.

Tabela 9 – Constantes dielétricas críticas para a precipitação de xantana purificada em meios aquosos na presença de diferentes antissolventes.

Solventes	ϵ crítica	Referência
Etanol, isopropanol ou terc-butanol	57	(FLAHIVE et al., 1994)
Etanol, isopropanol ou acetona	33	(GARCÍA-OCHOA et al., 2000)

A relação entre a concentração salina e a constante dielétrica necessária para a desestabilização de uma dispersão de polissacarídeos foi verificada por Smidsrød e Haug (1967), que estudaram a precipitação de alginato, dextrana e carboximetildextrana em soluções aquosas de etanol. Os autores verificaram que esse comportamento segue a teoria de Debye-Hückel, representada de forma simplificada pela Equação 2.19:

$$R T \ln(L_1/L_2) = R T \ln(\gamma_1/\gamma_2) = A (1/\epsilon_2 - 1/\epsilon_1) \quad (2.19)$$

em que L é o produto de solubidade do sal com o coeficiente de atividade γ no solvente com constante dielétrica ϵ . A é uma constante e os subscritos 1 e 2 se referem a dois sistemas distintos. Nesse caso, a variação no coeficiente de atividade devido a diferentes concentrações salinas pode ser desconsiderada, pois é muito pequena se comparada à variação na constante dielétrica. Definindo o produto de solubilidade do sistema polímero-contraión como $C_p * C_{M^+}$, em que C_p é a concentração de polímero e C_{M^+} é a concentração do contraíon e, considerando que a concentração de polímero solúvel é igual em todas as condições, obtém-se a Equação 2.20, em que A é uma constante e T é a temperatura:

$$\ln(C_{M_1^+}/C_{M_2^+}) = \frac{A}{T} (1/\epsilon_2 - 1/\epsilon_1) \quad (2.20)$$

A Equação 2.20 significa que existe uma relação exponencial entre a concentração salina e o inverso da constante dielétrica do solvente. Essa relação foi verificada experimentalmente por Smidsrød e Haug (1967). Outro estudo experimental da agregação de polissacarídeos na presença de sais foi conduzido por García-Ochoa, Casas e Mohedano (1993) para a precipitação de xantana na presença de CaCl_2 e isopropanol. Através dos dados apresentados pelos autores é

possível verificar que nesse caso também existe a relação linear entre o logaritmo da concentração salina e o inverso da constante dielétrica do solvente (Figura 13).

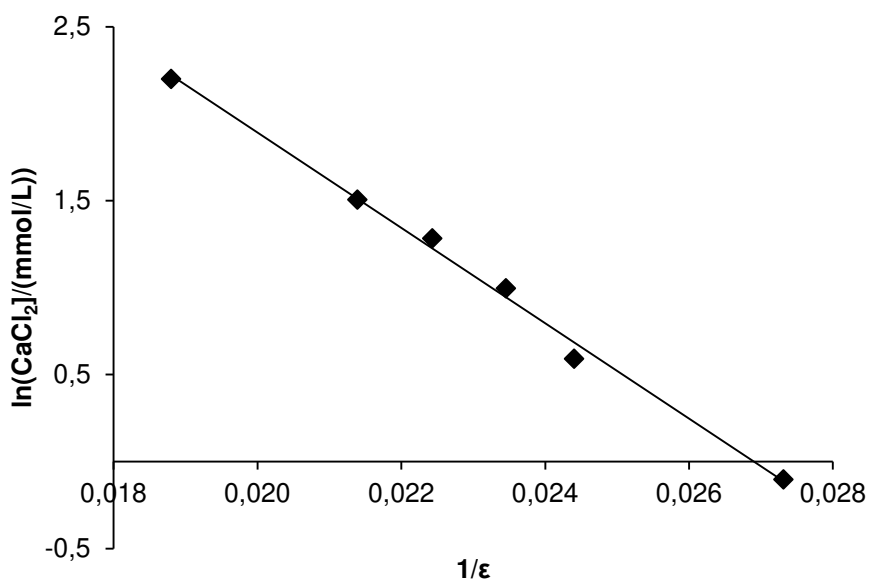


Figura 13 – Relação entre o logaritmo da concentração de CaCl_2 e a constante dielétrica do solvente. Valores calculados a partir dos dados experimentais apresentados por Garcia-Ochoa, Casas e Mohedano (1993).

O último fator considerado nesse trabalho que afeta a solubilidade de polissacarídeos na presença de antissolventes e sais é a natureza e a valência dos contraíons. Conforme visto anteriormente, a teoria DLVO não prevê os efeitos íon-específicos na estabilidade de coloides, exceto a valência. Assim, essa teoria é complementada com as observações de Hofmeister e a teoria de condensação de iônica de Manning (KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004; MANNING, 1978). Da mesma forma que para dispersões aquosas, a efetividade de íons na desestabilização de dispersões polissacarídicas segue a série liotrópica, com apenas algumas variações em sistemas específicos. Devido à predominância da existência de polissacarídeos aniônicos e as características do PRP, nesse trabalho focaremos no estudo de contraíons catiônicos. Exemplos de ordem de efetividade de cátions na redução da solubilidade de polissacarídeos em soluções contendo etanol são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Exemplos de ordem de efetividade de íons na redução da solubilidade de polissacarídeos em soluções contendo etanol.

Polissacarídeo	Grupos ionizáveis	Efetividade	Referência
Pectina	Carboxil	$\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$	Guo et al. (2016)
Carrageana	Sulfato	$\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$	Smidsrød e Haug (1967)
Alginato	Carboxil	$\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$	Smidsrød e Haug (1967)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção e purificação de PRP

3.1.1. Cultivo de Hib

O cultivo bacteriano foi realizado utilizando-se a linhagem GB3291 da bactéria *H. influenzae* tipo b, adquirida na forma liofilizada do Núcleo de Coleções de Cultura e de Microorganismos do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – SP). Os lotes semente e de trabalho foram preparados no laboratório de Desenvolvimento de Processos do Instituto Butantan (São Paulo – SP) e armazenados em nitrogênio líquido até o uso. Inicialmente o pré-inóculo foi preparado com 200 μ L da suspensão bacteriana ($5 \cdot 10^8$ UFC/mL) em 50 mL do meio modificado à base de peptona, MMP (Tabela 11), e incubado em anaerobiose, sem agitação a 37°C por 6 h (TAKAGI et al., 2006).

Ao atingir o valor 0,5 de densidade ótica a 540 nm (DO_{540}), a suspensão foi transferida para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 400 mL de meio MMP fresco, de forma a atingir DO_{540} entre 0,025 e 0,075. O frasco foi então incubado em *shaker* orbital (New Brunswick Scientific, EUA), a 150 rpm e 37°C, por aproximadamente 13 h, quando a cultura atingiu DO_{540} superior a 5,0. Nesse ponto, a pureza da cultura foi analisada por microscopia ótica e em seguida a suspensão foi transferida para o reator principal, em volume suficiente para que a DO_{540} fosse aproximadamente 0,150.

O cultivo foi realizado em modo batelada alimentada em um reator de 16L (Bioengineering, Suíça), contendo inicialmente 10 L de meio MMP. Durante o cultivo, a temperatura foi mantida a 30°C, o pH em 7,1, a vazão de ar 0,6 vvm e a saturação de oxigênio dissolvido em 30% através do controle da agitação (150 – 600 rpm). A alimentação foi iniciada no momento em que a depleção de glicose no meio foi percebida pelo aumento súbito da concentração de oxigênio dissolvido no meio. Nesse momento, iniciou-se o fornecimento do meio de alimentação a uma vazão

específica de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. A alimentação foi realizada com meio MMP modificado, cuja concentração de glicose e extrato de levedura eram 200 g/L e 100 g/L , respectivamente. O cultivo foi conduzido por aproximadamente 21 h.

Tabela 11 – Composição do meio MMP (pH ajustado para 7,1 com HCl).

Componente	Concentração
Glicose (g/L)	5,0
Extrato de levedura (g/L)	5,0
Soytone (g/L)	10,0
Na_2HPO_4 (g/L)	13,1
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	3,3
KH_2PO_4 (g/L)	2,5
NaCl (g/L)	5,0
Hemina bovina (mg/L)	30,0
NAD (mg/L)	15,0

3.1.2. Recuperação e purificação de PRP

A recuperação e a purificação de PRP foram realizadas de acordo com o método descrito por Albani et al. (2015), com pequenas adaptações. O processo baseia-se em etapas de precipitação com etanol, microfiltração tangencial em membranas Pellicon 2 (Millipore, EUA) com diâmetro de poro igual a $0,22 \mu\text{m}$ e ultrafiltração tangencial em membranas Pellicon 2 com diâmetro de poro igual a 100 kDa . Inicialmente o caldo fermentado teve seu pH ajustado para 6,3 e resfriado a 4°C . As células foram separadas do PRP solúvel por centrifugação a 17.000 g , a 4°C por 1 h. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante submetido à diafiltração em membrana de ultrafiltração com 6 diavolumes de tampão fosfato contendo SDS 0,5% e NaCl 150 mmol/L em NaH_2PO_4 10 mmol/L a pH 6,3. Após a diafiltração, o conteúdo retido pela membrana foi recuperado e seguiu para a primeira precipitação com etanol. Nessa etapa ajustou-se a concentração do sistema para etanol 40% (v/v), pela adição de etanol 99%. A precipitação foi realizada a temperatura ambiente, sob agitação magnética, por aproximadamente 15 h. Após a precipitação,

todo o conteúdo, incluindo o precipitado e a fase líquida, foi diafiltrado em membrana de microfiltração com 6 diavolumes de etanol 40% (v/v) em água, de modo recuperar o PRP solúvel e separá-lo da fração sólida. O microfiltrado foi novamente submetido à ultrafiltração para concentração. A seguir, realizou-se a segunda precipitação com etanol. Para isso, ajustou-se a concentração de etanol do concentrado a 60% (v/v) e de acetato de sódio a 3,95% (m/v), com etanol 99% e acetato de sódio 30% a pH 5,8, respectivamente. A precipitação foi conduzida a temperatura ambiente, sob agitação magnética constante, durante 4 h. Após a agitação, o sistema foi mantido em repouso por 1h para a decantação dos insolúveis. O sobrenadante foi removido por bombeamento e o precipitado foi imediatamente ressolubilizado em água. O solubilizado foi então submetido à diafiltração em membrana de ultrafiltração com 6 volumes de água e, por fim, concentrado e armazenado a -20°C , até o uso. O concentrado recuperado foi denominado PRP purificado. A concentração e massa molecular de PRP, assim como a concentração de proteínas e ácidos nucleicos foram determinados pelos métodos descritos nos itens a seguir.

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Determinação da concentração de proteínas e ácidos nucleicos

A determinação da concentração de proteínas foi realizada de acordo com o método de Lowry (LOWRY et al., 1951), no qual 3000 μL de reagente A (tartarato de sódio 200 mg/L, sulfato de cobre 100 mg/L, carbonato de sódio 20,0 g/L e hidróxido de sódio 100 mmol/L) foram adicionados a 1000 μL de amostra, propriamente diluída com água. O conteúdo foi incubado por 15 min ao abrigo de luz. A cada ensaio adicionaram-se 300 μL de reagente de Folin (1,0 mol/L) e o conteúdo novamente incubado ao abrigo de luz por 30 min. A medida da absorbância foi realizada a 750 nm e a concentração de proteínas totais foi determinada a partir de uma curva padrão de soro albumina bovina.

A determinação da concentração de ácidos nucleicos totais foi realizada pela medida da absorbância das amostras a 260 nm. Nesse caso, uma unidade de absorbância corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácidos nucleicos, empregando-se o caminho ótico igual a 1,0 cm (STEPHENSON, 2010).

3.2.2. Determinação da concentração de PRP

A determinação da concentração de PRP foi realizada pelo método de Bial modificado (DRURY, 1948). Nesse método, são necessários 750 µL de amostra à qual foram adicionados 1,50 mL de cloreto férrico 0,50 g/L em HCl 37% e 100 µL de orcinol 60,0 g/L em etanol 99%. As amostras foram incubadas em banho termostático a 100°C por 25 min e posteriormente resfriadas a temperatura ambiente. A medida da absorbância foi realizada a 668 nm e a concentração de PRP foi determinada a partir de uma curva padrão de ribose.

3.2.3. Determinação da massa molecular de PRP

A determinação da massa molecular do PRP foi realizada por cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência (HPSEC) de acordo com o método descrito por Cintra e Takagi (2015) com pequenas modificações. Amostras de 50 µL foram aplicadas a três colunas PL Aquagel-OH Mixed-H (300 mm x 7.5 mm, 8 µm; Agilent Technologies, USA) conectadas em série. As condições da análise são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Condições de análise de massa molecular de PRP por HPSEC.

Variável	Valor
Temperatura do forno (°C)	30,0
Temperatura do detector RID (°C)	30,0
Vazão da fase móvel (mL/min)	1,0
Frequência de aquisição de dados (Hz)	2,0
Tempo de corrida (min)	60,0

A fase móvel utilizada consistia em uma solução de Na₂HPO₄ 13,8 mmol/L, NaH₂PO₄ 6,2 mmol/L, NaNO₃ 150 mmol/L, NaN₃ 3 mmol/L, pH 7,0. O sistema cromatográfico consistia em um cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, EUA) equipado com detector de índice de refração e um detector de espalhamento de luz Dawn Heleos (Wyatt Technology, EUA). O processamento dos dados foi realizado através do *software* Astra v.7.0.1.24 (Wyatt Technology, EUA).

A determinação da massa molecular do PRP foi realizada por meio dos dados de espalhamento de luz. O valor de dn/dc empregado foi 0,1482, determinado previamente.

3.3. Experimentos de precipitação

Os experimentos de precipitação foram conduzidos em tubos do tipo Eppendorf de 2 mL, sendo o volume total igual a 1500 μ L. As concentrações desejadas de PRP, solvente orgânico, sais e tampão foram obtidas pela adição de reagentes ou soluções concentradas de cada um dos componentes, conforme apresentado na Tabela 13. O tampão fosfato 200 mmol/L ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) foi preparado pela adição de Na_2HPO_4 200 mmol/L à uma solução de NaH_2PO_4 200 mmol/L em volume necessário para que fosse atingido o pH de interesse.

A adição dos reagentes foi feita na seguinte ordem: água, tampão fosfato, solução salina, PRP e solvente orgânico. Após homogeneização, os tubos foram incubados a 25°C por 15 h, para que fosse atingido o equilíbrio do sistema (tempo determinado previamente). Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 16.000 *g*, 25°C por 15 min e a fase sobrenadante foi descartada. Os tubos contendo o *pellet* foram então incubados em estufa a 37°C para a evaporação do solvente remanescente. Por fim, o *pellet* seco foi solubilizado em 1000 μ L de água e mantidos a -18°C até análise de concentração de PRP.

Tabela 13 – Reagentes e soluções aquosas estoque utilizadas nos ensaios de precipitação.

Componente	Concentração
PRP	3,89 g/L
Etanol	99,5% (v/v)
Acetona	99,5% (v/v)
Isopropanol	99,5% (v/v)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	200 mmol/L
NH_4Cl , NaCl , KCl , MgCl_2 ou CaCl_2	2,5 mol/L

Um parâmetro de medida da eficiência do sistema precipitante – a fração volumétrica crítica do solvente (φ_{crit}) – foi definida como sendo a concentração de

solvente (v/v) necessária para que metade do PRP inicial fosse precipitada. Como consequência, definiu-se também uma constante dielétrica crítica (ε_{crit}) como a média ponderada das constantes dielétricas dos solventes que compõem o sistema nesta condição, conforme Equação 3.1 (CHIEN, 1984; JOUYBAN; SOLTANPOUR; CHAN, 2004; PRAKONGPAN; NAGAI, 1984):

$$\varepsilon_{crit} = \sum \varphi_i \varepsilon_i \quad (3.1)$$

em que φ_i é a fração volumétrica e ε_i é a constante dielétrica de cada solvente i . Essa simplificação não considera a variação de volume decorrente da mistura. A determinação da composição do solvente no ponto em que metade do PRP foi precipitado foi feita pela interpolação linear entre as condições experimentais imediatamente antes e depois desse ponto.

3.3.1. Análise do precipitado por microscopia

Após separação de fases e remoção do sobrenadante de precipitação do PRP conforme o item 3.3, o precipitado foi coletado com ponteiras de polipropileno de 200 μ L. Uma fina camada do precipitado foi então depositada sobre uma lâmina de vidro, previamente higienizada com etanol 90%. Após a secagem, o material foi analisado em um microscópio ótico Eclipse Ci-E (Nikon Instruments, Japão) com aquisição de imagens através do software Nis-Elements v. 4.3 (Nikon Instruments, Japão).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta inicial deste trabalho foi verificar a influência da massa molecular do PRP na sua solubilidade em soluções aquosas de etanol, com o objetivo de aplicar os conhecimentos adquiridos ao fracionamento do PRP no processo de purificação. Essa abordagem logo foi alterada, devido à verificação de que a sua solubilidade é independente de sua massa molecular (resultados não apresentados). Diante dessa situação, optou-se por estudar a agregação de apenas uma fração de PRP com massa molecular igual a 92 kDa.

A partir desse ponto, a estratégia desse trabalho foi estudar as principais variáveis que poderiam afetar a solubilidade de PRP em soluções aquosas na presença de etanol e sais, empregando a estratégia OVAT (do inglês *one-variable-at-a-time*, que significa uma variável por vez). Os fatores estudados foram: concentração inicial de PRP, pH, natureza e concentração de solvente e natureza e concentração de sal. Os solventes escolhidos foram etanol, acetona e isopropanol e os sais foram NaCl, NH₄Cl e MgCl₂. Os resultados e discussão para cada um dos fatores que afeta a solubilidade de PRP serão discutidos nos itens a seguir.

4.1. Influência da concentração inicial de PRP na sua solubilidade

A motivação para o estudo do efeito da concentração inicial do PRP na sua precipitação vem a partir do relato de diversos autores que observaram esse efeito na precipitação de proteínas. Princípios termodinâmicos indicam que a solubilidade de compostos químicos ou biológicos independe da sua concentração inicial em solução. Entretanto, alguns estudos de solubilidade de proteínas relatam a variação da concentração de proteínas na fase líquida quando diferentes concentrações iniciais de proteínas são utilizadas na precipitação (KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004; PINHEIRO et al., 2016; SHIAU; CHEN, 1997; SHIH; PRAUSNITZ;

BLANCH, 1992). Portanto, nossa proposta foi verificar a existência desse fenômeno na precipitação de PRP.

Em um estudo inicial, foram realizados dois grupos de ensaios, nos quais a concentração inicial de PRP foi 500 ou 1000 mg/L. Para cada concentração inicial, foram testadas frações volumétricas de etanol (φ) entre 44 e 56%, na presença de NaCl 200 mmol/L e $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 30 mmol/L, pH 6,0 a 25°C. Nesses ensaios, verificou-se que a redução significativa da solubilidade ocorreu na mesma faixa de concentração de etanol, entre 48 e 52%, e a concentração de PRP na fase sobrenadante foi maior nas amostras com maior concentração inicial de polissacarídeo em todas as concentrações de etanol estudadas (Figura 14). Como exemplo, a concentração de PRP solúvel foi de 217 e 318 mg/L para concentrações iniciais de PRP de 500 e 1000 mg/L, respectivamente, a 50% de etanol.

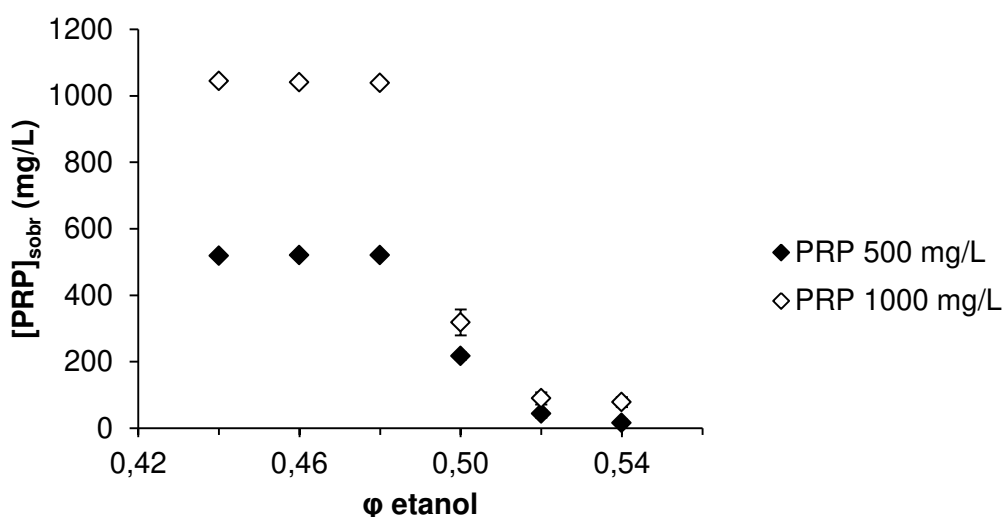


Figura 14 – Concentração de PRP na fase sobrenadante ($[\text{PRP}]_{\text{sobr}}$) em função da fração volumétrica de etanol para duas concentrações iniciais de PRP. Condições: NaCl 200 mmol/L e tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 30 mmol/L, pH 6,0 a 25°C.

Apesar de o ensaio apresentado na Figura 14 indicar que existe a influência da concentração inicial do polímero, os resultados ainda não foram conclusivos e outro experimento precisou ser conduzido para confirmá-los. Para isso, foram preparados três grupos de ensaios, de acordo com a concentração de NaCl (150, 200 ou 250 mmol/L), cada qual com quatro concentrações distintas de PRP inicial (100, 250, 600 e 1000 mg/L). Em todos os ensaios utilizou-se etanol 50% e $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 30 mmol/L, pH 6,0 a 25°C. Verificou-se que a concentração de

PRP na fase sobrenadante foi diretamente proporcional à concentração inicial de PRP, para as três concentrações salinas estudadas (Figura 15).

Verificou-se também que quanto maior a força iônica, menor é a influência da concentração inicial de PRP na solubilidade. Esses resultados foram muito semelhantes aos reportados por Shih et al. (1992) e Pinheiro et al. (2016) na precipitação de proteínas. Nesses casos, especulou-se que a diferença na solubilidade estaria relacionada à estrutura do precipitado, em que diferenças no grau de amorfia poderiam resultar em diferentes solubilidades (PINHEIRO 2016). Para verificar essa hipótese, a fase pesada proveniente de cada ensaio apresentado na Figura 15 foi analisada por microscopia ótica, assim como as condições controle, nas quais não foi adicionado PRP ao sistema.

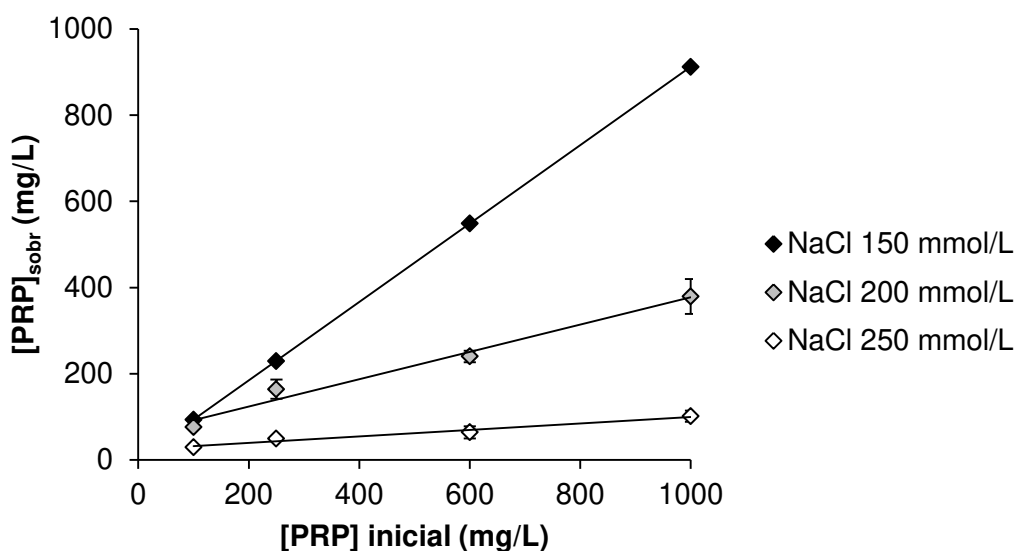


Figura 15 – Influência da concentração inicial de PRP e da força iônica na concentração de PRP fase sobrenadante. Condições: φ_{etanol} , 0,5; tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 30 mmol/L, pH 6,0; temperatura, 25°C.

De fato, as micrografias apontaram diferenças significativas na estrutura dos precipitados (Figura 16). A combinação entre baixas concentrações de PRP (≤ 250 mg/L) e baixas concentrações salinas (≤ 200 mmol/L) resultou em cristais muito pequenos, não sendo possível a diferenciação entre os ensaios e as condições controle. O efeito do aumento da concentração de PRP na estrutura dos precipitados pode ser melhor percebida nos ensaios cuja concentração de NaCl foi igual a 200 ou 250 mmol/L. Nesses casos, o aumento da concentração de PRP resultou em agregados mais ordenados. Contudo, as diferenças no tamanho e forma

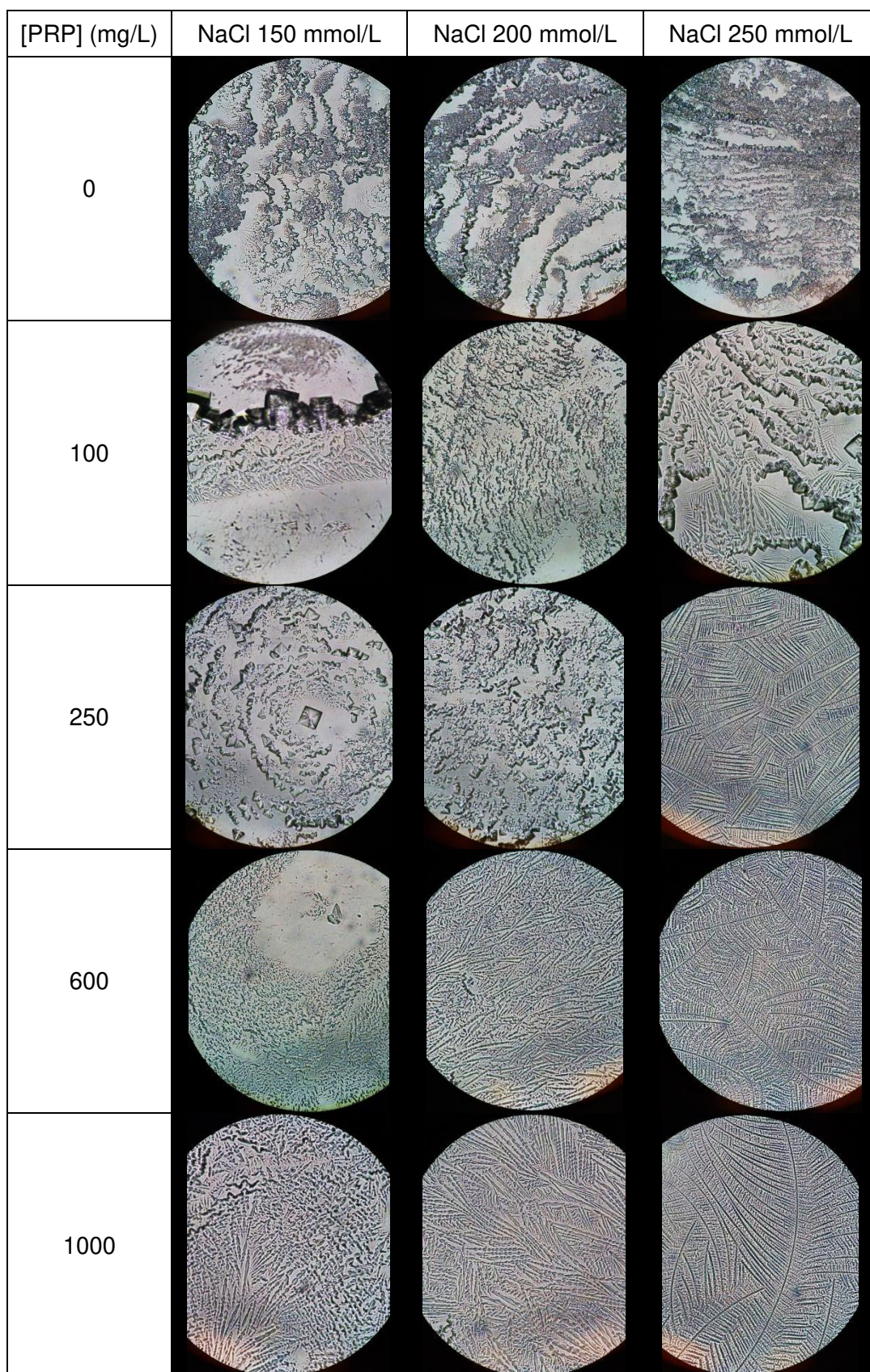


Figura 16 – Morfologia dos precipitados de PRP em função da sua concentração inicial e da concentração de NaCl do sistema. Condições: φ_{etanol} , 0,5; tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 30 mmol/L, pH 6,0; temperatura, 25°C.

dos precipitados não podem ser consideradas evidências únicas na explicação da diferença das solubilidades. O efeito da morfologia do precipitado na solubilidade do PRP será discutido posteriormente no item 4.5.

Outra hipótese para a relação observada na Figura 15 é a existência de um coeficiente de distribuição (K) entre as concentrações do polímero no sobrenadante (C_{sobr}) e no precipitado (C_{prec}) (Equação 4.1), conforme verificado por Shih et al. (1992).

$$K = \frac{C_{sobr}}{C_{prec}} \quad (4.1)$$

No caso de α -quimiotripsina, Shih e colaboradores (1992) verificaram que tanto a concentração de proteína na fase leve quanto na fase pesada são proporcionais à concentração inicial de proteína, de forma que o coeficiente de distribuição é constante. A aplicabilidade dessa hipótese à explicação do fenômeno de precipitação de PRP poderia ser verificada pela determinação do coeficiente de partição em diferentes sistemas. Para isso, experimentos complementares precisam ser realizados para a determinação do volume da fase pesada da precipitação e assim, através do balanço de massas, determinar a concentração de PRP em cada fase.

Em suma, as duas hipóteses foram consideradas adequadas para a explicação do fenômeno observado na precipitação de PRP. Contudo, as evidências experimentais apresentadas não foram suficientes para comprovação de nenhuma delas. Ensaio complementares são necessários para a elucidação inequívoca do fenômeno.

4.2. Influência do pH na solubilidade do PRP

O efeito do pH na estabilidade da dispersão de PRP foi estudada em experimentos a duas frações volumétricas de etanol (50 ou 60%) e pH (6,0 ou 7,0). Optou-se por esta faixa de pH, tendo em vista que altas alcalinidades favorecem a hidrólise do polímero (CINTRA; TAKAGI, 2015). Em cada um dos ensaios variou-se a concentração de NaCl (0 – 200 mmol/L), com o objetivo de identificar o ponto no

qual ocorre a queda da solubilidade de PRP. Em todos os ensaios a concentração inicial de PRP foi 500 mg/L e a temperatura foi 25°C.

Verificou-se que não houve grande variação na solubilidade do PRP quando o pH foi alterado de 6,0 para 7,0 (Figura 17). Isso está associado ao fato de que a dissociação completa de prótons dos grupos fosfato do polímero ocorre quando o pH do sistema encontra-se próximo de 1, resultando assim no polímero completamente carregado a pH 6 ou 7. Dessa forma, a diferença de solubilidade entre polímero protonado e desprotonado não é percebida. Diferenças expressivas foram observadas apenas nos ensaios com etanol 50%, na presença de 150 ou 200 mmol/L de NaCl. Nesses casos, a redução da solubilidade do PRP é muito sensível a pequenas variações de concentração de etanol, fato que será discutido posteriormente.

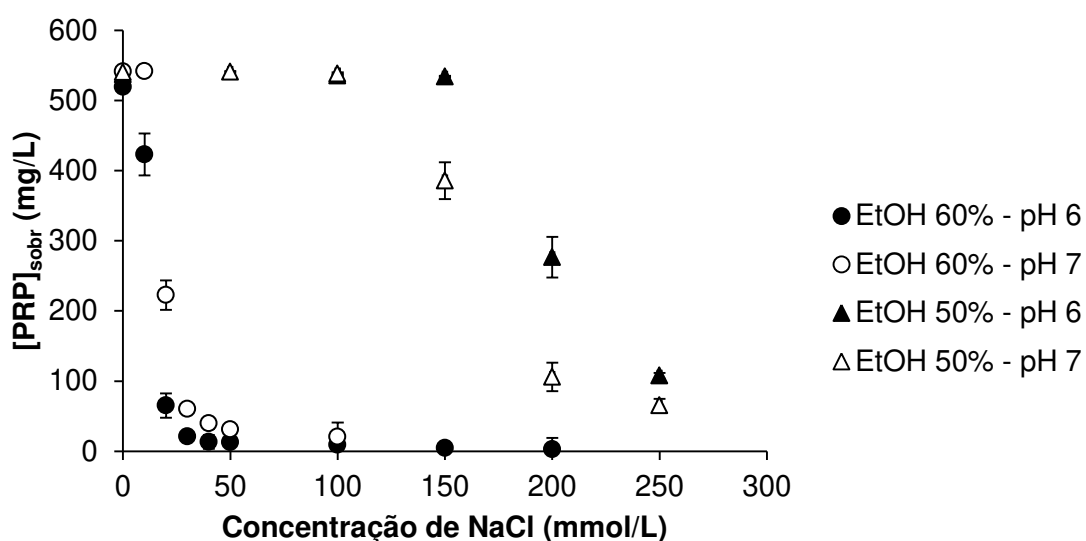


Figura 17 – Influência do pH do solvente na concentração de PRP na fase sobrenadante a 50 e 60% de etanol (v/v), em função da concentração de NaCl. Condições: [PRP] inicial, 500 mg/L; tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 30 mmol/L; temperatura, 25°C.

4.3. Influência da concentração de sais e da natureza do solvente na solubilidade do PRP

Segundo as teorias DLVO e de condensação iônica, duas das principais variáveis que determinam a estabilidade de coloides iônicos são a força iônica e a constante dielétrica do sistema. Um fator não considerado nas teorias citadas é a

especificidade de íons, descrita inicialmente por Hofmeister. No presente trabalho foi estudada a relação entre a precipitação de PRP e a concentração de NaCl, NH₄Cl e MgCl₂ em combinação com os solventes etanol, acetona e isopropanol. O objetivo dessa etapa foi verificar se as teorias DLVO e de condensação iônica se aplicam a dispersões de PRP e quais os efeitos da especificidade de íons e do solvente nestes modelos.

Os experimentos foram conduzidos para cada um dos três sais, a diferentes concentrações salinas (10, 100, 200, 50 e 1000 mmol/L). Para cada concentração, foram testadas quatro frações volumétricas (ϕ) distintas de solvente, de modo que fosse possível identificar o ponto no qual ocorre a precipitação de PRP. Em todos os ensaios a concentração de PRP foi 500 mg/L e a temperatura 25°C. Portanto, os resultados serão apresentados como fração do PRP precipitado para a normalização dos dados, visando à eliminação de pequenas variações experimentais de concentração inicial de PRP. Não foi adicionado tampão às amostras, para que não houvesse ambiguidade na interpretação dos resultados, pela presença de diversos grupos iônicos solúveis.

Inicialmente foi realizado o ensaio com NaCl na presença de etanol. Em todas as condições, a precipitação de PRP ocorreu em uma faixa estreita de concentração de solvente, em que a transição completa entre PRP totalmente solúvel e praticamente insolúvel (mais que 90% precipitado) ocorre em uma faixa menor que 10% de etanol (Figura 18).

A redução abrupta da solubilidade com o aumento da concentração de solvente orgânico também foi observada em outros sistemas de polissacarídeos carregados (GONZALES et al., 1990; SMIDSRØD; HAUG, 1967) e DNA (MEL'NIKOV et al., 1999). Esse comportamento parece estar relacionado com transição entre a predominância das forças da dupla camada elétrica para as forças de van der Waals. Segundo a teoria DLVO, a diminuição da constante dielétrica do sistema resulta em interações eletrostáticas mais fortes e conseqüente diminuição do valor de κ^{-1} , até o colapso, em que prevalecem as forças de van der Waals. Entretanto, a formulação da teoria DLVO não prevê a existência de um ponto "crítico" onde ocorre o colapso. Portanto, esse será o objeto de análises posteriores.

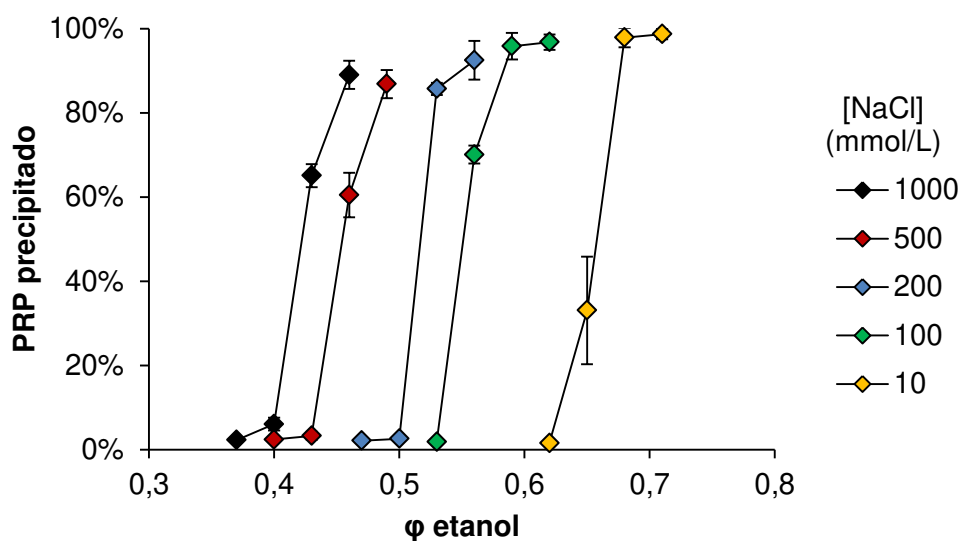


Figura 18 – Efeito da concentração de NaCl na precipitação de PRP em função da fração volumétrica de etanol. Condições: concentração de PRP inicial, 500 mg/L; temperatura, 25°C.

O ponto de colapso do PRP foi caracterizado como a combinação entre as concentrações salina e de solvente necessária para que ocorresse a sua agregação. Para tal, determinou-se para cada concentração salina a fração volumétrica crítica de solvente para que ocorresse a precipitação. Essa fração foi definida como a concentração de solvente necessária para que metade da massa de PRP fosse precipitada. Como consequência, definiu-se também uma constante dielétrica crítica (ϵ_{crit}) como a média ponderada das constantes dielétricas dos solventes que compõem o sistema. A determinação da composição do solvente no ponto em que metade da massa de PRP foi precipitada foi feita pela interpolação linear entre as condições experimentais imediatamente antes e depois desse ponto. Ou seja, foram identificadas duas condições experimentais em que: (i) menos que 50% ou (ii) mais que 50% da massa total de PRP foi precipitada. A partir das concentrações volumétricas dos solventes nesses dois pontos, é possível estimar a concentração volumétrica de solvente necessária para que ocorra a precipitação de 50% de PRP, através de interpolação linear (Seção 3.3, Equação 3.1).

Observou-se que a relação entre o logaritmo natural da concentração de NaCl (mmol/L) e o inverso da constante dielétrica crítica foi linear (Figura 19), de acordo com a observação de Smidsrød e Haug (1967) e com os dados apresentados por Garcia-Ochoa, Casas e Mohedano (1993) discutidos

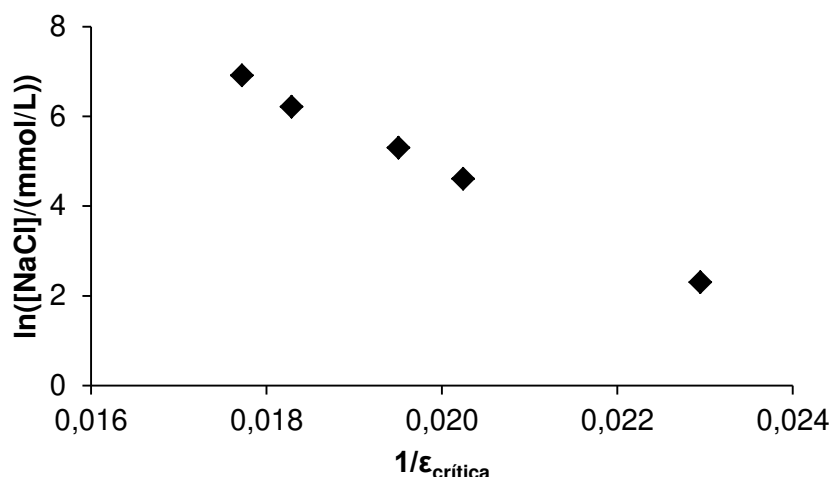


Figura 19 – Relação entre a concentração de NaCl e a constante dielétrica crítica da solução água-etanol quando 50% do PRP foi precipitado. Condições: [PRP] inicial, 500 mg/L; temperatura, 25°C.

anteriormente na seção 2.4.3. Esse resultado condiz com a formulação da teoria DLVO, em que a contribuição do solvente na estabilidade dos coloides é puramente eletrostática, não havendo qualquer interferência das outras propriedades do solvente, como a densidade molecular ou a viscosidade. Para verificar se a relação entre força iônica e $1/\epsilon_{\text{crit}}$ é a mesma para diferentes solventes e sais, foram realizados ensaios com etanol, acetona ou isopropanol, na presença de NaCl, NH_4Cl ou $MgCl_2$. O objetivo foi avaliar a influência da natureza do solvente e dos sais na precipitação de PRP.

Os resultados apontaram grandes diferenças nos perfis de precipitação com sais monovalente e divalentes (Figura 20). No caso de sais monovalentes, quanto maior a concentração salina, menor a fração volumétrica do solvente necessária para a precipitação do PRP (Figura 20a-f). Os resultados com $MgCl_2$ mostram que a concentração de solvente foi aparentemente independente da concentração salina (Figura 20g-i). Esse comportamento pode estar associado a uma condição limitante que é atingida a altas concentrações salinas, a partir da qual, o comportamento do sistema não pode mais ser descrito pelo modelo da teoria DLVO. A discussão dessa hipótese será apresentada na seção 4.4 sobre condensação iônica.

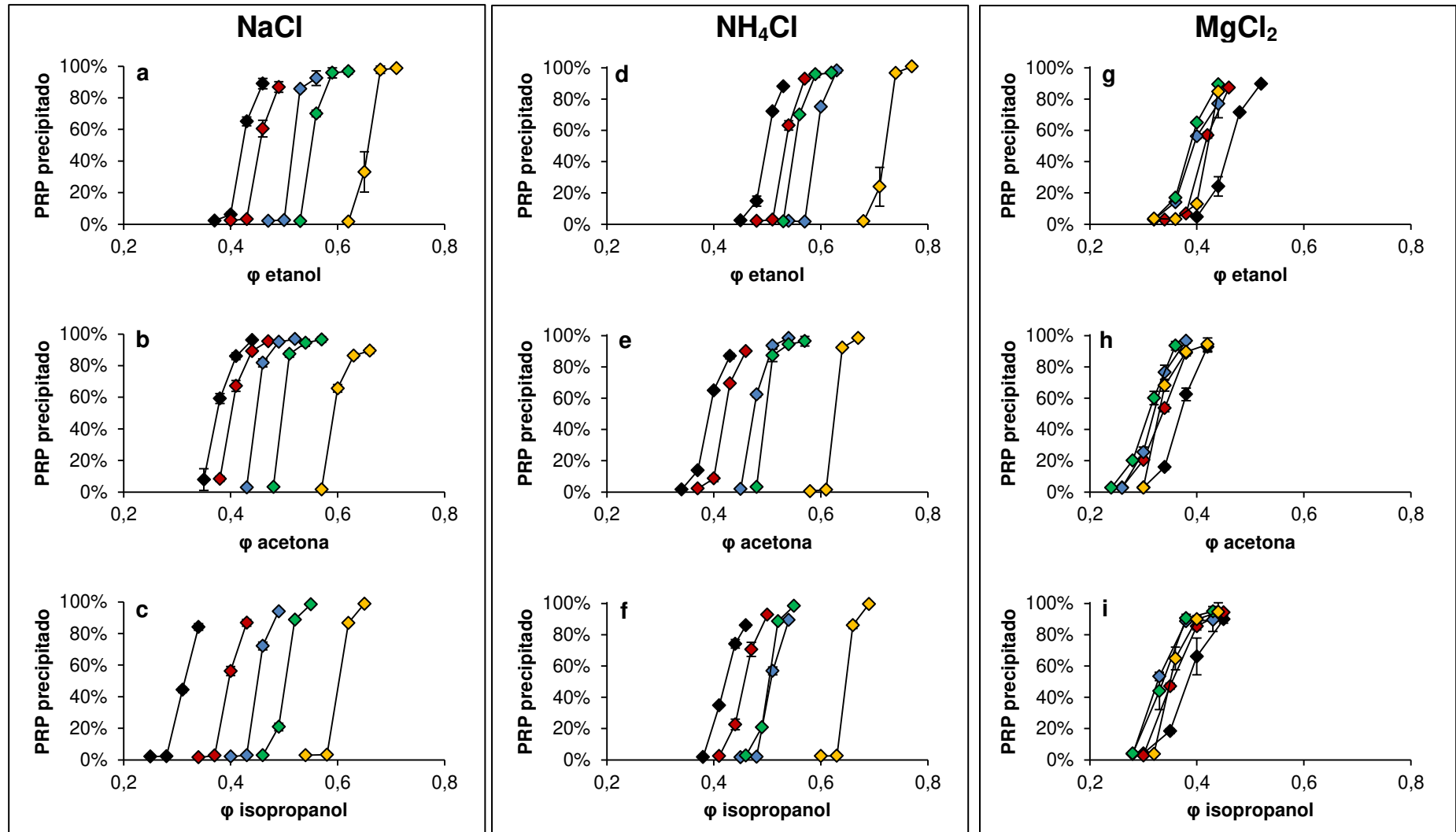


Figura 20 – Fração de PRP precipitado na presença de sais (NaCl, NH₄Cl ou MgCl₂). Concentração salina: 1000 mmol/L (◆), 500 mmol/L (◆), 200 mmol/L (◆), 100 mmol/L (◆) ou 10 mmol/L (◆). Condições: [PRP] inicial, 500 mg/L; temperatura, 25°C.

Considerando os ensaios com sais monovalentes, os valores de ϵ_{crit} foram calculados e sua relação com a concentração salina do sistema pode ser observada na Figura 21, para NaCl e NH₄Cl.

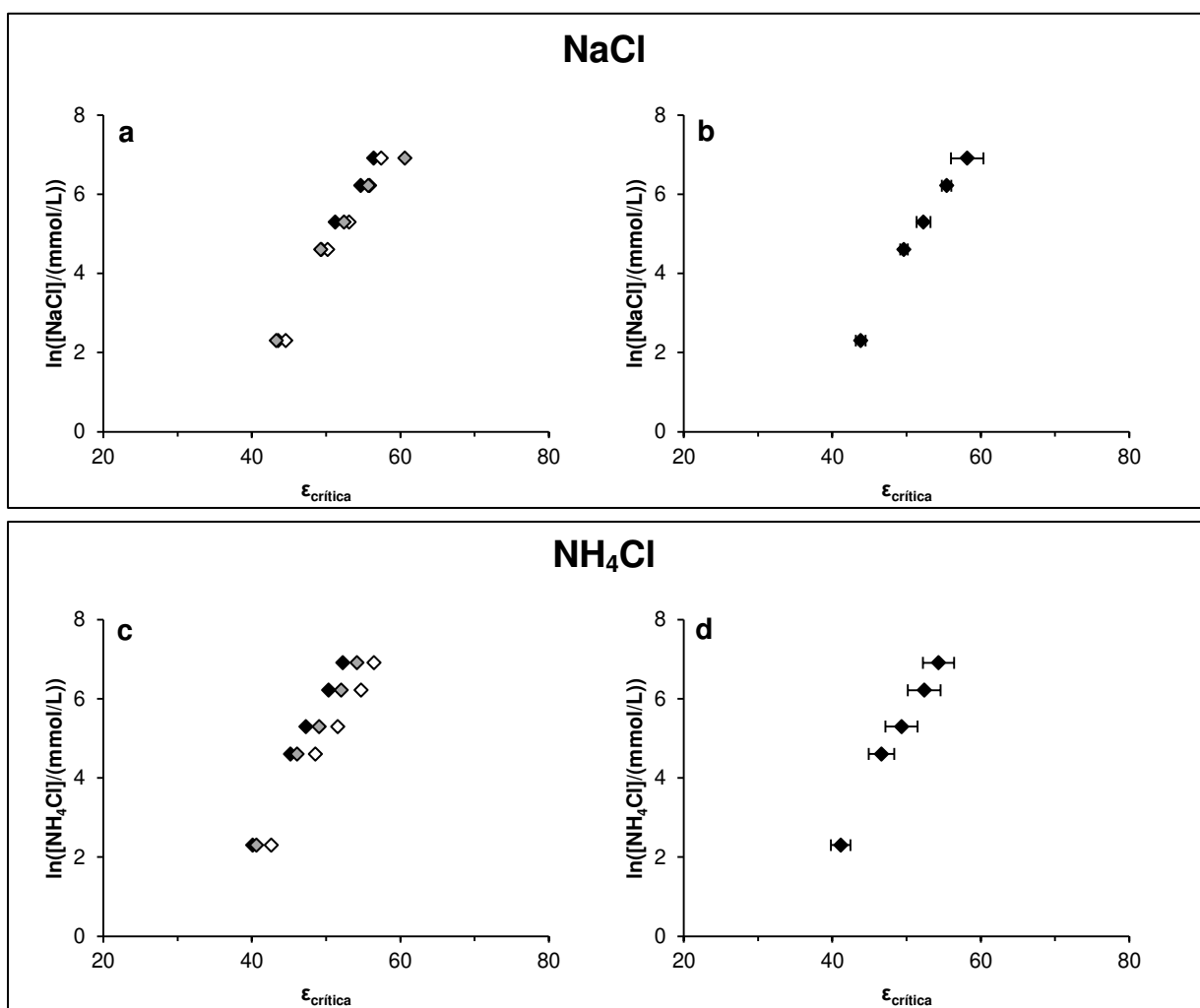


Figura 21 – Relação entre o logaritmo natural da concentração de NaCl ou NH₄Cl e ϵ_{crit} na presença de etanol (◆), acetona (◆) ou isopropanol (◇) (a, c). Valores médios para os três solventes testados (b, d)

A especificidade do solvente não foi observada no caso de NaCl, mas a precipitação de PRP na presença de NH₄Cl mostrou-se levemente dependente da natureza do solvente. Neste caso, os resultados indicam que isopropanol foi mais efetivo na redução da solubilidade de PRP, seguido por acetona e etanol (Figura 21c). É importante destacar que neste trabalho empregamos simplificações no cálculo da constante dielétrica do sistema, em que foram desconsideradas variações no volume da solução decorrentes da mistura. Relatos da literatura apontam que a

natureza do solvente praticamente não afeta seu comportamento eletrostático, como exemplificado no caso de xantana apresentado no item 2.4.3. No caso de DNA, foi verificado que não há especificidade do solvente quando são empregados álcoois ou acetona (ARSCOTT et al., 1995; MEL'NIKOV et al., 1999). Contudo, essa afirmação não pode ser generalizada, tendo em vista que os trabalhos experimentais sobre esse tema não apresentam uma análise extensiva dos solventes e também existem contraexemplos relatados que fogem a esta regra, como o caso do etileno glicol (MEL'NIKOV et al., 1999).

Como consequência dos resultados apresentados na Figura 21, a relação entre o logaritmo natural da concentração salina e o inverso de ε_{crit} também é linear. Essa constatação experimental corrobora a hipótese de que a precipitação de PRP ocorre devido ao balanço de forças eletrostáticas de longo alcance que atuam sobre cada molécula de PRP, de acordo com a teoria DLVO. Além disso, a relação entre as variáveis reflete a validade de duas simplificações feitas para a análise dos sistemas: (a) a constante dielétrica pode ser considerada contínua e independente da concentração salina; (b) ε_{crit} é um parâmetro adequado para caracterização do ponto de agregação das partículas.

A maior diferença observada entre os resultados com NaCl e NH₄Cl é a maior influência da natureza do solvente nos ensaios com o sal de amônio. Isso pode estar relacionado com o maior tamanho do contraíon (NH₄⁺), a sua maior densidade de cargas ou a existência de ligações sítio-específicas com a cadeia de PRP. O efeito da especificidade de íons na solubilidade de PRP será abordado com mais detalhes posteriormente, na seção 4.6.

A precipitação de PRP na presença de MgCl₂ resultou em um perfil distinto da relação entre concentração salina e ε_{crit} , quando comparado com NaCl ou NH₄Cl. Nos ensaios utilizando etanol, acetona ou isopropanol como antissolventes, não foi observada a relação linear entre o logaritmo natural da concentração de MgCl₂ e ε_{crit} (Figura 22). Apenas a partir de 100 mmol/L foi verificado que o decréscimo da concentração salina resultou também na queda de ε_{crit} . Uma possível explicação é que nas condições dos ensaios foi atingida uma condição limitante de alta concentração salina, onde não é possível descrever o comportamento do sistema através da teoria DLVO. É importante destacar que na presença de NaCl ou NH₄Cl, mesmo a forças iônicas iguais 1 mol/L, não foram

observadas variações em relação ao comportamento teórico. Contudo a teoria de Debye-Hückel indica que a repulsão entre cargas só pode ser corretamente calculada para sistemas muito diluídos, nos quais a força iônica não ultrapasse 100 mmol/L. Portanto, propomos a complementação do modelo visto até agora com a teoria da condensação iônica de Manning, com o intuito de compreender as condições limitantes do sistema. Além disso, pretendemos explicar a existência do ponto crítico de agregação das partículas.

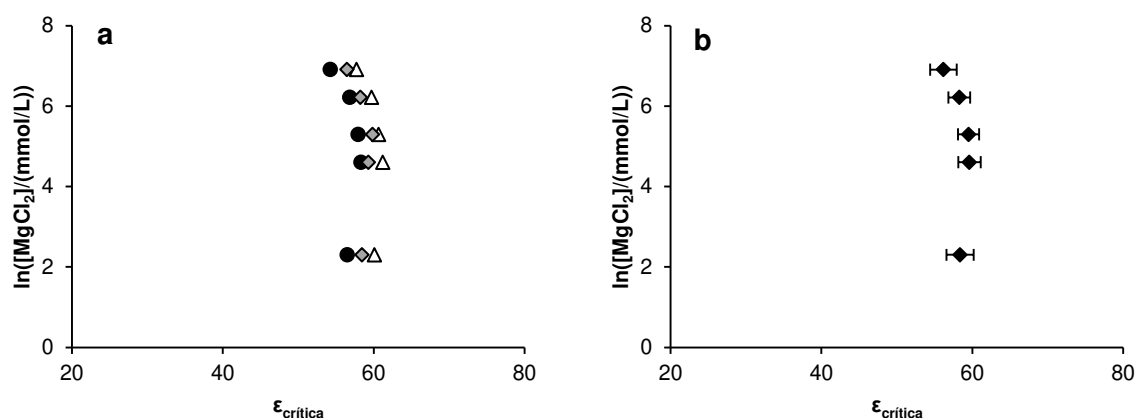


Figura 22 – Relação entre o logaritmo natural da concentração de $MgCl_2$ e ϵ_{crit} na presença de etanol (◆), acetona (◇) ou isopropanol (◊) (a). Valores médios (b).

4.4. Condensação iônica na precipitação de PRP

O fenômeno de condensação iônica em polieletrólitos pode ser descrito matematicamente através do modelo proposto por Manning (MANNING, 1978), conforme descrito no item 2.2.1. Segundo esse modelo, os polieletrólitos são caracterizados pela distância média, b , entre os seus grupos carregados. Esse parâmetro é combinado à teoria de Debye-Hückel, resultando em um parâmetro adimensional, ξ , que é inversamente proporcional à constante dielétrica do sistema e à distância b (Equação 4.2):

$$\xi = \frac{q^2}{4\pi \epsilon \epsilon_0 k T b} \quad (4.2)$$

A interação entre grupos iônicos é determinada pela extensão das duplas camadas elétricas, que são caracterizadas pelo comprimento de Debye, κ^{-1} . Segundo esse modelo, os contraíons de valência N não estão ligados diretamente

aos grupos iônicos do polieletrólito, mas circulam livremente em uma região próxima a este, denominada V_p (Equação 4.3) (MANNING, 1978):

$$V_p = 4\pi e L_a N' v^{-1} (v + v') (\xi - N^{-1}) b^3 \quad (4.3)$$

Nesse sistema, o equilíbrio é atingido pela minimização da energia livre através da redução da entalpia e aumento da entropia. Segundo Manning (1978), esse fenômeno pode ser descrito pela Equação 4.4, através da qual se pode determinar a fração de contraíons de carga N , associados a cada grupo carregado do polieletrólito, θ_N :

$$1 + \ln\left(\frac{10^3 \theta_N}{V_p (C_N - \theta_N C_p)}\right) = -2 N \xi (1 - N \theta_N) \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (4.4)$$

Finalmente, é possível calcular a fração do polieletrólito neutralizado, θ_p , através da Equação 4.5:

$$\theta_p = N \theta_N \quad (4.5)$$

Como consequência da formulação teórica, as principais variáveis que regem a condensação iônica são a força iônica e a constante dielétrica do sistema, semelhante à formulação da teoria DLVO. Experimentalmente, essas variáveis são manipuladas pela adição de sais ao sistema e pela alteração da composição do solvente.

Diversos estudos com DNA relatam que a alteração da estrutura tridimensional e a consequente agregação das moléculas ocorrem em sistemas onde a fração do polímero neutralizado é constante, independente da concentração salina, fração volumétrica ou natureza do solvente utilizado (ARSCOTT et al., 1995; BLOOMFIELD; MA; ARSCOTT, 1993; FLOCK; LABARBE; HOUSIER, 1996).

Nesse trabalho, os ensaios conduzidos anteriormente nos fornecem dados importantes no cálculo da fração de polímero neutralizado no momento da precipitação – concentração salina e ε_{crit} . Contudo, o cálculo de θ_p necessita ainda do parâmetro b , indisponível na literatura para o PRP. Para a simplificação dos cálculos e análise, a partir de agora utilizaremos apenas os dados experimentais de precipitação de PRP com etanol, na presença de NaCl ou MgCl₂. Em uma etapa inicial, analisaremos os valores de ε_{crit} para cada concentração de NaCl (

Tabela 14), já apresentados anteriormente em formato gráfico, na Figura 21a.

Tabela 14 – Valores de ϵ_{crit} observados na precipitação de PRP com etanol em função da concentração de NaCl.

NaCl (mmol/L)	ϵ_{crit}
1000	56,44
500	54,68
200	51,27
100	49,41
10	43,58

Através das Equações 4.2 a 4.5, foram calculados os valores de θ_p (Figura 23) e de κb (Figura 26) para cada condição experimental apresentado na

Tabela 14 em função de valores hipotéticos de b , escolhidos de acordo com valores típicos apresentados anteriormente na Tabela 3 da seção 2.2.2.

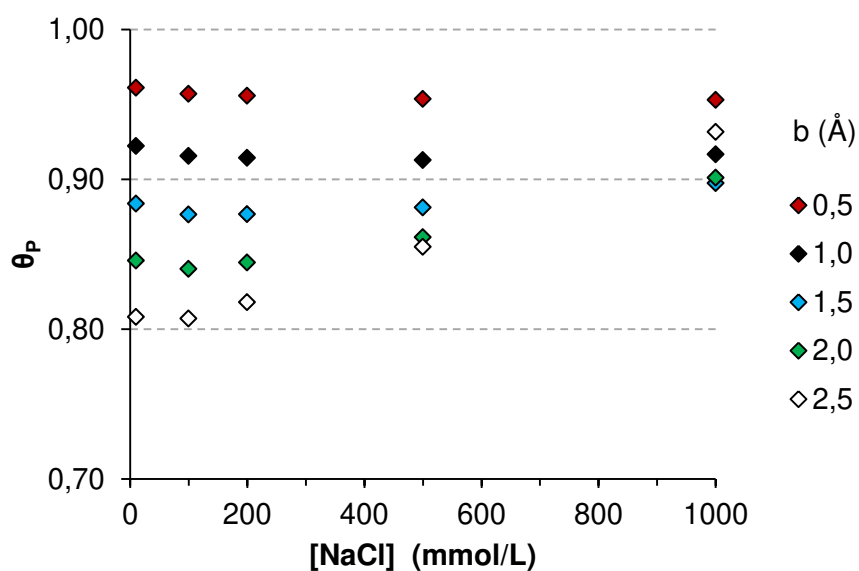


Figura 23 – Fração neutralizada do PRP, θ_p , em função da concentração de NaCl e da distância entre grupos fosfato do PRP, b .

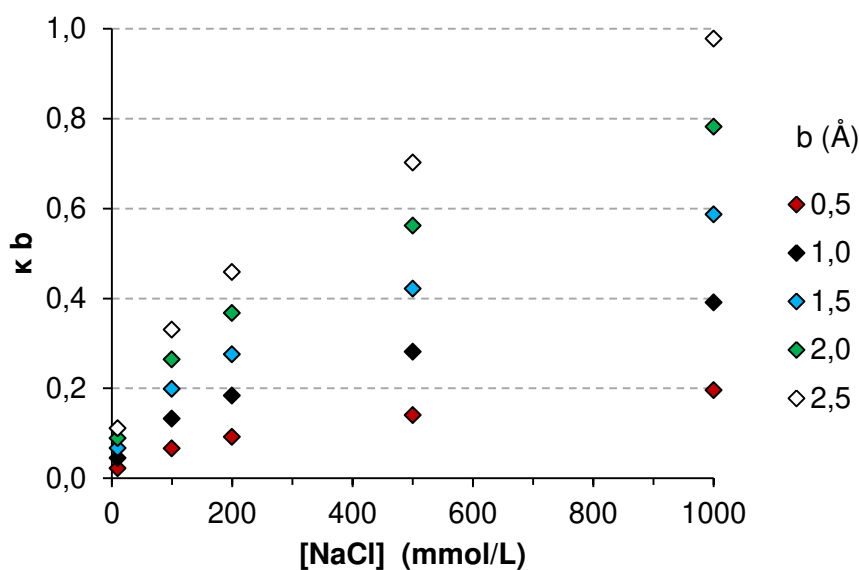


Figura 24 – Parâmetro adimensional, κb , em função da concentração de NaCl e da distância entre grupos fosfato do PRP, b .

É possível perceber que menores valores de b resultam em um mesmo valor de θ_p , fato que está plenamente de acordo com a hipótese de que existe uma fração mínima de grupos carregados que precisam estar neutralizados para que a precipitação ocorra (ARSCOTT et al., 1995; FLOCK; LABARBE; HOUSIER, 1996). Considerando a média de θ_p entre as condições experimentais (Tabela 15), verifica-se que o seu desvio cresce rapidamente com o aumento da distância hipotética b .

Tabela 15 – Fração neutralizada média do polímero, θ_p , calculadas em função dos dados experimentais e da distância b entre grupos fosfato do PRP.

b (Å)	θ_p média
0,5	$0,9562 \pm 0,0032$
1,0	$0,9164 \pm 0,0036$
1,5	$0,8833 \pm 0,0086$
2,0	$0,8587 \pm 0,0251$
2,5	$0,8440 \pm 0,0527$

Considerando que os ensaios de precipitação de PRP na presença de NaCl e etanol resultaram em uma correlação linear entre o logaritmo natural da concentração de NaCl e a constante dielétrica do solvente, supomos que os ensaios em questão encontram-se dentro das condições limitantes da condensação iônica.

Segundo Manning e Ray (1998), a extensão da condensação iônica pode ser corretamente calculada quando o valor de κb é menor do que a unidade. Nessa condição, existe a sobreposição dos campos elétricos gerados por grupos carregados vizinhos do PRP, que exercem influência eletrostática sobre cada contraíon. Valores de κb maiores que 1 significam que a extensão da dupla camada elétrica é da mesma ordem de grandeza que a distância entre os grupos carregados do PRP e podem haver interações sítio específicas entre esses grupos e os contraíons.

Na precipitação de PRP com NaCl e etanol, considerando valores de b menores do que 2,5 Å, todos os ensaios citados apresentaram valores de κb menores do que 1 (Figura 24). Portanto, assumindo a premissa de que a distância b é constante para todas as condições experimentais e que a precipitação deve ocorrer a uma fração constante do polímero neutralizado, pode-se especular uma faixa de valores de b , tal que os dados experimentais sejam condizentes com a teoria, considerando uma variância definida. Neste trabalho assumiremos um desvio de 3%, estabelecido pela análise dos resultados experimentais, apresentados na Figura 23. Dessa forma, temos que a distância b do PRP deve ser menor ou igual a 2 Å, conforme os dados apresentados na Tabela 15.

A teoria da condensação iônica é aplicável a contraíons de diferentes valências, desde que não existam interações sítio específicas entre o polieletrólito e os contraíons. Portanto, decidimos analisar os dados experimentais de precipitação de PRP na presença de MgCl₂ e etanol. Nossos resultados apontam que, para as concentrações de MgCl₂ testadas, não existe uma relação definida entre concentração de sal e a constante dielétrica do sistema, como verificado para NaCl e NH₄Cl (Figura 20). Nesses casos os valores de $\varepsilon_{crít}$ só apresentaram a relação esperada com a concentração salina quando esta foi menor ou igual a 100 mmol/L, na qual menores concentrações de MgCl₂ resultaram em menores valores de $\varepsilon_{crít}$ (Tabela 16). Esse comportamento provavelmente está associado à existência de um limite de condensação, em que a partir de uma determinada concentração salina a fração de cargas do polieletrólito permanece constante (FLOCK; LABARBE; HOUSSIER, 1996).

Tabela 16 – Valores de ε_{crit} observados na precipitação de PRP com etanol em função da concentração de $MgCl_2$.

$MgCl_2$ (mmol/L)	ε_{crit}
1000	54,29
500	56,87
200	57,98
100	58,34
10	56,34

É importante destacar que a análise teórica e manipulação dos dados que segue só se fez necessária para a comparação dos dados com NaCl e $MgCl_2$, tendo em vista que nem todas as concentrações de $MgCl_2$ testadas encontraram-se dentro das condições limitantes do modelo de condensação iônica. Uma abordagem mais precisa para a determinação da fração de cargas neutralizadas do PRP na presença de $MgCl_2$ seria conduzir ensaios a diferentes concentrações salinas, que se encontram dentro da condição limitante, como foi realizado com NaCl.

No caso da precipitação de PRP com $MgCl_2$ e etanol, os valores de θ_p (Figura 25) e κb (Figura 26) foram calculados a partir dos dados apresentados na Tabela 16.

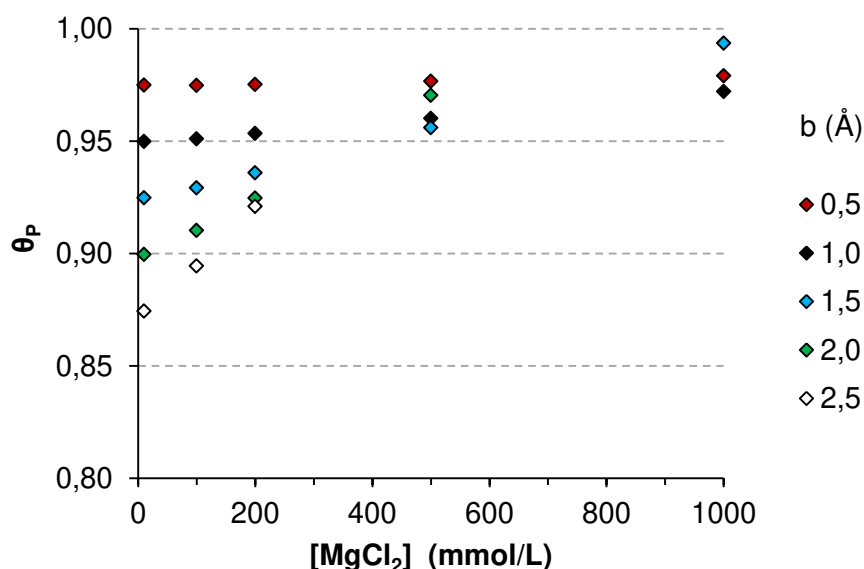


Figura 25 – Fração neutralizada do PRP, θ_p , em função da concentração de $MgCl_2$ e da distância entre grupos fosfato do PRP, b .

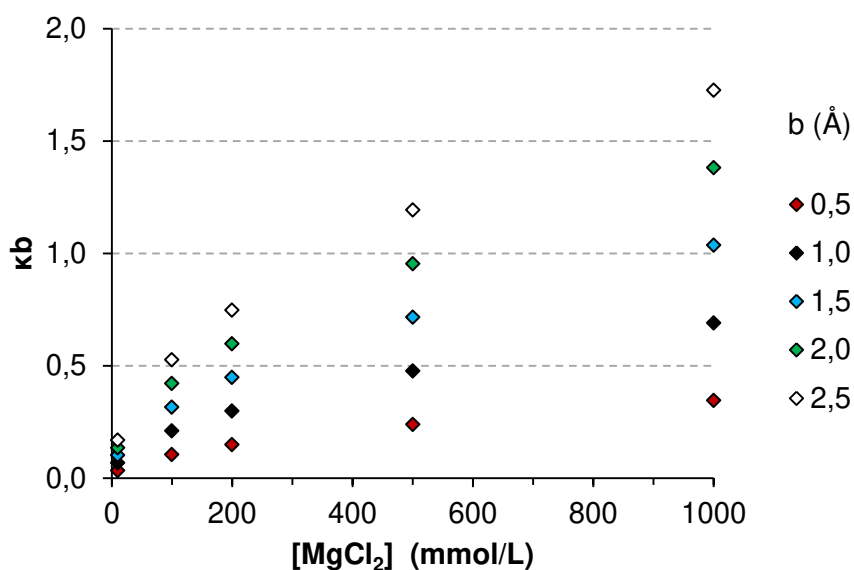


Figura 26 – Parâmetro adimensional, κb , em função da concentração de MgCl_2 e da distância entre grupos fosfato do PRP, b .

O perfil de valores de θ_p e sua relação com o aumento da distância b foram semelhantes aos ensaios com NaCl. Em ambos os casos a convergência para um mesmo valor de θ_p só ocorreu a menores valores de b (Figura 25). Contudo, no caso de MgCl_2 esperava-se a divergência nos resultados a partir de concentrações maiores que 100 mmol/L, conforme discutido anteriormente. Sendo assim, considerando a máxima distância b definida anteriormente igual a 2 Å, temos que a divergência ocorre quando κb é maior do que aproximadamente 0,5 (Figura 26), ou seja, foi estabelecida uma distância b máxima (2 Å) de acordo com os resultados com NaCl e etanol e uma concentração salina máxima (100 mmol/L), com base na relação entre a concentração de MgCl_2 e $\epsilon_{\text{crít}}$. O valor de κb do sistema foi então calculado e considerado como uma nova condição limitante, com o intuito de se ter um parâmetro quantitativo para comparar os resultados dos experimentos de precipitação de PRP com NaCl e MgCl_2 .

Os dados de precipitação de PRP apresentados nas Figuras 23 e 25 foram então selecionados de modo a satisfazer as Inequações 4.6 e 4.7. As médias dos valores de θ_p para cada distância b são apresentadas na Figura 27.

$$b \leq 2\text{Å} \quad (4.6)$$

$$\kappa b \leq 0,5 \quad (4.7)$$

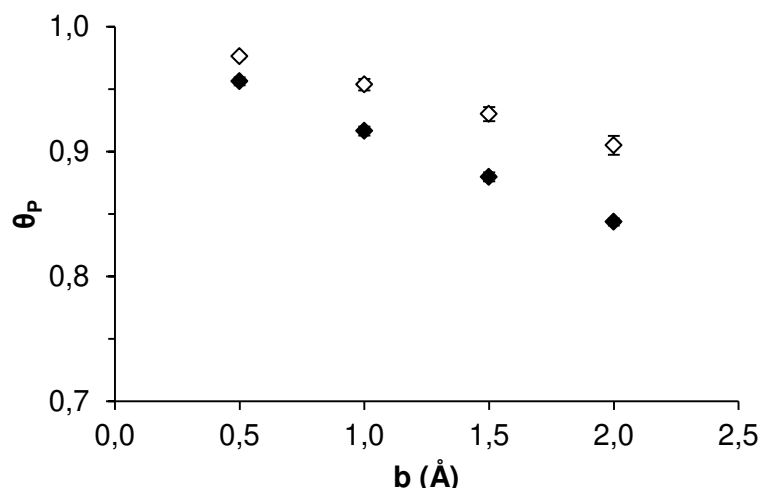


Figura 27 – Valores médios de θ_p calculados a partir das condições experimentais que satisfazem a restrição $\kappa b \leq 0,5$. NaCl (◆), MgCl₂ (◇).

Considerando diferentes valores possíveis de b , é possível verificar que independente do sal utilizado, a variação de θ_p foi muito pequena. No caso de NaCl, foram empregados de três a quatro pontos experimentais para calcular o valor médio de θ_p , enquanto que para MgCl₂, foram apenas dois ou três pontos. Portanto, podemos afirmar que independente da distância b considerada, a precipitação de PRP ocorreu quando uma fração determinada de PRP foi neutralizado. Também foi observada diferenças entre os valores de θ_p calculados a partir de NaCl ou MgCl, devido ao número reduzido de ensaios para o sal de magnésio.

Um fato que merece destaque é que assumindo distâncias entre grupos fosfato entre 1 e 1,5 Å, os valores de θ_p calculados a partir dos dados experimentais com NaCl estão entre 92% e 88%, valores muito próximos aos observados na precipitação de DNA (ARSCOTT et al., 1995; BLOOMFIELD; MA; ARSCOTT, 1993; FLOCK; LABARBE; HOUSSIER, 1996). A confirmação das previsões e a determinação de θ_p para a precipitação de PRP de maneira mais precisa poderá ser feita por meio da verificação da distância média entre os grupos fosfato da molécula.

4.5. Influência da concentração de NaCl e da natureza do solvente na morfologia do precipitado

Os resultados apresentados até esse ponto suportam a teoria de que a precipitação de PRP ocorre devido ao balanço de forças eletrostáticas no sistema e

à neutralização dos grupos fosfato do polímero. A extensão da neutralização é função, principalmente, de duas variáveis: força iônica e constante dielétrica. A modelagem matemática do fenômeno e os resultados experimentais indicam que existe uma relação bem definida entre essas variáveis, na qual ocorre a precipitação do PRP. Apesar de termos verificado anteriormente que a morfologia do precipitado é sensível à concentração inicial do PRP (Seção 4.1), o efeito da concentração salina e da natureza do solvente na morfologia do precipitado ainda é desconhecido. Portanto, abordaremos essas questões a seguir.

Em um primeiro ensaio foi estudado o efeito da natureza do solvente em sistemas com concentrações salinas e constantes dielétricas definidas. Para isso foram adicionadas diferentes frações volumétricas de cada solvente (etanol, acetona ou isopropanol), de modo a se atingir a constante dielétrica igual a 50. Em todos os ensaios a concentração inicial de PRP foi 500 mg/L e a concentração de NaCl foi 500 mmol/L. A alteração do solvente resultou em diferenças significativas quanto à disposição e ao tamanho dos cristais (Figura 28).

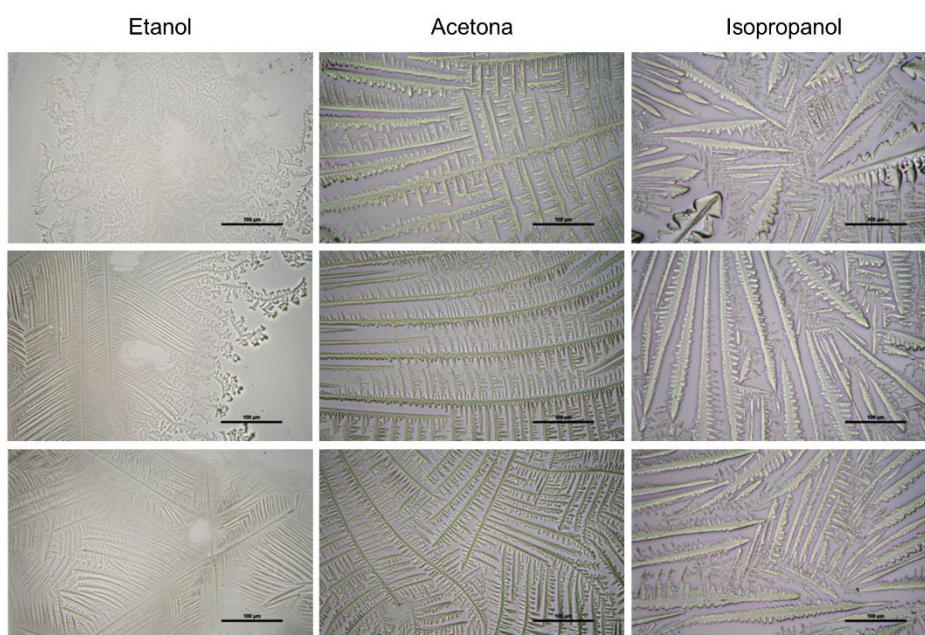


Figura 28 – Efeito da natureza do solvente na morfologia dos precipitados de PRP. Precipitação com etanol, acetona ou isopropanol: ϵ , 50, NaCl, 500 mmol/L. Imagens na mesma linha foram obtidas da mesma amostra.

Entretanto, os ensaios foram realizados em condições de mesma solubilidade do polímero, devido à mesma constante dielétrica e força iônica do sistema. Portanto, não há evidências de que diferenças na morfologia do precipitado

resultem em diferenças na solubilidade, conforme sugerido por Pinheiro et al. (2016) e discutido anteriormente na seção 4.1. Os agregados de PRP em meio contendo etanol apresentaram-se mais compactos e com estrutura mais ordenada do que os outros solventes. O tamanho dessas estruturas, contudo, foi o menor em comparação com os dois outros solventes. Os agregados em meio com acetona também se apresentaram altamente ordenados, com tamanho visivelmente maior do que aqueles em meio contendo etanol. Dos três solventes testados, o meio contendo isopropanol resultou em estruturas com a menor organização e com maior tamanho. As diferenças relacionadas ao tamanho e compactação estão relacionadas à sua taxa de nucleação e crescimento, que por sua vez dependem natureza do solvente. A contribuição específica do solvente envolve parâmetros como viscosidade, densidade molecular, difusividade e propriedades de transferência de massa e calor (MYERSON, 2002).

O segundo experimento teve como objetivo avaliar o efeito da concentração salina na precipitação de PRP. Para isso, foram testados diferentes sistemas com PRP a 500 mg/L e etanol, de forma a atingir o valor de ε igual a 45. As concentrações de NaCl testadas foram 10, 50, 100, 200 e 500 mmol/L. Assim como no experimento anterior, a análise das micrografias apontam para grandes diferenças na estrutura do precipitado (Figura 29). Maiores concentrações de NaCl resultaram em agregados significativamente maiores, enquanto que menores concentrações de sal resultaram em estruturas mais compactas, em que a distância entre elas é reduzida. Esse fato não condiz com o comportamento teórico esperado, pelo qual maiores supersaturações resultam em maior número de núcleos, que resultam em agregados de menor tamanho (MYERSON, 2002).

Outra observação que merece destaque é que os agregados do sistema com NaCl 500 mmol/L apresentam uma estrutura muito semelhante à condição com menor concentração salina. Esse comportamento é característico de fractais, em que as estruturas formadas são semelhantes em qualquer escala observada. De fato, é reconhecido que coloides podem agregar em estruturas semelhantes a fractais (LAZZARI et al., 2016), passíveis de ser identificadas por diferentes técnicas, como microscopia, reologia ou espalhamento de luz. Esse fato abre uma gama de possibilidades de análise de polissacarídeos carregados, como o PRP, pela análise do efeito das variáveis do sistema na dimensão fractal das partículas. Inclusive, a

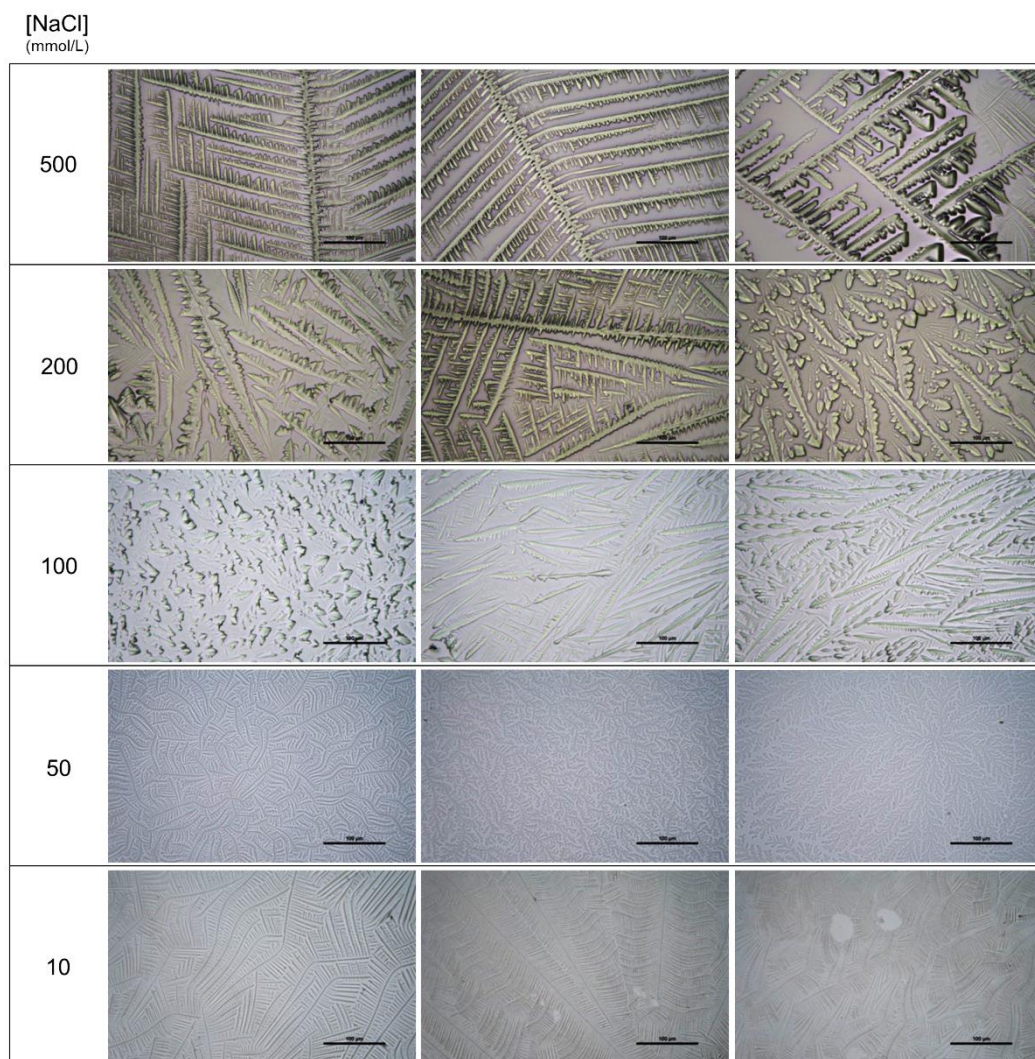


Figura 29 – Efeito da concentração de NaCl na morfologia dos precipitados de PRP. Precipitação com etanol a ϵ igual a 45. Imagens na mesma linha foram obtidas da mesma amostra. Barras pretas indicam o comprimento igual a 100 μm .

análise de fractais de coloides possibilita também o estudo de sistemas em equilíbrio cinético, mas não termodinâmico, como é o caso de sistemas coloidais que se encontram na região metaestável, caracterizada pelo mínimo secundário de força DLVO, conforme apresentado anteriormente na Figura 5 da seção 2.1.1.3.

4.6. Influência da natureza dos cátions na solubilidade do PRP

A agregação de coloides iônicos carregados depende em grande parte da força iônica da solução e da valência dos compostos iônicos, conforme considerado

na teoria DLVO, mas também da natureza dos compostos iônicos solúveis, conforme relatado inicialmente por Hofmeister. O efeito do tipo de sal, mais especificamente da natureza do grupo catiônico, na precipitação de PRP foi estudada através de cinco grupos de ensaios, cada qual na presença de 200 mmol/L de diferentes sais de cloro (CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , NaCl e NH_4Cl), visando eliminar a influência do ânion na interpretação dos dados. Para cada sal, foram testadas diferentes concentrações de etanol, de modo a identificar o ponto em que ocorre a precipitação do polímero. Em todos os ensaios a concentração inicial de PRP foi 500 mg/L e a temperatura 25°C. Não foi adicionado tampão aos sistemas.

Verificou-se que a natureza dos cátions presentes em solução alterou consideravelmente a concentração crítica de etanol necessária para a precipitação de PRP (Figura 30).

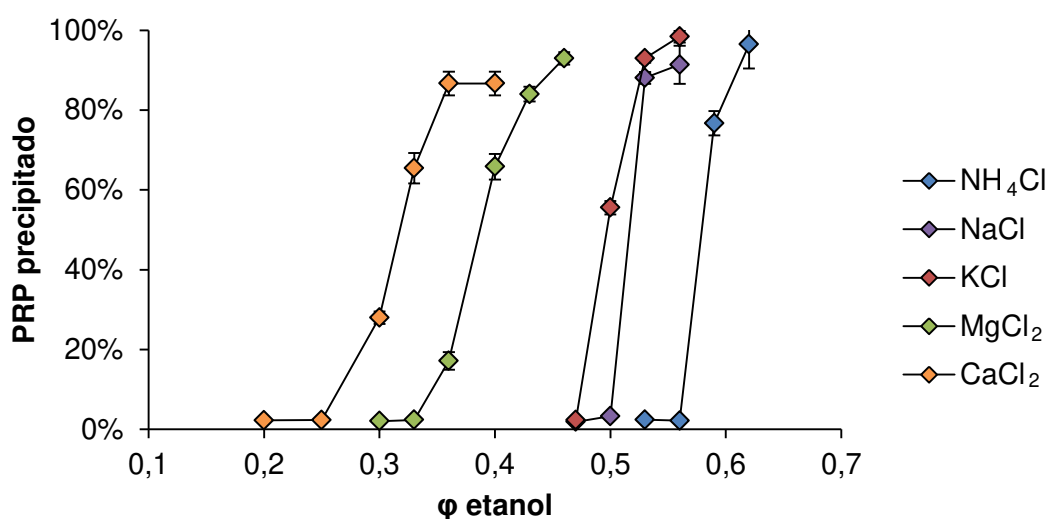
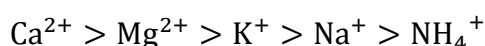


Figura 30 – Efeito de diferentes sais de cloro na precipitação de PRP em função da fração volumétrica de etanol. Condições: Concentração de PRP inicial, 500 mg/L; concentração salina, 200 mmol/L; temperatura, 25°C.

A ordem de efetividade dos sais foi idêntica à apresentada por alguns autores que estudaram a precipitação de outros polissacarídeos carregados (GUO et al., 2016; SMIDSRØD; HAUG, 1967) e condiz com a série liotrópica, conforme segue:



Apesar de as variáveis raio iônico e densidade de carga influenciarem o nível de interação entre os grupos fosfato do PRP e os cátions, não foi observada uma relação direta entre essas propriedades e a efetividade dos cátions em promover a agregação do polímero (Tabela 17). De fato, outros parâmetros são essenciais na determinação da série liotrópica, como estrutura da água e potenciais de dispersão iônicos, mas ainda não se sabe a relação entre essas variáveis (BOSTRÖM; WILLIAMS; NINHAM, 2004).

Tabela 17 – Características relevantes dos grupos iônicos para o estudo da efetividade de íons na precipitação de PRP: raio iônico (MARCUS, 1988; SIDEY, 2016) e densidade de cargas (valência/raio iônico).

Grupo iônico	Raio iônico (Å)	Densidade de cargas
Ca ²⁺	1,03	1,94
Mg ²⁺	0,70	2,86
K ⁺	1,41	0,71
Na ⁺	0,97	1,03
NH ₄ ⁺	1,48	0,68

É importante destacar que as aplicações da série liotrópica geralmente envolvem fenômenos em ambientes aquosos em concentrações salinas elevadas, como no caso de *salting-out* de proteínas. Os dados apresentados indicam que a série liotrópica permanece inalterada mesmo para ambientes não aquosos, nos quais as propriedades eletrostáticas do meio são completamente diferentes de ambientes aquosos. Em sistemas com menores constantes dielétricas a interação entre íons ocorre mesmo a baixas concentrações iônicas, devido ao maior alcance das forças eletrostáticas.

Outra observação relevante é a diferença entre os perfis de queda de solubilidade para sais divalentes e monovalentes (Figura 30). Na presença de sais de cálcio e magnésio a queda na solubilidade foi mais suave, enquanto que sais monovalentes favoreceram a queda abrupta da solubilidade com o aumento da concentração de etanol. Esse fenômeno pode estar relacionado com o tamanho e a hidratação dos íons e contraíons, conforme a teoria proposta por Collins (2004).

Nessa teoria, o autor classifica íons pela “força” de interação com a água, através de medidas de eluição em cromatografia de permeação em gel e de parâmetros de viscosidade. Utilizando o segundo critério como referência, a viscosidade da solução salina pode ser descrita pela Equação (4.6) (COLLINS, 2004).

$$\eta/\eta_0 = 1 + Ac^{1/2} + Bc \quad (4.6)$$

em que η é a viscosidade da solução salina, η_0 é a viscosidade da água, c é a concentração salina, A é uma constante eletrostática e B é o coeficiente de viscosidade de Jones-Dole, que mede diretamente a força da ligação íon-água em relação a ligação água-água (COLLINS, 2004). Valores positivos de B indicam que a ligação íon-água é favorecida em relação à ligação água-água e os íons são, portanto, fortemente hidratados (cosmotrópicos). Valores negativos, por sua vez, são característicos de compostos fracamente hidratados (caotrópicos). Com base nessas definições, a teoria de Collins propõe que a ligação forte entre dois grupos carregados se dá preferencialmente se ambos forem caotrópicos ou cosmotrópicos.

Aplicando-se os conceitos de afinidade de ligação com a água para os grupos estudados (Tabela 18), verifica-se que o grupo fosfato apresenta o maior coeficiente B de viscosidade, o que significa que este grupo é fortemente hidratado.

Tabela 18 – Coeficientes B de viscosidade de Jones-Dole (COLLINS, 2004) dos grupos iônicos aqui estudados.

Grupo iônico	B
Ca ²⁺	0,285
Mg ²⁺	0,385
K ⁺	-0,007
Na ⁺	0,086
NH ₄ ⁺	-0,007
PO ₄ ³⁻	0,590
Cl ⁻	-0,007

De fato, grupos PO₄³⁻ possuem de 6 a 18 moléculas de água ligadas a sua estrutura (MARCUS, 1988). Dessa forma, espera-se que os grupos fosfato do PRP formem

ligações fortes com cátions cosmotrópicos, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , e ligações fracas com cátions caotrópicos, como K^+ e NH_4^+ . O perfil de precipitação observado para PRP pode ser uma consequência direta desse fenômeno. No caso do íon Na^+ , apesar de seu coeficiente B de viscosidade ser positivo, seu comportamento foi semelhante aos cátions caotrópicos, fato que pode estar relacionado com a composição do solvente, divergindo assim do comportamento teórico para soluções aquosas.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

O estudo da precipitação de PRP na presença de sais e solventes foi valioso no entendimento do mecanismo que rege esse fenômeno. Foi possível identificar a relação entre as principais variáveis do sistema – força iônica e constante dielétrica – por meio da aplicação da teoria DLVO. Além disso, os resultados indicam que a extensão e o modo que os contraíons se ligam aos grupos carregados do PRP podem ser preditos pela teoria da condensação iônica. As principais conclusões deste trabalho foram:

- (i) A relação entre o logaritmo da concentração de NaCl ou NH_4Cl e o inverso da constante dielétrica crítica do sistema foi linear, indicando que estas são as principais variáveis envolvidas no balanço de forças eletrostáticas do sistema segundo a teoria DLVO.
- (ii) A relação entre concentração salina e a constante dielétrica é praticamente independente da natureza dos solventes estudados (etanol, acetona e isopropanol). Contudo, a alteração do solvente do sistema resultou em morfologias distintas do precipitado, o que evidencia sua importância na cinética do processo.
- (iii) Em todos os ensaios observou-se a queda abrupta da solubilidade de PRP em função do aumento da constante dielétrica do sistema. Supomos que esse comportamento está associado à minimização da energia livre do sistema, segundo a teoria da condensação iônica. Como consequência, a agregação do PRP ocorre a uma determinada fração de grupos fosfato neutralizada. A partir dos dados experimentais foi possível supor que a precipitação do PRP ocorre quando mais que 84% das suas cargas são neutralizadas, considerando que a distância média entre grupos fosfato vizinhos é menor que 2 Å.

Além destas, seguem as conclusões secundárias:

- (i) A solubilidade do PRP em soluções aquosas de etanol na presença de NaCl mostrou-se dependente da concentração inicial do PRP. Essa dependência é observada com maior clareza a baixas concentrações do polímero. O fenômeno pode estar associado à estrutura do precipitado ou ao coeficiente de distribuição do PRP.
- (ii) Existe influência da natureza dos sais na precipitação do PRP com etanol. A ordem de efetividade observada equivale à série liotrópica.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

- (i) Verificar a relação entre a concentração inicial de PRP e o seu coeficiente de distribuição durante a precipitação com etanol.
- (ii) Realizar ensaios precipitação de PRP com etanol na presença de $MgCl_2$, empregando concentrações salinas menores que 200 mmol/L, tendo em vista que maiores concentrações não se encontram nas condições limitantes das teorias DLVO e de condensação iônica. Espera-se obter resultado equivalente aqueles encontrados com NaCl e NH_4Cl .
- (iii) Determinar a distância entre os grupos fosfato do PRP, para que seja possível calcular qual é a sua fração de cargas neutralizadas do polímero para que a precipitação ocorra.

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, S. S.; DALBY, P. A. Thermodynamic parameters for salt-induced reversible protein precipitation from automated microscale experiments. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 2, p. 322–332, 2011.

ALBANI, S. M. F. et al. Improvement in the purification process of the capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b by using tangential ultrafiltration and diafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 7, p. 2068–2075, 2012.

ALBANI, S. M. F. et al. Polysaccharide purification from *Haemophilus influenzae* type b through tangential microfiltration. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 67–73, 2015.

ARSCOTT, P. G. et al. DNA condensation by cobalt hexaammine (III) in alcohol-water mixtures: dielectric constant and other solvent effects. **Biopolymers**, v. 36, n. 3, p. 345–64, 1995.

BLOOMFIELD, V. A; MA, C.; ARSCOTT, P. G. Role of multivalent cations in condensation of DNA. In: SCHMITZ, K. S. (Ed.). **Macro-ion Characterization. ACS Symposium Series**. Washington: American Chemical Society, 1993. p. 195–209.

BOSTRÖM, M. et al. Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI. **Biophysical Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 217–224, 2005.

BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W. Why the properties of proteins in salt solutions follow a Hofmeister series. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1-2, p. 48–52, 2004.

BRUNCHI, C. E.; MORARIU, S.; BERCEA, M. Intrinsic viscosity and conformational parameters of xanthan in aqueous solutions: Salt addition effect. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 512–519, 2014.

CHAPMAN, D. L. A contribution to the theory of electrocapillarity. **Philosophical Magazine**, v. 25, p. 475–481, 1913.

CHIEN, Y. W. Solubilization of metronidazole by water-miscible multi-cosolvents and water-soluble vitamins. **Journal of Parenteral Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 32–36, 1984.

CHO, J. et al. Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 4, p. 500–515, 2006.

CINTRA, F. D. O. **Modelagem matemática e otimização da produção de exopolissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2014.

CINTRA, F. D. O.; TAKAGI, M. Study of the chemical stability of the capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 167–172, 2015.

COLLINS, K. D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: Effects on proteins in solution and in the crystallization process. **Methods**, v. 34, p. 300–311, 2004.

COLLINS, K. D.; WASHABAUGH, M. W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 18, n. 4, p. 323–422, 1985.

COSTANTINO, P. **Capsular polysaccharide solubilisation and combination vaccines**, EUA, US8852606B2, 7 Out 2014.

CRISEL, R. M.; BAKER, R. S.; DORMAN, D. E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, type b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 13, p. 4926–4930, 1975.

DERJAGUIN, B.; LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Acta Physicochimica URSS**, v. 14, p. 633–662, 1941.

DRURY, H. F. Identification and estimation of pentoses in the presence of glucose. **Archives of Biochemistry**, v. 19, p. 455–466, 1948.

EGAN, W. et al. Structural studies and chemistry of bacterial capsular polysaccharides. Investigations of phosphodiester-linked capsular polysaccharides isolated from *Haemophilus influenzae* types a, b, c, and f. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 10, p. 2898–2910, 1982.

FILION, D.; LAVERTU, M.; BUSCHMANN, M. D. Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3224–3234, 2007.

FLAHIVE, J. J.; FOUFOPOULOS, A.; ETZEL, M. R. Alcohol precipitation of xanthan gum from pure solutions and fermentation broths. **Separation Science and Technology**, v. 29, n. 13, p. 1673–1687, 1994.

FLOCK, S.; LABARBE, R.; HOUSSIER, C. Dielectric constant and ionic strength effects on DNA precipitation. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 3, p. 1456–1465, 1996.

FOUFOPOULOS, A.; ETZEL, M. R. Phase separation of lactan gum from fermentation broths by addition of water-miscible organic solvents. **Separation Science and Technology**, v. 31, n. 6, p. 757–768, 1996.

- FREUNDLICH, H. **Colloid and Capillary Chemistry**. London: Methuen & Co, 1926.
- GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549–579, 2000.
- GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J. A.; MOHEDANO, A. F. Xanthan precipitation from solutions and fermentation broths. **Separation Science and Technology**, v. 28, n. 6, p. 1303–1313, 1993.
- GONZALES, R. et al. Phase equilibria for xanthan gum in ethanol-water solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, n. 3, p. 317–333, 1990.
- GOUY, M. Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. **Journal de Physique Théorique et Appliquée**, v. 9, n. 1, p. 457–468, 1910.
- GUO, X. et al. Ethanol precipitation of sugar beet pectins as affected by electrostatic interactions between counter ions and pectin chains. **Food Hydrocolloids**, p. 1–11, 2016.
- HAMAKER, H. C. The London—van der Waals attraction between spherical particles. **Physica**, v. 4, n. 10, p. 1058–1072, 1937.
- HAMIDI, A.; BEURRET, M. F. **Process for producing a capsular polysaccharide for use in conjugate vaccines**, EUA, US7582459B2, 1 Set 2009.
- HAUG, A.; LARSEN, B. The solubility of alginate at low pH. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 17, p. 1653–1662, 1963.
- HELMHOLTZ, H. Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche. **Annalen der Physik und Chemie**, v. 165, n. 6, p. 211–233, 1853.
- HUNTER, R. J. **Foundations of Colloid Science**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2001.
- ISAAC, D. H. et al. Molecular structures for microbial polysaccharides. X-ray diffraction from the capsular polysaccharide of *Klebsiella* K-type 5. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 1, p. 107–110, 1979.
- JONES, S. A. et al. Application of conductivity studies and polyelectrolyte theory to the conformation and order-disorder transition of xanthan polysaccharide. **European Biophysics Journal**, v. 15, p. 185–191, 1987.
- JOUYBAN, A.; SOLTANPOUR, S.; CHAN, H. K. A simple relationship between dielectric constant of mixed solvents with solvent composition and temperature. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 353–360, 2004.
- KELLY, D. F.; MOXON, E. R.; POLLARD, A. J. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Immunology**, v. 113, p. 163–174, 2004.

KNISKERN, P. J.; MARBURG, S.; ELLIS, R. W. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. In: POWELL, M. F.; NEWMAN, M. J. (Eds.). **Vaccine Design**. New York: Plenum Press, 1995. p. 673–694.

KRUYT, H. R. (ED.). **Colloid Science. Volume 1: Irreversible Systems**. Elsevier, 1952.

KUNZ, W. Specific ion effects in colloidal and biological systems. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, n. 1-2, p. 34–39, 2010.

KUNZ, W.; HENLE, J.; NINHAM, B. W. “Zur Lehre von der Wirkung der Salze” (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1-2, p. 19–37, 2004.

KUO, J. S.-C. **Isolation and purification of Polyribosyl Ribitol Phosphate from *Haemophilus influenzae* type b**, EUA, US4220717, 2 Set 1980.

LANDER, R. J. **Polysaccharide precipitation process**, EUA, US6410025B1, 25 Jun 2002.

LAZZARI, S. et al. Fractal-like structures in colloid science. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 235, p. 1–13, 2016.

LI, Y.; BREAKER, R. R. Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 23, p. 5364–5372, 1999.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LYKLEMA, J. Electric double layers. In: LYKLEMA, J. (Ed.). **Fundamentals of Interface and Colloid Science. Solid-liquid interfaces**. Academic Press, 1995. v. 2p. 3.1–3.232.

MANNING, G. S. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. III. An analysis based on the Mayer ionic solution theory. **The Journal of Chemical Physics**, v. 51, n. 8, p. 3249–3252, 1969a.

MANNING, G. S. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. I. Colligative properties. **The Journal of Chemical Physics**, v. 51, n. 3, p. 924–933, 1969b.

MANNING, G. S. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions II. Self diffusion of the small ions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 51, n. 3, p. 934–938, 1969c.

MANNING, G. S. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. IV. The approach to the limit and the extraordinary stability of the charge fraction. **Biophysical Chemistry**, v. 7, p. 95–102, 1977.

MANNING, G. S. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. **Quarterly Reviews of Biophysics II**, v. 2, p. 179–246, 1978.

MANNING, G. S. Counterion binding in polyelectrolyte theory. **Accounts of Chemical Research**, v. 12, n. 12, p. 443–449, 1979.

MANNING, G. S.; RAY, J. Counterion condensation revisited. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 16, n. 2, p. 461–476, 1998.

MARBURG, S.; TOLMAN, R. L.; KNISKERN, P. J. **Covalently-modified polyanionic bacterial polysaccharides, stable covalent conjugates of such polysaccharides and immunogenic proteins with bigeneric spacers, and methods of preparing such polysaccharides and conjugates and of confirming covalency**, EUA, US4695624, 22 Set 1987.

MARCUS, Y. Ionic radii in aqueous solutions. **Chemical Reviews**, v. 88, p. 1475–1498, 1988.

MEL'NIKOV, S. M. et al. Phase behavior of single dna in mixed solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 6, p. 1130–1136, 1999.

MYERSON, A. S. (ED.). **Handbook of Industrial Crystallization**. 2. ed. Woburn: Butterworth-Heinemann, 2002.

NINHAM, B. W.; DUGNAN, T. T.; PARSONS, D. F. Approaches to hydration, old and new: Insights through Hofmeister effects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, p. 612–617, 2011.

NORDE, W. **Colloids and Interfaces in Life Sciences and Bionanotechnology**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2011.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14002–14015, 2012.

OVERBEEK, J. T. G. Colloid stability in aqueous and non-aqueous media. **Discussions of the Faraday Society**, v. 42, p. 7–13, 1966.

PARSEGIAN, V. A. **Van der Waals Forces: A Handbook for Biologists, Chemists, Engineers, and Physicists**. New York: Cambridge University Press, 2006.

PICULELL, L.; NILSSON, S. Effects of neutral salts on the association and conformational stability of macromolecules in solution. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 82, p. 198–210, 1990.

PINHEIRO, M. J. et al. Solubility of lysozyme in aqueous solution containing ethanol or acetone: Unexpected dependence on the initial protein concentration. **Fluid Phase Equilibria**, v. 429, p. 9–13, 2016.

PRAKONGPAN, S.; NAGAI, T. Solubility of acetaminophen in cosolvents. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 340–343, 1984.

RABENSTEIN, D. L.; ROBERT, J. M.; PENG, J. Multinuclear magnetic resonance studies of the interaction of inorganic cations with heparin. **Carbohydrate Research**, v. 278, p. 239–256, 1995.

RECORD, M. T.; ANDERSON, C. F.; LOHMAN, T. M. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. **Quarterly Reviews of Biophysics II**, v. 2, p. 103–178, 1978.

SAGOU, J. P. S.; AHUALLI, S.; THOMAS, F. Influence of ionic strength and polyelectrolyte concentration on the electrical conductivity of suspensions of soft colloidal polysaccharides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 459, p. 212–217, 2015.

SANO, M. et al. Relationship between solubility of chitosan in alcoholic solution and its gelation. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 7, p. 1044–1046, 1999.

SAWAYAMA, S. et al. A light scattering study on the effects of pH on pectin aggregation in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, v. 2, n. 1, p. 31–37, 1988.

SHIAU, K. S.; CHEN, T. L. Initial protein concentration effects on precipitation by salt. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, n. 2, p. 202–206, 1997.

SHIH, Y. C.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. W. Some characteristics of protein precipitation by salts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 10, p. 1155–1164, 1992.

SIDEY, V. On the effective ionic radii for ammonium. **Acta Crystallographica**, v. B72, p. 626–633, 2016.

SMIDSRØD, O.; HAUG, A. Precipitation of acidic polysaccharides by salts in ethanol – water mixtures. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia**, v. 16, n. 3, p. 1587–1598, 1967.

SMITH, I. H.; PACETT, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 32, p. 119–129, 1982.

SOGIAS, I. A.; KHUTORYANSKIY, V. V.; WILLIAMS, A. C. Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, n. 4, p. 426–433, 2010.

STEPHENSON, F. H. **Calculations for Molecular Biology and Biotechnology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2010.

STERN, O. Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht. **Zeitschrift für Elektrochemie**, v. 30, p. 508–516, 1924.

STUART, M. C.; DE VRIES, R.; LYKLEMA, H. Polyelectrolytes. In: LYKLEMA, J. (Ed.). **Fundamentals of Interface and Colloid Science. Soft Colloids**. Academic Press, 2005. v. 5p. 2.1–2.84.

TAKAGI, M., CABRERA-CRESPO, J., ZANGIROLAMI, T. C., RAW, I., TANIZAKI, M. M. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 182–188, 2006.

TREFALT, G.; PALBERG, T.; BORKOVEC, M. Forces between colloidal particles in aqueous solutions containing monovalent and multivalent ions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 27, p. 9–17, 2017.

VERWEY, E. J. W.; OVERBEEK, J. T. G. **Theory of the Stability of Lyophobic Colloids**. Leiden: Elsevier, 1948.

WALTER, R. H. **Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food**. San Diego: Academic Press, 1997.

WELLS, J. D. Salt activity and osmotic pressure in connective tissue I. A study of solutions of dextran sulphate as a model system. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 183, p. 399–419, 1973.

WHO. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **WHO Technical Report Series**, v. 897, p. 27–60, 2000.

WINZOR, D. J. et al. Extent of charge screening in aqueous polysaccharide solutions. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 2456–2460, 2004.

WOHLFARTH, C. **Static Dielectric Constants of Pure Liquids and Binary Liquid Mixtures. Supplement to IV/6**. Berlin: Springer, 2008.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658–663, 2006.