

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

*Este exemplar corresponde à redação final  
da Tese defendida pela srta. Suzana  
Pereira Nunes e aprovada pela Comissão  
Julgadora.*

*Campinas, 14 de fevereiro de 1985*

*Fernando Galembek*

OSMOCENTRIFUGAÇÃO E  
ULTRAFILTRAÇÃO CENTRÍFUGA

SUZANA PEREIRA NUNES

TESE DE DOUTORAMENTO

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO GALEMBECK

CAMPINAS

1985

UNICAMP  
BIBLIOTECA

*Aos meus pais*

AGRADECIMENTOS

- ao Prof. Dr. Fernando Galembeck, pela brilhante orientação, pelo apoio e pela amizade;
- à FAPESP, pela bolsa concedida;
- ao CNPq, FINEP e FAPESP, por financiarem o projeto;
- aos funcionários que contribuíram para a realização desta tese;
- aos meus professores;
- aos meus amigos.

## RESUMO

Este trabalho está dividido em 5 partes:

i) Descrição da osmocentrifugação de acordo com a teoria dos processos irreversíveis, obtendo-se equações que relacionam o coeficiente de sedimentação aparente observado nesta técnica com aquele determinado na sedimentação normal, permitindo prever condições experimentais ótimas para diferentes sistemas;

ii) Demonstração de que o equilíbrio de sedimentação-difusão de albumina bovina é alcançado em células de diálise de 7,5 cm de altura, centrifugadas a 1000 rpm após 136 horas, enquanto que o tempo necessário para alcançá-lo por sedimentação normal em condições análogas é de aproximadamente 2 anos, permitindo a determinação dos pesos moleculares ( $\bar{M}_w$ ) e coeficientes de virial ( $B_{SD}$ ) de albumina bovina ( $\bar{M}_w = (6,82 \pm 0,59) \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ), ovalbumina ( $\bar{M}_w = (4,26 \pm 0,61) \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $B_{SD} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol.g}^{-2}.\text{cm}^3$ ) e gamaglobulina ( $\bar{M}_w = (1,59 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $B_{SD} = -7 \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-2}.\text{cm}^3$ ) em centrífugas de baixa velocidade;

iii) Obtenção de gradientes de densidade autogerados de Percoll e Ficoll por osmocentrifugação em baixa velocidade de rotação (1000-3000 rpm), permitindo o fracionamento de partículas biológicas sem a utilização de ultracentrífugas;

iv) Investigação da formação de complexos entre poliacrilamida catiônica e albumina (acima de seu ponto isoelétrico) como alternativa para o fracionamento de proteínas em solução, determinando-se a proporção ótima de albumina/poliacrilamida ( $C_{ALB}/C_{PAM} = 1,75$ ) para a recuperação dos complexos;

v) Demonstração de uma nova técnica de ultrafiltração em centrífuga, verificando-se que o próprio campo inercial pode ao mesmo tempo, agir como força motriz para a passagem do solvente através da membrana e minimizar o acúmulo de soluto na sua superfície, permitindo uma eficiente concentração de solutos macromoleculares e o fracionamento de proteínas de pesos moleculares diferentes.

## ABSTRACT

This work is divided in 5 parts:

i) Description of osmocentrifugation by the irreversible process thermodynamics formalism. This led to equations which predict when maximum benefit may be obtained by using osmocentrifugation, as compared to standard centrifugation experiments;

ii) Demonstration of the fact that albumin solution equilibrium can be achieved in much shorter times (136 h, in 7.5 cm-tall dialysis cells spun at 1000 rpm) than required for normal sedimentation (c a. 2 years), allowing the determination of molecular weights and virial coefficients of albumin ( $\bar{M}_w = (6.82 \pm 0.59) \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ), ovalbumin ( $\bar{M}_w = (4.26 \pm 0.61) \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$  and  $B_{SD} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol.g}^{-2}.\text{cm}^3$ ) and gamma-globulin ( $\bar{M}_w = (1.59 \pm 0.07) \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  and  $B_{SD} = -7 \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-2}.\text{cm}^3$ ) in low speed centrifuges;

iii) Obtainment of self-generated Percoll and Ficoll density gradients in low speed centrifuges (1000-3000 rpm), eliminating the need for ultracentrifuges in some biological particles fractionations;

iv) Investigation of complex formation between cationic polyacrylamide and bovine albumin (above its isoelectric point) as an alternative for protein fractionation, determining the best albumin/polyacrylamide ratio ( $C_{ALB}/C_{PAM} = 1.75$ ) for complex recovery;

v) Demonstration of a new ultrafiltration technique in a centrifuge, verifying that the inertial field itself can simultaneously act as the driving force for the solvent flux across the membrane and for membrane depolarization. This technique proved very convenient for protein concentration and it made protein fractionation by size feasible, by ultrafiltration.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Efeitos termoelétricos .....	2
1.2. Equações fenomenológicas .....	3
1.3. Difusão térmica e termosose .....	4
1.4. Efeitos eletrocinéticos .....	5
1.5. Efeito termodielétrico .....	7
1.6. Ultrafiltração e osmose reversa .....	7
1.7. Efeito de difusão-convecção .....	8
1.8. Osmossedimentação .....	8
1.9. Objetivo .....	10
2. DESCRIÇÃO FENOMENOLÓGICA DA OSMOCENTRIFUGAÇÃO .....	12
3. APLICAÇÃO ANALÍTICA DA OSMOSSEDIMENTAÇÃO:	
DETERMINAÇÃO DE PESO MOLECULAR .....	26
3.1. Introdução .....	26
3.1.1. Médias de pesos moleculares .....	28
3.1.2. Métodos físicos para determinação de pe so molecular .....	29
3.1.2.1. Osmometria .....	30
3.1.2.2. Espalhamento de luz .....	32
3.1.2.3. Viscosimetria .....	34
3.1.2.4. Cromatografia de permeação em gel .....	35
3.1.2.5. Eletroforese em gel de polia- crlamida .....	37
3.1.2.6. Eletroforese em gel de polia- crlamida - SDS .....	38
3.1.3. Ultracentrifugação analítica .....	39
3.1.3.1. Velocidade de sedimentação ...	41
3.1.3.2. Aproximação ao equilíbrio de sedimentação .....	43

3.1.3.3. Equilíbrio de sedimentação-difusão .....	44
- Solutos polidispersos .....	46
- Solutos monodispersos não-ideais .....	47
- Solutos polidispersos e não-ideais .....	48
- Tempo requerido para o alcance do equilíbrio .....	49
3.2. Parte experimental e resultados .....	51
3.2.1. Materiais e equipamento .....	51
3.2.2. Preparação das membranas .....	52
3.2.3. Células de osmocentrifugação .....	53
3.2.4. Calibração da centrífuga .....	56
3.2.5. Preparação da ovalbumina .....	56
3.2.6. Caracterização da ovalbumina por cromatografia em gel .....	58
3.2.7. Experimentos de alcance de equilíbrio de sedimentação-difusão em células de osmocentrifugação .....	60
3.2.8. Determinação do peso molecular de albumina bovina .....	62
3.2.9. Determinação do peso molecular de ovalbumina .....	67
3.2.10. Determinação do peso molecular de gama globulina .....	71
3.3. Discussão .....	75
4. OSMOCENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE .....	80
4.1. Introdução .....	80
4.1.1. Ultracentrifugação em gradiente de densidade .....	80
4.1.2. Materiais formadores de gradiente ....	82
4.1.2.1. Ficoll .....	84
4.1.2.2. Percoll .....	85
4.2. Parte Experimental .....	86
4.2.1. Materiais e equipamento .....	86

4.2.2. Curvas de calibração: Índice de refração x densidade .....	87
4.2.3. Obtenção de gradientes de densidade por osmocentrifugação .....	89
4.2.4. Osmocentrifugação de sangue em gradientes de densidade .....	96
4.3. Discussão .....	98
5. OSMOCENTRIFUGAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO DE ALBUMINA EM PRESENÇA DE POLIELETRÓLITOS .....	101
5.1. Introdução .....	101
5.1.1. Complexos de polieletrólitos .....	101
5.1.2. Complexos entre proteínas e polieletrólitos sintéticos .....	103
5.2. Parte experimental .....	105
5.2.1. Materiais e equipamento .....	105
5.2.2. Caracterização da poliacrilamida .....	106
5.2.2.1. Determinação do volume específico parcial da poliacrilamida .....	106
5.2.2.2. Determinação do peso molecular da poliacrilamida .....	108
5.2.2.3. Titulação da poliacrilamida com ácido poliacrílico .....	111
5.2.2.4. Método de Biureto para análise de proteínas .....	114
5.2.2.5. Centrifugação e osmocentrifugação de albumina em presença de poliacrilamida .....	115
5.3. Discussão .....	120
6. ULTRAFILTRAÇÃO CENTRÍFUGA .....	123
6.1. Introdução .....	123
6.1.1. Ultrafiltração .....	123
6.1.2. Polarização de concentração .....	126
6.2. Parte experimental .....	130
6.2.1. Materiais e equipamento .....	130
6.2.2. Módulo de ultrafiltração .....	130



	<u>Página</u>
6.2.3. Experimentos de ultrafiltração .....	132
6.2.3.1. Experimentos de concentração por ultrafiltração em centríf <u>u</u> ga .....	132
6.2.3.2. Experimentos de concentração por ultrafiltração convencio- nal .....	134
6.2.3.3. Experimentos de fracionamento por ultrafiltração em centríf <u>u</u> ga .....	136
6.2.3.4. Gradientes de concentração na coluna de solução concentrada por ultrafiltração em centríf <u>u</u> ga .....	140
6.3. Discussão .....	142
7. CONCLUSÃO .....	153
8. REFERÊNCIAS .....	

## 1. INTRODUÇÃO

Importantes processos que ocorrem na natureza em sistemas fora do estado de equilíbrio termodinâmico só podem ser compreendidos com auxílio da termodinâmica de processos irreversíveis<sup>(1)</sup>. Nestes processos, ocorre sempre transferência ou transporte de matéria e/ou energia.

As primeiras leis descrevendo fenômenos de transporte foram estabelecidas durante a primeira metade do século 19. Fourier mostrou que um fluxo de calor é diretamente proporcional ao gradiente de temperatura a ele associado; Ohm provou que a corrente elétrica é proporcional à força eletromotriz e Fick mostrou que o fluxo de massa por difusão é proporcional ao gradiente de concentração. As três leis trazem em comum uma relação entre fluxos (de calor, de elétrons e de massa) e forças motrizes (gradiente de temperatura, força eletromotriz e gradiente de concentração):

$$\vec{J} = L\vec{X} \quad (1)$$

onde  $\vec{J}$  é o fluxo,  $\vec{X}$  é a força conjugada e  $L$  é o coeficiente de proporcionalidade.

Nesta tese, serão utilizadas a notação e a nomenclatura de Katchalsky e Curran<sup>(1)</sup>, onde os fluxos, representados por  $\vec{J}$ , são vetoriais. Por exemplo, o fluxo de matéria  $\vec{J}_i$ , pode ser definido como o número de moles  $n_i$  atravessando uma unidade de área durante uma unidade de tempo  $t$ , em uma determinada direção. Considerando-se um volume  $V$ , contido por uma superfície de área  $A$ , conforme a Figura 1, a quantidade total da substância  $i$  saindo deste volume por unidade de tempo é dada por

$$\frac{dn_i}{dt} = \phi_i = \int_A \vec{J}_i \cdot d\vec{A} \quad (2)$$

onde  $\int_A$  indica a integração sobre toda a superfície.

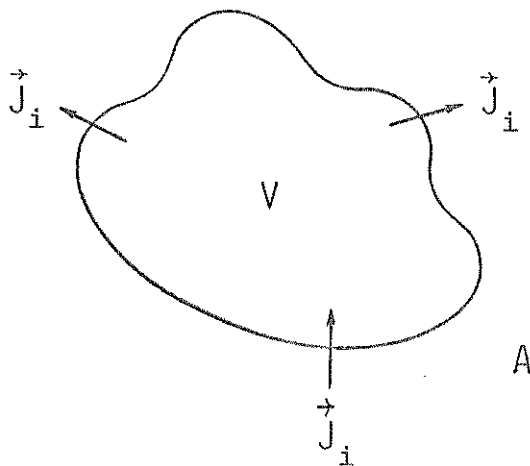


FIGURA 1. Fluxos através de um elemento de volume  $V$  limitado por uma superfície  $A$ .

Por convenção, um valor positivo de  $\phi_i$  indica uma perda de material do volume  $V$ , enquanto um valor negativo de  $\phi_i$  significa que há entrada e acúmulo da substância  $i$  neste volume.

### 1.1. EFEITOS TERMOELÉTRICOS

Porém, uma relação simples entre fluxo e sua força conjugada nem sempre ocorre. Pode haver acoplamento entre diferentes fluxos e as respectivas forças atuando em um sistema<sup>(1)</sup>.

Em 1821, Seebeck observou, que, aquecendo uma das junções de um par bimetálico e esfriando a outra, era gerada uma força eletromotriz no sistema. A medida deste potencial termoelétrico constitui um dos métodos mais sensíveis para determinação de temperatura.

Alguns anos após as observações de Seebeck, Peltier verificou o efeito contrário, isto é, que a passagem de corrente

elétrica em um circuito bimetálico causava absorção de calor em uma das junções e liberação de calor na outra. Thomson verificou que a passagem de corrente elétrica altera gradientes de temperatura mesmo em fios condutores homogêneos. Tais efeitos tornam possível o rápido aquecimento ou resfriamento com a passagem de corrente elétrica através de junções bimetálicas.

## 1.2. EQUAÇÕES FENOMENOLÓGICAS

Uma maneira de expressar a relação entre todos os fluxos e forças operando em um sistema foi introduzida por Onsager<sup>(2)</sup> em 1931, utilizando as chamadas equações fenomenológicas, que podem ser escritas como

$$\begin{aligned} \vec{J}_1 &= L_{11}\vec{X}_1 + L_{12}\vec{X}_2 + \dots + L_{1n}\vec{X}_n \\ \vec{J}_2 &= L_{21}\vec{X}_1 + L_{22}\vec{X}_2 + \dots + L_{2n}\vec{X}_n \\ &\vdots \\ \vec{J}_n &= L_{n1}\vec{X}_1 + L_{n2}\vec{X}_2 + \dots + L_{nn}\vec{X}_n \end{aligned} \quad (3)$$

ou

$$\vec{J}_i = \sum_{k=1}^n L_{ik}\vec{X}_k \quad (i = 1, 2, 3, \dots, n) \quad (4)$$

onde os coeficientes fenomenológicos  $L_{ik}$  são fluxos por unidade de força e têm características de condutâncias ou mobilidades. A matriz de coeficientes fenomenológicos é simétrica, de maneira que

$$L_{ik} = L_{ki} \quad (i \neq k) . \quad (5)$$

Quando somente um fluxo e sua força conjugada atuam em um sistema, as equações fenomenológicas se resumem na equação 1.

A equação 5 permite uma simplificação extremamente útil na teoria de Onsager, porém só é válida se os fluxos e forças fo-

rem adequadamente escolhidos. Esta escolha deve satisfazer à relação

$$\sigma = \sum_{i=1}^n \vec{J}_i \cdot \vec{X}_i \quad (6)$$

onde  $\sigma$  é a taxa de produção local de entropia. Frequentemente, é mais conveniente, ao invés de  $\sigma$ , utilizar a chamada função de dissipação

$$\Phi = T\sigma \quad (7)$$

onde  $T$  é temperatura.  $\Phi$  tem dimensões de energia por unidade de tempo e é uma medida da velocidade de dissipação local de energia livre pelos processos irreversíveis que têm lugar no sistema em estudo.

Por exemplo, os efeitos termoelétricos podem ser descritos de maneira adequada por

$$\Phi = \vec{J}_s \cdot \text{grad} (-T) + \vec{J}_e \cdot \text{grad} (-\tilde{\mu}) \quad (8)$$

onde  $\vec{J}_s$  é o fluxo de entropia,  $\vec{J}_e$  é o fluxo de elétrons e  $\tilde{\mu}$  é o potencial eletroquímico;  $\vec{J}_s$  é proporcional ao fluxo de calor.

### 1.3. DIFUSÃO TÉRMICA E TERMOSMOSE

Além dos efeitos termoelétricos, outros importantes efeitos resultantes de acoplamento de fluxos são bem conhecidos. A difusão térmica é caracterizada pelo fluxo de matéria,  $\vec{J}_i$ , causado por uma força não conjugada, o gradiente de temperatura. Neste caso,

$$\Phi = \vec{J}_s \cdot \text{grad} (-T) + \sum_{i=1}^n \vec{J}_i \cdot \text{grad} (-\mu_i) \quad (9)$$

onde  $\mu_i$  é o potencial químico do componente  $i$ . O efeito tem u-

ma aplicação importante na separação de isótopos em fase gasosa<sup>(3)</sup>. Por exemplo, uma eficiente separação de  $\text{Ne}^{20}$  e  $\text{Ne}^{22}$  ou  $\text{HCl}^{37}$  e  $\text{HCl}^{35}$  pode ser obtida, utilizando-se um tubo vertical equipado com um fio aquecido no seu eixo. O componente mais leve se difunde, preferencialmente, para a região mais quente e por convecção é levado para o topo do tubo; por outro lado, o componente mais pesado é preferencialmente mantido na região fria e daí é levado para baixo.

A difusão térmica, quando ocorre em um sistema descontínuo, através de uma membrana semipermeável, é conhecida por termosose. Neste caso, para descrever o sistema descontínuo, a equação 9 é integrada através da membrana:

$$\Phi = \int_0^{\Delta x} \phi \, dx = J_s \Delta T + \sum_{i=1}^n J_i \Delta \mu_i \quad (10)$$

onde  $\Delta T$  e  $\Delta \mu_i$  se referem a diferenças de temperatura e potencial químico através da membrana;  $\Delta x$  é a espessura da membrana.

A termosose foi inicialmente observada por Lippmann<sup>(4)</sup>, em 1907, e Aubert<sup>(5)</sup>, em 1912 e desde então vem sendo investigada tanto em sistemas gasosos<sup>(6)</sup> como em sistemas com soluções aquosas<sup>(7-11)</sup>. Quando a membrana é substituída por uma partição porosa não seletiva, o efeito é denominado termodiálise<sup>(12,13)</sup> e pode ser aplicado, por exemplo, à purificação de ácido acético proveniente de efluentes industriais<sup>(14)</sup>.

#### 1.4. EFEITOS ELETROCINÉTICOS

Exemplos clássicos de acoplamento entre fluxo de carga elétrica e fluxo de massa são os chamados efeitos eletrocinéticos: eletroforese, eletrosnose, potencial de escoamento e potencial de sedimentação. No primeiro deles, a eletroforese,

há um movimento de partículas carregadas, em relação a um líquido estacionário, sob ação de uma força eletromotriz não conjugada. Devido a este acoplamento, é possível uma infinidade de aplicações práticas, desde a caracterização e separação de proteínas em laboratório até a recuperação de minérios na indústria de fosfato<sup>(15)</sup>. Neste caso, o minério é triturado e lavado com água, deixando uma suspensão de partículas coloidais. Partículas maiores sedimentam rapidamente, mas as menores podem permanecer em suspensão durante anos. A sua sedimentação é efetivada através de um processo análogo à eletrodecantação (16-18). As partículas, carregadas negativamente, quando colocadas em um campo elétrico, entre dois eletrodos, migram em direção ao eletrodo positivo, deixando uma camada livre de partículas próximo ao eletrodo negativo. Esta camada menos densa se move para cima e a camada mais densa, contendo as partículas, sedimenta. Fenômeno contrário à eletroforese e sem o seu interesse prático é o potencial de sedimentação, onde um campo elétrico é criado, quando partículas carregadas se movimentam em relação a um líquido estacionário<sup>(19)</sup>.

Um complemento da eletroforese é a eletrosmose, isto é, o movimento de um líquido em relação a uma superfície estacionária (por exemplo, um capilar ou uma divisão porosa) sob ação de uma força eletromotriz. O efeito é usado para desidratação de materiais porosos<sup>(20)</sup>, colocando a amostra a secar entre dois eletrodos, de maneira que a água flua em direção a um deles, geralmente o catodo. Fenômeno contrário à eletrosmose é o potencial de escoamento<sup>(19)</sup>, caracterizado pela geração de um campo elétrico, quando um líquido flui sobre uma superfície carregada e estacionária. O acoplamento entre a corrente elétrica e o transporte de líquido através de uma membrana, separando duas

soluções binárias de mesma concentração, é expresso por

$$\Phi = J_V \Delta P + IE \quad (11)$$

onde  $J_V$  é fluxo volumétrico,  $I$  é a corrente elétrica,  $E$  é a diferença de potencial elétrico entre os eletrodos e  $\Delta P$  é a diferença de pressão hidrostática.

### 1.5. EFEITO TERMODIELÉTRICO

Um interessante fenômeno relacionando corrente elétrica e transferência de massa durante uma mudança de fase foi observado por Costa Ribeiro<sup>(21)</sup> em 1950. Em um condensador, cujo dielétrico estiver parcialmente no estado sólido e parcialmente no estado líquido (sólido em fusão), com uma das placas em contato, exclusivamente, com a fase sólida e a outra com a fase líquida na fronteira entre as duas fases, será observada uma corrente elétrica. O inverso do chamado efeito termodielétrico de Costa Ribeiro, isto é, a ocorrência de solidificação em um sistema dielétrico sólido/líquido através da aplicação de um forte campo elétrico, foi recentemente observado por Evans<sup>(22)</sup>.

Alguns efeitos relacionados com este efeito foram observados como, por exemplo, uma variação no padrão de sublimação de cristais de KCl<sup>(23)</sup> na presença de campo elétrico e um aumento da velocidade de crescimento de cristais de BaMoO<sub>4</sub> em sílica-gel<sup>(24)</sup>.

Equações fenomenológicas descrevendo estes efeitos ainda não foram relatadas.

### 1.6. ULTRAFILTRAÇÃO E OSMOSE REVERSA

Os processos tradicionais de separação por membrana, ul-



trafiltração e osmose reversa, podem ser descritos com base na termodinâmica de processos irreversíveis<sup>(1)</sup> como sendo resultantes de um acoplamento entre fluxos volumétrico ( $J_V$ ) e difusivo ( $J_D$ ), sendo as respectivas forças conjugadas, diferenças de pressão hidrostática  $\Delta P$  e de pressão osmótica  $\Delta \pi$ :

$$\Phi = J_V \Delta P + J_D \Delta \pi \quad (12)$$

### 1.7. EFEITO DE DIFUSÃO-CONVECÇÃO

Kirkwood e Brown<sup>(25)</sup> descreveram um método de fracionamento de macromoléculas em solução, onde correntes convectivas são acopladas a correntes difusivas. O princípio do método pode ser compreendido, considerando um sistema composto por dois reservatórios, contendo soluções de igual concentração de soluto macromolecular e diferentes concentrações de soluto de baixo peso molecular, separados por um canal vertical de convecção, cujas paredes são permeáveis somente ao soluto de baixo peso molecular. O gradiente horizontal de concentração do soluto de baixo peso molecular, através do canal, provoca convecção em seu interior. Se este soluto interage com o soluto macromolecular, o gradiente de concentração do primeiro produz um gradiente horizontal de potencial químico do segundo. O acoplamento entre o transporte difusivo horizontal e a convecção no interior do canal leva a uma transferência seletiva de componentes macromoleculares do tipo ao fundo do reservatório, dependendo da interação com o soluto de baixo peso molecular.

### 1.8. OSMOSSEDIMENTAÇÃO

Em 1952, Lang<sup>(26,27)</sup>, utilizando um osmômetro com membra-

nas verticais observou, que, quando o equilíbrio osmótico era alcançado, havia uma diferença de concentração entre o fundo e o topo do osmômetro. Foi sugerido, então, que ao equilíbrio osmótico estava associado o equilíbrio de sedimentação-difusão. A predição teórica desta associação já havia sido feita por Porter (28).

Há alguns anos, independentemente, Galembeck e colaboradores (29-33) observaram, que gradientes de concentração são obtidos, rapidamente, quando soluções macromoleculares são mantidas em repouso, em células de diálise, em contato com o solvente, através de uma membrana vertical semipermeável. Como a sedimentação é acelerada devido ao acoplamento entre fluxos de massa osmótico e de sedimentação no sistema, o efeito foi denominado osmossedimentação. A descrição fenomenológica da osmossedimentação constitui a primeira parte desta tese (capítulo 2)

O acoplamento osmótico é tanto mais efetivo quanto maior a permeabilidade da membrana utilizada, ao solvente. A disponibilidade de membranas de acetato de celulose (34), altamente permeáveis à água, permitiu verificar que o equilíbrio de sedimentação-difusão de soluções macromoleculares (35,36) e dispersões coloidais (37,38) pode ser alcançado em tempos relativamente curtos, sob gravidade, em experimentos de osmossedimentação, em células de vários centímetros de altura. O alcance do equilíbrio de sedimentação nestas condições permite determinar peso molecular e outros parâmetros físico-químicos de sistemas, cujo estudo se torna difícil por métodos convencionais.

Dois fatores, porém, limitavam a aplicação da osmossedimentação, sob gravidade, ao estudo de solutos de peso molecular acima de quinhentos mil daltons: (a) a seletividade e permeabilidade das membranas disponíveis e (b) a intensidade dos

gradientes de concentração de solutos menores que quinhentos mil daltons, sob gravidade.

Com o desenvolvimento de membranas de acetato de celulose de alta permeabilidade a água, mas com corte de peso molecular de quarenta mil daltons<sup>(39-41)</sup> foi possível estender a aplicação da osmossedimentação a solutos menores, utilizando-se centrífugas de baixa velocidade de rotação, onde os gradientes de concentração são mais acentuados. A osmossedimentação em centrífuga foi denominada osmocentrifugação e sua utilização permite a obtenção de resultados de grande interesse, em experimentos preparativos e analíticos. Entre as aplicações preparativas da osmocentrifugação, encontram-se a concentração de solutos macromoleculares<sup>(42)</sup> e o fracionamento de partículas e polímeros em gradiente de densidade. Esta aplicação é explorada no quarto capítulo desta tese. No capítulo 5, a associação de proteínas com poliacrilamida iônica é investigada por osmocentrifugação e centrifugação normal, também, para fins preparativos. A aplicação analítica da osmocentrifugação é apresentada no capítulo 3, investigando-se a sua eficiência na determinação de peso molecular e coeficientes de virial de polímeros de peso molecular entre quarenta e duzentos mil daltons.

A última etapa desta tese (capítulo 6) descreve um novo processo de ultrafiltração, que utiliza o campo inercial como força motriz para o transporte de solvente através da membrana.

### 1.9. OBJETIVO

Os objetivos desta tese podem ser resumidos nos seguintes itens, que serão explorados nos capítulos subsequentes:

- i) Descrever a osmocentrifugação de acordo com o forma-

lismo da termodinâmica dos processos irreversíveis;

ii) Comprovar a eficiência da osmocentrifugação como método analítico para determinação de peso molecular e coeficiente de virial de polímeros de peso molecular entre 40000 e 200000 daltons;

iii) Investigar o desempenho da osmocentrifugação na obtenção de gradientes de densidade e consequente aplicação no fracionamento de partículas e macromoléculas, em meio de densidade variável;

iv) Estudar a interação entre proteínas e poliacrilamida iônica de carga oposta como meio de fracionamento em experimentos de osmocentrifugação e centrifugação normal;

v) Propor um novo método de ultrafiltração em centrifuga, que permita uma rápida concentração e/ou fracionamento de solutos macromoleculares.

Cada um destes capítulos representa um estudo em separado, sendo apresentadas, em cada um, seções contendo material introdutório, descrição da metodologia, resultados obtidos e a sua discussão.

## 2. DESCRIÇÃO FENOMENOLÓGICA DA OSMOCENTRIFUGAÇÃO

A osmocentrifugação pode ser compreendida de acordo com o formalismo da termodinâmica dos processos irreversíveis.

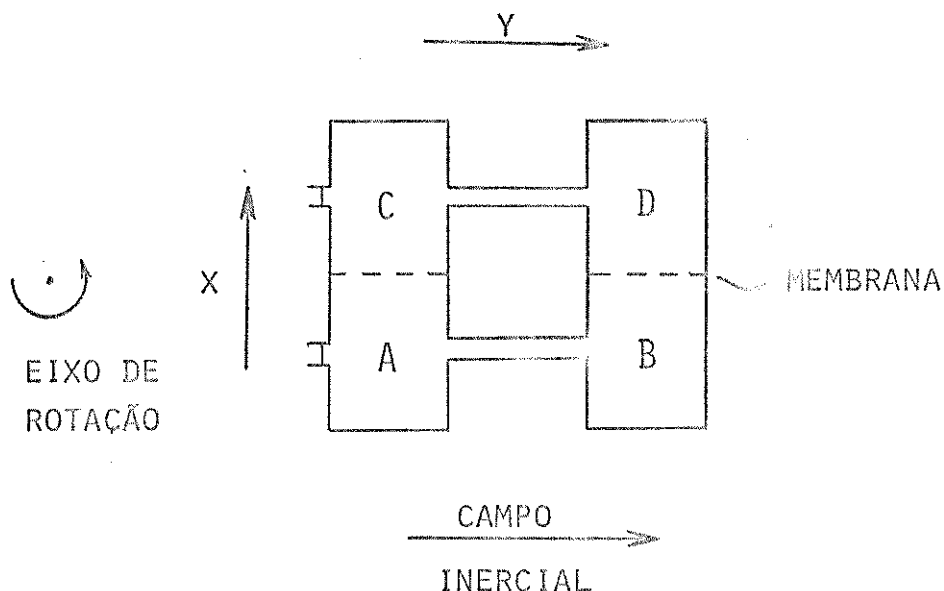


FIGURA 2. Diagrama de um sistema descontínuo de osmocentrifugação.

Quando um sistema caminha para o equilíbrio, sua energia livre diminui. Esta diminuição da energia livre,  $G$ , com o tempo pode ser convenientemente expressa pela integração da função de dissipação sobre o volume do sistema.

$$\frac{dG}{dt} = \int_V \Phi \, dV \quad (13)$$

Para um sistema à temperatura constante e sem reações químicas, a função de dissipação é

$$\Phi = \sum_{i=1}^n \vec{J}_i \cdot \text{grad} (-\mu_i) \quad (14)$$

onde  $\vec{J}_i$  é o fluxo molar do componente  $i$  já referido na equação 2 e  $\mu_i$  é o potencial químico do componente  $i$ .

Como  $\vec{J}_i$  e  $\text{grad}(-\mu_i)$  são vetores, é possível escrever, usando coordenadas cartesianas

$$\phi = \sum_{i=1}^n (J_{ix}\vec{i} + J_{iy}\vec{j} + J_{iz}\vec{k}) \cdot \left( \frac{d\mu_i}{dx}\vec{i} + \frac{d\mu_i}{dy}\vec{j} + \frac{d\mu_i}{dz}\vec{k} \right) \quad (15)$$

ou

$$\phi = \sum_{i=1}^n \left( J_{ix} \frac{d\mu_i}{dx} + J_{iy} \frac{d\mu_i}{dy} + J_{iz} \frac{d\mu_i}{dz} \right) \quad (16)$$

A Figura 2 descreve um sistema descontínuo constituído por 4 compartimentos interligados, onde tanto A e C como B e D são separados por uma membrana semipermeável e A e B, assim como C e D, são interligados por um capilar de volume desprezível.

Neste caso, para descrever melhor o sistema, a função de dissipação pode ser integrada através das fronteiras entre os compartimentos. Por exemplo, para o compartimento A,

$$\phi_A = \int_0^{\Delta x} \left( \sum_{i=1}^n J_{ix} \frac{d\mu_i}{dx} \right) dx + \int_0^{\Delta y} \left( \sum_{i=1}^n J_{iy} \frac{d\mu_i}{dy} \right) dy \quad (17)$$

onde  $\Delta x$  e  $\Delta y$  são as espessuras das conexões entre os compartimentos.

A partir da equação 17, obtém-se

$$\phi_A = \sum_{i=1}^n \left[ J_{iAB} \underbrace{(\mu_{iA} - \mu_{iB})}_{\Delta\mu_{iAB}} + J_{iAC} \underbrace{(\mu_{iA} - \mu_{iC})}_{\Delta\mu_{iAC}} \right] \quad (18)$$

onde  $J_{iAB}$  e  $J_{iAC}$  são os fluxos molares do componente  $i$ , do compartimento A para os compartimentos B e C, respectivamente.

De maneira análoga,

$$\phi_B = \sum_{i=1}^n \left[ J_{iBA} \Delta\mu_{iBA} + J_{iBD} \Delta\mu_{iBD} \right] \quad (19)$$

$$\Phi_C = \sum_{i=1}^N \left[ J_{iCA} \Delta\mu_{iCA} + J_{iCD} \Delta\mu_{iCD} \right] \quad (20)$$

$$\Phi_D = \sum_{i=1}^n \left[ J_{iDB} \Delta\mu_{iDB} + J_{iDC} \Delta\mu_{iDC} \right] \quad (21)$$

Mas  $J_{iAB} = -J_{iBA}$ ,  $J_{iAC} = -J_{iCA}$ ,  $J_{iCD} = -J_{iDC}$  e  $J_{iBD} = -J_{iDB}$ ;  $\Delta\mu_{iAB} = -\Delta\mu_{iBA}$ ,  $\Delta\mu_{iAC} = -\Delta\mu_{iCA}$ ,  $\Delta\mu_{iCD} = -\Delta\mu_{iDC}$  e  $\Delta\mu_{iBD} = -\Delta\mu_{iDB}$ .

Portanto, para um sistema binário,

$$\Phi_A = J_{1AB} \Delta\mu_{1AB} + J_{2AB} \Delta\mu_{2AB} + J_{1AC} \Delta\mu_{1AC} + J_{2AC} \Delta\mu_{2AC} \quad (22)$$

$$\Phi_B = J_{1AB} \Delta\mu_{1AB} + J_{2AB} \Delta\mu_{2AB} + J_{1BD} \Delta\mu_{1BD} + J_{2BD} \Delta\mu_{2BD} \quad (23)$$

$$\Phi_C = J_{1AC} \Delta\mu_{1AC} + J_{2AC} \Delta\mu_{2AC} + J_{1CD} \Delta\mu_{1CD} + J_{2CD} \Delta\mu_{2CD} \quad (24)$$

$$\Phi_D = J_{1BD} \Delta\mu_{1BD} + J_{2BD} \Delta\mu_{2BD} + J_{1CD} \Delta\mu_{1CD} + J_{2CD} \Delta\mu_{2CD} \quad (25)$$

Em um sistema com membrana ideal, isto é, permeável somente ao solvente,  $J_{2AC} = J_{2BD} = 0$ . Além disso, como os compartimentos C e D contêm somente o solvente puro,  $\Delta\mu_{1CD} = 0$  e  $\Delta\mu_{2CD} = 0$ . Assim, as equações 22-25 são simplificadas:

$$\Phi_A = J_{1AB} \Delta\mu_{1AB} + J_{2AB} \Delta\mu_{2AB} + J_{1AC} \Delta\mu_{1AC} \quad (26)$$

$$\Phi_B = J_{1AB} \Delta\mu_{1AB} + J_{2AB} \Delta\mu_{2AB} + J_{1BD} \Delta\mu_{1BD} \quad (27)$$

$$\Phi_C = J_{1AC} \Delta\mu_{1AC} \quad (28)$$

$$\Phi_D = J_{1BD} \Delta\mu_{1BD} \quad (29)$$

Considerando a função de dissipação do sistema global,

$$\Phi = \Phi_A + \Phi_B + \Phi_C + \Phi_D \quad (30)$$

obtém-se

$$\Phi = 2 J_{1AB} \Delta\mu_{1AB} + 2 J_{2AB} \Delta\mu_{2AB} + 2 J_{1AC} \Delta\mu_{1AC} + 2 J_{1BD} \Delta\mu_{1BD} \quad (31)$$

Em um sistema onde o volume  $V$  de cada compartimento é constante, a membrana é ideal, o líquido é incompressível e considerando a área de membrana entre os compartimentos A e C igual à daquela entre B e D,

$$J_{1AC} = -J_{1BD} \quad (32)$$

Introduzindo a equação 32 na equação 31, obtém-se

$$\frac{1}{2} \Phi = J_{1AB} \Delta\mu_{1AB} + J_{2AB} \Delta\mu_{2AB} + J_{1AC} (\Delta\mu_{1AC} - \Delta\mu_{1BD}) \quad (33)$$

Como os compartimentos C e D contêm somente o solvente puro, os potenciais químicos do solvente em C e D são iguais, de maneira que

$$\Delta\mu_{1AB} = \Delta\mu_{1AC} - \Delta\mu_{1BD} \quad (34)$$

De acordo com a equação de Gibbs-Duhem,

$$\sum_{i=1}^n c_i \Delta\mu_i = 0 \quad (35)$$

onde  $c_i$  é a concentração do componente  $i$ .

Em um sistema binário,

$$\bar{c}_1 \Delta\mu_1 + \bar{c}_2 \Delta\mu_2 = 0$$

e

$$\Delta\mu_2 = -\frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} \Delta\mu_1 \quad (36)$$

Introduzindo as equações 34 e 36 na equação 33, a função de dissipação integrada pode ser expressa como

$$\frac{1}{2} \Phi = J_{1AB} \Delta\mu_{1AB} - \frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} J_{2AB} \Delta\mu_{1AB} + J_{1AC} \Delta\mu_{1AB}$$

ou



$$\frac{1}{2} \phi = \underbrace{\left( J_{1AB} - \frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} J_{2AB} + J_{1AC} \right)}_{J_T} \Delta\mu_{1AB} \quad (37)$$

onde  $\bar{c}_1$  e  $\bar{c}_2$  são as médias das concentrações de solvente e soluto, entre os compartimentos A e B.

A equação fenomenológica para o sistema pode, então, ser escrita como

$$J_T = L \Delta\mu_{1AB} \quad (38)$$

onde L é o coeficiente fenomenológico

$$L = \frac{J_T}{\Delta\mu_{1AB}} \quad (39)$$

Como  $J_T = J_{1AB} - \frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} J_{2AB} + J_{1AC}$ , o coeficiente fenomenológico pode ser expresso da seguinte maneira:

$$L = \frac{J_{1AB} - \frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} J_{2AB}}{\Delta\mu_{1AB}} + \frac{J_{1AC}}{\Delta\mu_{1AB}} \quad (40)$$

$$\text{ou } L = \frac{-\frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} \left( J_{2AB} - \frac{\bar{c}_2}{\bar{c}_1} J_{1AB} \right)}{\Delta\mu_{1AB}} + \frac{J_{1AC}}{\Delta\mu_{1AB}} \quad (41)$$

Introduzindo a equação 36 na equação 41, obtém-se

$$L = \frac{\frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} \left( J_{2AB} - \frac{\bar{c}_2}{\bar{c}_1} J_{1AB} \right)}{\Delta\mu_{2AB}} + \frac{J_{1AC}}{\Delta\mu_{1AB}} \quad (42)$$

$$\text{Mas, } J_{2AB} - \frac{\bar{c}_2}{\bar{c}_1} J_{1AB} = J^{SD} \quad (43)$$

onde  $J^{SD}$  é o fluxo difusivo de soluto em relação ao solvente devido ao processo normal de sedimentação.

Introduzindo a equação 34 na equação 42, obtém-se

$$L = \frac{\frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} J^{SD}}{\Delta\mu_{2AB}} + \frac{J_{1AC}}{\Delta\mu_{1AC} - \Delta\mu_{1BD}} \quad (44)$$

O primeiro termo à direita é relativo à sedimentação e o segundo é osmótico. Resumidamente, a equação 44 pode ser escrita como

$$L = \frac{\bar{c}_1}{\bar{c}_2} L^{SD} + L^{OS} \quad (45)$$

Os coeficientes  $L$ ,  $L^{SD}$  e  $L^{OS}$  têm características de condutâncias ou mobilidades e seus inversos são caracterizados como resistências. Assim,  $1/L^{SD}$  corresponde à resistência ao movimento de sedimentação do soluto e está diretamente relacionada à viscosidade da solução;  $1/L^{OS}$  é a resistência ao transporte de solvente através da membrana e é inversamente proporcional à sua permeabilidade ao solvente.

Assim, como já havia sido indicado, anteriormente <sup>(32)</sup>, a osmosedimentação pode ser comparada com um circuito elétrico com resistências em paralelo. Em um sistema sem acoplamento osmótico, contendo uma coluna de solução de concentração uniforme, há uma diferença de potencial químico de solvente (e soluto) entre pontos a diferentes alturas. Esta diferença tende a diminuir por um caminho de resistência alta, isto é, através do movimento das moléculas em um meio viscoso. Se alguns pontos da solução são conectados a um reservatório de potencial químico (compartimentos contendo solvente) através de caminhos de resistência baixa (membranas de alta permeabilidade ao solvente), promove-se um curto circuito entre os pontos de diferentes potenciais químicos e o sistema equilibra mais rapidamente.

$J^{SD}$  pode ser avaliado por analogia ao tratamento descrito por Katchalsky<sup>(1)</sup> para sedimentação normal em sistemas contínuos. A equação fenomenológica que descreve a sedimentação normal, no caso de uma solução binária em centrífuga, se resume em

$$J^{SD} = - L^{SD} \frac{d\mu_2}{dr} \quad (46)$$

onde  $r$  é a distância entre eixo de rotação e a célula.

No sistema descrito na Figura 2, como  $J^{SD}$  não varia com  $r$  no capilar que une os compartimentos A e B, é possível integrar a equação 46 entre estes compartimentos, obtendo-se

$$J^{SD} = L^{SD} \frac{\Delta\mu_{2AB}}{(r_B - r_A)} \quad (47)$$

O potencial químico do soluto sob ação de um campo inercial é expresso como<sup>(1)</sup>

$$\mu_2 = \mu_2^0 + RT \ln c_2 - M_2 (1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2 \frac{r^2}{2} \quad (48)$$

onde  $\mu_2^0$  é o potencial químico padrão;  $\bar{v}_2$  é o volume específico parcial do soluto;  $\rho$  é a densidade da solução;  $r$  é a distância entre o eixo de rotação e um ponto da célula de centrifugação;  $\omega$  é a velocidade angular e  $M_2$  é o peso molecular do soluto.

$$\Delta\mu_{2AB} = RT \ln \frac{c_{2A}}{c_{2B}} + M_2 (1 - \bar{v}_2 \rho) \frac{\omega^2}{2} (r_B^2 - r_A^2) \quad (49)$$

Introduzindo a equação 49 na equação 47, obtém-se

$$J^{SD} = \frac{L^{SD} RT}{(r_B - r_A)} \ln \frac{c_{2A}}{c_{2B}} + L^{SD} M_2 (1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2 \frac{(r_B^2 - r_A^2)}{2(r_B - r_A)} \quad (50)$$

A equação 50 pode ser simplificada, utilizando o coeficiente de sedimentação  $S$ , para uma solução binária<sup>(1)</sup>

$$S = \frac{L^{SD} M_2 (1 - \bar{v}_2 \rho)}{\bar{c}_2} \quad (51)$$

e o coeficiente de difusão D

$$D = L^{SD} \frac{RT}{\bar{c}_2} \quad (52)$$

onde  $\bar{c}_2$  é a concentração média entre os compartimentos A e B.

Portanto introduzindo as equações 51 e 52 na equação 50, obtêm-se

$$J^{SD} = \frac{\bar{c}_2 D}{(r_B - r_A)} \ln \frac{c_{2A}}{c_{2B}} + \bar{c}_2 S \omega^2 \frac{(r_B^2 - r_A^2)}{2 (r_B - r_A)} \quad (53)$$

Por outro lado,  $J_{1AC}$  pode ser expresso como

$$J_{1AC} = L^{OS} (\Delta\mu_{1AC} - \Delta\mu_{1BD}) \quad (54)$$

Mas a diferença de potencial químico do solvente entre os dois compartimentos superiores é dada por

$$\Delta\mu_{1AC} = RT \ln \frac{c_{1A}}{c_{1C}} \quad (55)$$

pois os compartimentos A e C estão sujeitos à mesma pressão hidrostática. Mas considerando que  $r_B - r_A$  é muito maior que a espessura  $\Delta r$  do compartimento A,

$$\Delta\mu_{1BD} = RT \ln \frac{c_{1B}}{c_{1D}} + \bar{v}_1 \Delta\rho \omega^2 \frac{(r_B^2 - r_A^2)}{2} \quad (56)$$

onde  $\Delta\rho = \rho_{\text{solução}} - \rho_{\text{solvente}}$ ;  $\bar{v}_1$  é o volume molar parcial do solvente.

Introduzindo os valores de  $\Delta\mu_{1AC}$  e  $\Delta\mu_{1BD}$  na equação 54, obtêm-se

$$J_{1AC} = L^{OS} \left[ RT \ln \frac{c_{1A}}{c_{1B}} - \bar{v}_1 \Delta\rho \omega^2 \frac{(r_B^2 - r_A^2)}{2} \right] \quad (57)$$

Considerando a condição inicial, onde  $c_{1A} = c_{1B}$

$$L^{OS} = \left[ \frac{J_{1AC}}{-\bar{V}_1 \Delta \rho \omega^2 \frac{(r_B^2 - r_A^2)}{2}} \right]_{c_{1A} = c_{1B}} \quad (58)$$

isto é,  $L^{OS}$  é o fluxo de massa de solvente por unidade de força motriz;

$L^{OS}$  é diretamente relacionado à permeabilidade da membrana ao solvente.

É interessante avaliar o fluxo molar de soluto do compartimento A para o compartimento B. Conforme a equação 43,

$$J_{2AB} = J^{SD} + \frac{\bar{c}_2}{\bar{c}_1} J_{1AB} \quad (59)$$

Além disso, como se trata de um sistema binário onde o volume de cada compartimento é constante,

$$\frac{dv_{2A}}{dt} = - \frac{dv_{1A}}{dt} \quad (60)$$

onde  $V_{1A}$  e  $V_{2A}$  são os volumes parciais, respectivamente, de solvente e soluto no compartimento A.

A equação 60 pode ser, também, expressa como

$$\bar{V}_2 \frac{dn_{2A}}{dt} = - \bar{V}_1 \frac{dn_{1A}}{dt} \quad (61)$$

onde  $\bar{V}_1$  e  $\bar{V}_2$  são os volumes molares parciais de solvente e soluto, respectivamente e segundo a equação 2,

$$\frac{dn_{2A}}{dt} = \phi_{2A} = J_{2AB} A_{AB} \quad (62)$$

$$e \quad \frac{dn_{1A}}{dt} = \phi_{1A} = J_{1AB} A_{AB} + J_{1AC} A_{AC} \quad (63)$$

onde  $A_{AC}$  é a área da membrana que separa os compartimentos A e C;  $A_{AB}$  é a área transversal do capilar que liga os compartimento

tos A e B.

Portanto,

$$\bar{V}_2 J_{2AB} A_{AB} = -\bar{V}_1 (J_{1AB} A_{AB} + J_{1AC} A_{AC})$$

$$\text{ou } J_{1AB} = -\frac{\bar{V}_2}{\bar{V}_1} J_{2AB} - J_{1AC} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} \quad (64)$$

Introduzindo a equação 64 na equação 59, obtém-se

$$J_{2AB} = J^{SD} - \frac{\bar{c}_2}{\bar{c}_1} \left[ \frac{\bar{V}_2}{\bar{V}_1} J_{2AB} + J_{1AC} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} \right]$$

$$\text{ou } J_{2AB} = \frac{\bar{c}_1 \bar{V}_1}{\bar{c}_1 \bar{V}_1 + \bar{c}_2 \bar{V}_2} \left[ J^{SD} - \frac{\bar{c}_2}{\bar{c}_1} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} J_{1AC} \right] \quad (65)$$

Introduzindo-se as equações 53 e 57 na equação 65, obtém-se o fluxo molar de soluto do compartimento A para o compartimento B.

$$J_{2AB} = \frac{\bar{c}_2 \bar{V}_1}{\bar{c}_1 \bar{V}_1 + \bar{c}_2 \bar{V}_2} \left\{ \frac{\bar{c}_1}{(r_B - r_A)} \left[ D \ln \frac{c_{2A}}{c_{2B}} + S \omega^2 \frac{(r_B^2 - r_A^2)}{2} \right] - L^{OS} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} \left[ RT \ln \frac{c_{1A}}{c_{1B}} - \bar{V}_1 \Delta \rho \omega^2 \frac{(r_B^2 - r_A^2)}{2} \right] \right\} \quad (66)$$

Rearranjando a equação 66,

$$J_{2AB} = \frac{\bar{c}_2 \bar{V}_1}{\bar{c}_1 \bar{V}_1 + \bar{c}_2 \bar{V}_2} \left\{ \frac{\bar{c}_1 D}{(r_B - r_A)} \ln \frac{c_{2A}}{c_{2B}} - L^{OS} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} RT \ln \frac{c_{1A}}{c_{1B}} + \bar{c}_1 \left[ S + L^{OS} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} \frac{\bar{V}_1 \Delta \rho}{\bar{c}_1} (r_B - r_A) \right] \omega^2 \frac{(r_B^2 - r_A^2)}{2 (r_B - r_A)} \right\} \quad (67)$$

é possível definir um coeficiente de sedimentação aparente para o soluto.

$$S_{AP} = S + L^{OS} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} \frac{\bar{V}_1 \Delta \rho}{\bar{c}_1} (r_B - r_A) . \quad (68)$$

Para uma solução binária<sup>(43)</sup>,

$$\bar{c}_1 = \rho_{\text{solução}} - \bar{c}_2 \quad (69)$$

e

$$\Delta \rho = \rho_{\text{solução}} - \rho_1 = \bar{c}_2 (1 - \rho_1 \bar{v}_2) . \quad (70)$$

Introduzindo as equações 69 e 70 na equação 68, obtem-se

$$\frac{S_{AP}}{S} = 1 + \frac{L^{OS}}{S} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} \bar{V}_1 \frac{\left(\frac{1}{\rho_1} - \bar{v}_2\right)}{\left(\frac{1}{\bar{c}_2} - \bar{v}_2\right)} (r_B - r_A) . \quad (71)$$

A equação 71 permite prever a influência de vários parâmetros sobre a relação  $S_{AP}/S$  em experimentos de osmocentrifugação. Por exemplo, a Figura 3a ilustra como a permeabilidade da membrana influi sobre o valor de  $S_{AP}/S$ , considerando-se uma solução  $0,01 \text{ g.ml}^{-1}$  de albumina ( $S = 4,5 \times 10^{-13} \text{ s}$ ,  $\bar{v}_2 = 0,734 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ ) em uma célula onde  $A_{AC}/A_{AB} = 10$  e  $r_B - r_A = 10 \text{ cm}$ . A Figura 3b mostra a variação de  $S_{AP}/S$  com o valor de  $r_B - r_A$ , admitindo-se  $L^{OS} = 2 \times 10^{-11} \text{ s mol}^{-1} \text{ cm}^{-4}$ , valor estimado para as membranas de acetato de celulose utilizadas nesta tese. A curva de  $S_{AP}/S$  em função de  $A_{AC}/A_{AB}$ , mantendo  $r_B - r_A = 10 \text{ cm}$ , é análoga à apresentada na Figura 3b.

Para partículas esféricas, o coeficiente de sedimentação  $S$  pode ser expresso<sup>(44)</sup> como

$$S = \frac{(\rho_2 - \rho_{\text{solução}}) d^2}{18 \eta_{\text{solução}}} \quad (72)$$

onde  $\eta_{\text{solução}}$  é a viscosidade da solução e  $d$  é o diâmetro da

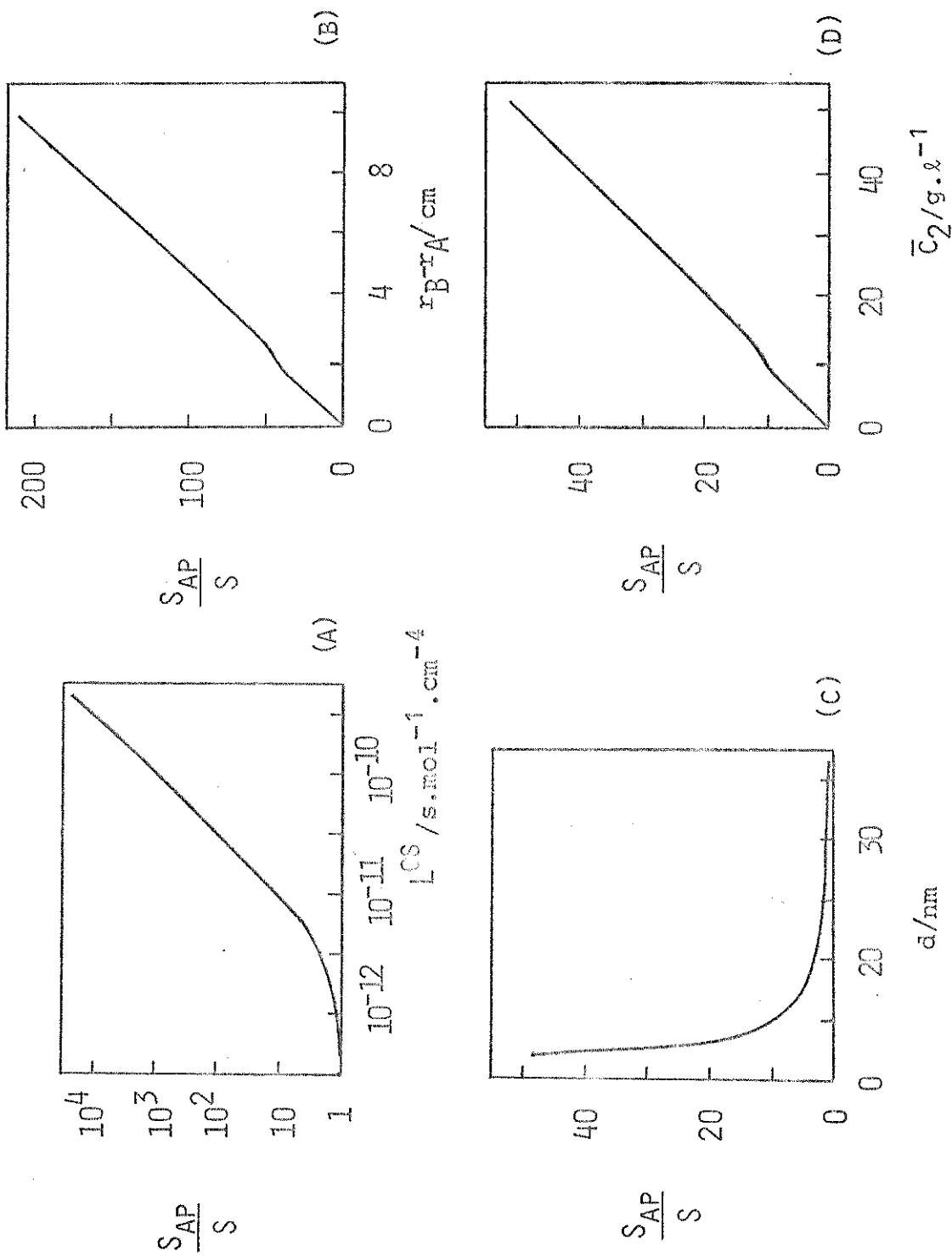


FIGURA 3. Relação entre o coeficiente de sedimentação aparente (em experimentos de osmometri fugação) e o coeficiente de sedimentação real, em função de (a)  $L^{OS}$ , (b) altura da célula  $r_B - r_A$ , (c) diâmetro da partícula  $d$  e (d) concentração média  $\bar{c}_2$ .



partícula.

A equação 71 pode, então, ser escrita como

$$\frac{S_{AP}}{S} = 1 + \frac{18 \eta_{\text{solução}} L^{\text{OS}}}{(\rho_2 - \rho_{\text{solução}}) d^2} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} \bar{v}_1 \frac{(\frac{1}{\rho_1} - \bar{v}_2)}{(\frac{1}{\bar{c}_2} - \bar{v}_2)} (r_B - r_A) \quad (73)$$

ou

$$\frac{S_{AP}}{S} = 1 + \frac{18 \eta_{\text{solução}} L^{\text{OS}}}{[\frac{1}{\bar{v}_2} - \bar{c}_2 (1 - \rho_1 \bar{v}_2) - \rho_1] d^2} \frac{A_{AC}}{A_{AB}} \times \bar{v}_1 \frac{(\frac{1}{\rho_1} - \bar{v}_2)}{(\frac{1}{\bar{c}_2} - \bar{v}_2)} (r_B - r_A) \quad (74)$$

Considerando-se uma célula onde  $A_{AC}/A_{AB} = 10$ ,  $r_B - r_A = 10$  cm e  $L^{\text{OS}} = 2 \times 10^{-11}$  s.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-4</sup> e admitindo  $\bar{v}_2 = 0,734$  cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup> constante, é possível avaliar a variação de  $S_{AP}/S$  com o diâmetro da partícula, em solução 0,01 g.ml<sup>-1</sup> ( $\eta_{\text{solução}} = 0,01$  g.cm<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>), conforme a Figura 3c. A variação de  $S_{AP}/S$  com a concentração de soluto  $\bar{c}_2$ , para partículas de diâmetro da ordem de 4 nm (diâmetro de algumas proteínas globulares) é apresentada na Figura 3d.

A partir da Figura 3 e das equações 71 e 74, é possível tirar as seguintes conclusões:

i) A osmocentrifugação se torna particularmente interessante quando aplicada a partículas pequenas ( $d < 10$  nm);

ii) Como já havia sido comprovado anteriormente<sup>(42)</sup>, em experimentos com dextrana azul e gamaglobulina, o efeito do acoplamento osmótico é mais intenso quanto maior a concentração da solução;

iii) Na construção de células de osmocentrifugação, é aconselhável que o valor de  $A_{AC}/A_{AB}$  seja máximo. O valor de

$S_{AP}/S$  aumenta, também, com a altura da célula. A altura é limitada pelas dimensões da centrífuga, mas verifica-se (Figura 3b) que mesmo em células de 1 cm de altura, o efeito do acoplamento osmótico é ainda bastante significativo ( $S_{AP}/S = 22$ ).

iv) O fator primordial para o bom desempenho da osmocentrifugação é a existência de membranas de alta permeabilidade ( $L^{OS} > 1 \times 10^{-12} \text{ s.mol}^{-1}.\text{cm}^{-4}$ ).

### 3. APLICAÇÃO ANALÍTICA DA OSMOSSEDIMENTAÇÃO: DETERMINAÇÃO DE PESO MOLECULAR

#### 3.1. INTRODUÇÃO

A determinação de peso molecular é muito importante para a identificação de compostos monoméricos, sendo um dado essencial na determinação de suas estruturas moleculares.

Em sistemas polidispersos, como na maioria dos polímeros sintéticos, o peso molecular perde a sua importância no estabelecimento da fórmula molecular mas se torna de grande valia para explicar as variações das propriedades físicas quando as proporções dos componentes de diferentes tamanhos de cadeia variam. Por exemplo, polímeros de pesos moleculares muito baixos não formam filmes, enquanto que a resistência à tração e a elongação até a ruptura aumentam acentuadamente para alguns polímeros na faixa de peso molecular entre 50000 e 200000 daltons. Por outro lado, o aumento do peso molecular provoca um substancial aumento na viscosidade do polímero fundido, dificultando a extrusão e outros processos de fabricação (45).

Assim, o conhecimento da distribuição de pesos moleculares pode fornecer importante informação para a otimização das propriedades físicas de polímeros sintéticos, através do controle das condições de polimerização. A distribuição de pesos moleculares indica as proporções de todas as espécies presentes na amostra, fornecendo uma caracterização praticamente completa de sistemas heterogêneos. Uma caracterização menos completa, mas que pode fornecer informação necessária e suficiente para uma aplicação particular, é obtida pela determinação de uma ou mais médias de peso molecular.

Outras propriedades de polímeros sintéticos que variam com o peso molecular são a temperatura de transição vítrea e a solubilidade, cujo controle se torna importante quando o material é exposto a variações de temperatura ou entra em contato com água e outros solventes.

No caso de polímeros biológicos, a determinação de peso molecular pode ser essencial para a compreensão de suas funções biológicas. Moléculas de proteínas, por exemplo, podem ser comparadas, a princípio, com polímeros sintéticos. Neles, as unidades monoméricas se unem através de ligações covalentes formando estruturas primárias de cadeia longa, que por sua vez podem formar agregados instáveis, de composição variável e, portanto, sem peso molecular definido. Considera-se, assim, o peso molecular do polímero como sendo referente às estruturas não agregadas. Quando se trata de proteínas, porém, em certas condições, alguns agregados bem definidos predominam e são responsáveis por determinadas funções biológicas<sup>(46)</sup>. É o caso da hemoglobina, de peso molecular 67000 daltons, formada por 4 subunidades. Quando dissolvida em solução concentrada de uréia, por exemplo, a proteína se dissocia em 2 metades contendo 2 subunidades cada uma. De acordo com o critério aplicado a polímeros sintéticos, a unidade de 67000 daltons seria apenas um agregado. Porém, os químicos de proteínas a reconhecem como sendo a molécula nativa de hemoglobina, que forma cristais perfeitos, mostrando alto grau de regularidade interna e que funciona como estrutura altamente integrada nos processos biológicos, onde as 4 subunidades presentes se mostram fortemente acopladas.

### 3.1.1. Médias de Pesos Moleculares

Como a maioria das amostras poliméricas contém espécies com diferentes comprimentos de cadeia, medidas de peso molecular fornecem valores médios e a natureza das médias depende das propriedades que estão sendo medidas.

Na determinação de pesos moleculares através das propriedades coligativas de soluções, cada molécula, seja qual for o seu tamanho, contribui igualmente para o efeito observado, de maneira que o mesmo resultado é observado se o peso total do sistema for distribuído igualmente sobre todas as moléculas do sistema<sup>(47)</sup>. Define-se, então, o peso molecular médio em número,  $\bar{M}_n$ , expresso por

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} \quad (75)$$

onde  $M_i$  é o peso molecular de cada componente  $i$  e  $n_i$  é o número de moléculas deste componente presentes. Na determinação de  $\bar{M}_n$  deve-se tomar especial cuidado para evitar a presença de impurezas de baixo peso molecular, que podem alterar significativamente o resultado.

Por outro lado, se a propriedade observada for proporcional ao tamanho das moléculas em solução, obtém-se o peso molecular médio em peso,  $\bar{M}_w$ , definido por

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} \quad (76)$$

onde  $w_i$  é o peso do componente  $i$ . Este tipo de média é mais sensível aos componentes de alto peso molecular. Em sistemas monodispersos  $\bar{M}_w = \bar{M}_n$ , sendo a razão  $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ , uma medida de poli

dispersidade.

Outra média de interesse para a interpretação do comportamento de polímeros em solução<sup>(47,48)</sup> é a chamada média em z, definida por

$$\bar{M}_z = \frac{\sum_i n_i M_i^3}{\sum_i n_i M_i^2} \quad (77)$$

e que é mais sensível ainda a espécies de alto peso molecular que  $\bar{M}_w$ .

O peso molecular médio determinado por viscosimetria  $\bar{M}_v$  pode ser expresso por

$$\bar{M}_v = \left| \frac{\sum_i w_i M_i^a}{\sum_i w_i} \right|^{1/a} \quad (78)$$

onde  $a$  é uma constante para um dado sistema polímero-solvente e varia entre 0,5 e 1,0. Quando  $a = 1$ ,  $\bar{M}_v = \bar{M}_w$ .

Propriedades físicas de polímeros sintéticos são diretamente relacionadas com uma ou outra das diferentes médias de peso molecular<sup>(45,49)</sup>. A viscosidade do polímero fundido é diretamente proporcional a  $\bar{M}_w$ . A resistência à tração parece relacionada a uma média entre  $\bar{M}_n$  e  $\bar{M}_w$ . A resistência ao impacto parece mais relacionada a  $\bar{M}_w$ .

### 3.1.2. Métodos Físicos para Determinação de Peso Molecular

Pesos moleculares de polímeros podem ser determinados a partir de métodos físicos aplicados a soluções diluídas ou por análise química de grupos terminais. Os métodos químicos são viáveis somente para pesos moleculares abaixo de 25000 daltons, enquanto que os físicos podem ser aplicados a políme-

ros de alto peso molecular<sup>(50)</sup>.

Os principais métodos físicos para determinação de peso molecular de polímeros sintéticos e biológicos são osmometria, espalhamento de luz, equilíbrio de sedimentação, velocidade de sedimentação e difusão, viscosidade e cromatografia de permeação em gel. Com exceção dos 2 últimos, todos são métodos absolutos, isto é, que não precisam de calibrações prévias. Além dos referidos acima, alguns métodos, tais como eletroforese em gel de poliacrilamida e poliacrilamida-SDS, são particularmente úteis na determinação de peso molecular de proteínas. Os métodos envolvendo equilíbrio e velocidade de sedimentação serão vistos com maiores detalhes no item 3.1.3. Os princípios dos demais métodos são apresentados a seguir.

#### 3.1.2.1. Osmometria

A pressão osmótica, além de sua importância fisiológica na determinação do fluxo de líquidos em organismos vivos, é de particular interesse na determinação de peso molecular de macromoléculas e no estudo das interações entre elas. As medidas são geralmente úteis em uma faixa de pesos moleculares entre 20000 e 500000 daltons. Acima disso a razão entre pressão osmótica e concentração é muito baixa, de maneira que os erros experimentais são maiores e abaixo desta faixa há limitações das membranas disponíveis<sup>(46)</sup>.

A base para a determinação de pesos moleculares a partir de medidas de pressão osmótica está na equação de van't Hoff, que para um sistema binário ideal é

$$\frac{\pi}{RTc_2} = \frac{1}{M_2} \quad (79)$$

onde  $\pi$  é a pressão osmótica,  $c_2$  é a concentração do soluto,  $M_2$  é o peso molecular,  $T$  é a temperatura absoluta e  $R$  é a constante dos gases ideais.

Assim, se o soluto que não difunde através da membrana semipermeável estiver presente em concentração suficientemente baixa e tiver um comportamento ideal, a pressão osmótica é numericamente igual à pressão que o mesmo número de moléculas de soluto, no mesmo volume, exerceria sobre as paredes do recipiente se estivessem presentes como um gás.

Entretanto, a maioria das soluções macromoleculares desviam bastante da equação de van't Hoff e a pressão osmótica é melhor relacionada ao peso molecular médio em número,  $\bar{M}_n$ , através da expressão

$$\frac{\pi}{c_2} = RT \left( \frac{1}{\bar{M}_n} + B_{OS}c_2 + C_{OS}c_2^2 + \dots \right) \quad (80)$$

onde  $B_{OS}, C_{OS} \dots$  são coeficientes de virial e podem ser determinados experimentalmente.

Macromoléculas carregadas, tais como proteínas e polieletrólitos sintéticos sofrem, normalmente, grandes desvios da idealidade, produzindo pressões osmóticas maiores que o esperado para macromoléculas não carregadas, devido à presença de contraíons ligados ao polímero, que podem provocar um efeito osmótico elevado (efeito Donnan). A adição de sais, aumentando a força iônica do meio, minimiza este efeito, fazendo com que o peso molecular determinado corresponda ao do macroíon somente. A carga do macroíon afeta, também, consideravelmente a inclinação da curva  $\pi/c_2$  versus  $c_2$  e normalmente se minimiza esta carga, por exemplo, ajustando o pH de soluções de proteínas a valores próximos do ponto isoelétrico.



Entre os coeficientes de virial, o segundo,  $B_{OS}$ , é normalmente o único considerado em soluções diluídas. A termodinâmica clássica não fornece nenhuma informação sobre a origem do segundo coeficiente de virial. Interpretações moleculares a seu respeito são fornecidas pela termodinâmica estatística<sup>(51,52)</sup>.  $B_{OS}$  está diretamente relacionado com o volume excluído das moléculas, isto é, o volume da região ao redor do centro de uma dada molécula, onde outras moléculas não podem penetrar<sup>(46)</sup>. A distância entre os centros de duas moléculas esféricas rígidas não pode ser menor que os seus diâmetros, de maneira que uma molécula exclui um volume maior que seu espaço fisicamente ocupado. Quando se consideram moléculas esféricas, rígidas e não interativas, o seu volume excluído é 4 vezes maior que o volume real da molécula. Para moléculas cilíndricas, a não idealidade aumenta com a relação comprimento/diâmetro, sendo o coeficiente de virial uma medida da assimetria das moléculas.

Moléculas flexíveis, porém, como é o caso da maioria dos polímeros em solução, tendem a assumir uma configuração enovelada ao acaso, sendo as dimensões deste novelo altamente sensíveis às interações soluto-soluto, soluto-solvente e solvente-solvente. Assim, no caso de polímeros flexíveis em solução, o segundo coeficiente de virial fornece mais informação sobre as interações que sobre a geometria de partícula. Quanto melhor o solvente, maior o valor de  $B_{OS}$ . Solventes pobres podem fornecer valores negativos de  $B_{OS}$ .

### 3.1.2.2. Espalhamento de luz

Todo meio material que refrata luz também

a espalha devido ao campo rapidamente alternado da luz, que incidindo sobre as moléculas as transforma em dipolos elétricos oscilantes, que emitem radiações em todas as direções. Moléculas perfeitamente arranjadas, como em um cristal perfeito a 0 K, produzem um espalhamento total nulo, devido à interferência destrutiva de suas vizinhas. O mesmo aconteceria em solução se não houvesse flutuações de concentração<sup>(46)</sup>.

Em uma solução macromolecular, a intensidade espalhada está relacionada com a concentração, com o peso molecular da amostra e, também, com a diferença entre os índices de refração do polímero e do solvente. Um critério importante na escolha de um solvente para medidas de espalhamento de luz é que o seu índice de refração difira substancialmente daquele da amostra.

A equação básica para medidas de espalhamento de luz, a partir da qual se determina  $\bar{M}_w$  é análoga à de van't Hoff para osmometria:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{l}{\bar{M}_w P(\theta)} + \frac{B_{LS} c}{RT} \quad (81)$$

onde K é uma constante para uma série de medidas e é calculada a partir do índice de refração do solvente e do comprimento de onda da luz incidente; c é a concentração do soluto;  $R_\theta$  é a intensidade da luz espalhada no ângulo  $\theta$ , observada experimentalmente;  $P(\theta)$  é uma função do ângulo de medida e do tamanho das moléculas dissolvidas, tendo um valor unitário a ângulo zero e valores progressivamente menores, que podem ser calculados, para ângulos maiores e pesos moleculares crescentes. O coeficiente de virial  $B_{LS}$  é duas vezes maior que aquele determinado por pressão osmótica, quando se consideram os volumes específicos

parciais de cada componente da solução independentes da concentração e pressão (53,54).

A determinação de peso molecular, de maneira simplificada, envolve a medida de intensidade da luz espalhada em um ângulo (usualmente  $90^\circ$ ) para uma série de concentrações. Após a avaliação de K, um gráfico do primeiro termo da equação contra concentração produz uma linha reta que pode ser extrapolada à concentração zero. Esta intersecção fornece o valor de  $\frac{1}{M_w P(\theta)}$ .

Um procedimento largamente utilizado, porém, consiste na dupla extrapolação de valores de  $(Kc/R_\theta)$ , medidos a várias concentrações e ângulos, à concentração zero e ângulo zero. O diagrama resultante é chamado gráfico de Zimm (55).

O método é normalmente aplicado a amostras de peso molecular superior a 10000 daltons e sua sensibilidade aumenta com o peso molecular.

### 3.1.2.3. Viscosimetria

Viscosimetria é um dos métodos mais largamente utilizados para caracterização de polímeros devido à rapidez e simplicidade experimental (45). Entretanto, é um método relativo, que requer calibração para cada tipo de polímero e cada solvente usado, em uma faixa de pesos moleculares que permita estabelecer uma curva de calibração confiável.

Determinam-se as viscosidades de soluções de diferentes concentrações, comparando-as com a viscosidade do solvente,  $\eta_0$ , e obtendo-se o valor da viscosidade específica,

$\eta_{sp}$ :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (82)$$

Devido a interações entre moléculas,  $\eta_{sp}/c$  é dependente da concentração e um gráfico de  $\eta_{sp}/c$  contra  $c$  fornece normalmente uma linha reta que permite extrapolação à concentração infinita. Obtêm-se, então, o valor da viscosidade intrínseca,  $[\eta]$ :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (83)$$

A viscosidade intrínseca é relacionada ao peso molecular da amostra pela equação 84

$$[\eta] = K \bar{M}_V^a \quad (84)$$

onde  $K$  e  $a$  são constantes para um determinado sistema polímero-solvente, determinadas experimentalmente por calibrações com amostras de peso molecular conhecido.

#### 3.1.2.4. Cromatografia de permeação em gel

Métodos envolvendo peneiras moleculares vêm sendo extensivamente usados para fracionamento, determinação de peso molecular e estudo de interações entre macromoléculas.

A cromatografia de permeação em gel utiliza uma coluna cromatográfica empacotada com partículas porosas de um material formador de gel. O tamanho do poro é da mesma ordem das dimensões do novelo do polímero. Quando uma solução de polímero é introduzida na coluna, as moléculas podem se difundir pela estrutura porosa. A difusão de moléculas grandes de polímero, entretanto, é restrita pelo tamanho de poro disponível. Algumas são completamente excluídas dos poros e eluídas

da coluna em primeiro lugar. Moléculas menores têm maior tempo de residência devido à sua habilidade em penetrar o interior das partículas porosas. Os tempos de retenção das diferentes espécies variam inversamente com os tamanhos moleculares. A detecção do polímero eluído pode ser feita por métodos espectrofotométricos<sup>(56)</sup>.

Variando-se o material formador de gel, é possível separar e estudar por cromatografia solutos de peso molecular entre algumas centenas até milhões de daltons. Porém estes materiais devem obedecer aos seguintes critérios: (i) ter forte afinidade pelo solvente, (ii) baixa afinidade pelo soluto e (iii) o gel deve ser suficientemente rígido para suportar o empacotamento na coluna e o fluxo de solvente<sup>(57)</sup>. Um certo número de materiais satisfazem o critério acima, por exemplo, dextranas reticuladas (Sephadex, Sephacryl), poliacrilamida (Bio-gel), agarose (Sephacrose), vidro poroso (Bio-glass) e géis de poliestireno (Styragel).

A cromatografia de permeação em gel tem papel importante na purificação e caracterização de milhares de enzimas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e outras macromoléculas biológicas. Tais macromoléculas formam uma classe de substâncias com funções especiais, controladas "in vivo" por pequenas variações do meio. Mudanças de pH, concentração de íons metálicos, etc., podem ter efeitos pronunciados sobre as moléculas estudadas. A cromatografia em gel permite a determinação de peso molecular ou tamanho de proteínas nativas ou desnaturadas sob uma variedade de condições de pH, força iônica, temperatura, etc. Os únicos requisitos são uma coluna empacotada com o gel apropriado e uma série de proteínas pa-

drões para calibrá-las.

O método vem tendo aplicação crescente também no fracionamento e determinação de peso molecular de polímeros sintéticos, embora não seja muito apropriado para separação de polímeros de alto peso molecular<sup>(58,59)</sup>.

### 3.1.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese é definida como a migração de partículas sob a influência de um campo elétrico, podendo ser efetuada na ausência ou na presença de um meio estabilizante, que evite convecção. Entre os meios estabilizantes mais utilizados estão acetato de celulose, agar, gel de amido e poliacrilamida. A presença destes materiais na eletroforese evita problemas na estabilização das fronteiras de migração de íons.

O gel de poliacrilamida tem aplicação largamente difundida na caracterização de amostras de proteínas, apresentando várias vantagens sobre os demais suportes para eletroforese. É um gel flexível e transparente e pode ser utilizado em uma larga faixa de concentração. Se a concentração do gel for baixa, proteínas distintas são diferenciadas somente com base na densidade e distribuição de carga. Porém, se a concentração do gel for suficiente para "peneirar" as moléculas, as suas mobilidades serão influenciadas, também, pelo tamanho molecular<sup>(60)</sup>.

Juntamente com a amostra de proteínas, é introduzido na coluna de gel um corante (normalmente azul de bromofenol para sistemas aniônicos e verde de metila para sistemas catiônicos) e a eletroforese é efetuada até que este marcador atinja o fundo da coluna. As posições finais de cada pro-

teína são detectadas visualmente, através da imersão do gel em uma solução de revelador (amido black, ácido periódico, etc.).

Os pesos moleculares de proteínas podem ser estimados a partir de mobilidades relativas ( $m_R$ ) em diferentes concentrações de gel <sup>(61)</sup>, utilizando-se a equação

$$\log m_R = -K_R c_G + \log m_0 \quad (85)$$

onde  $c_G$  é a concentração do gel,  $m_0$  é a mobilidade relativa à concentração zero e  $K_R$  é o coeficiente de retardamento.  $m_0$  é uma função da proteína e depende da carga, forma e tamanho.  $K_R$  depende do grau de reticulação do sistema, da forma das moléculas e do peso molecular. Fazendo-se um gráfico de  $\log m_R$  de proteínas-padrão contra concentração de gel, se obtêm linhas retas de declividade  $-K_R$ . O gráfico de  $K_R$  contra peso molecular fornece uma linha reta a partir da qual se pode obter o peso molecular de proteínas desconhecidas.

### 3.1.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS

O detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) dissocia proteínas em suas cadeias polipeptídicas constituintes. A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS separa as cadeias polipeptídicas de proteínas de acordo com seus pesos moleculares. A técnica é particularmente útil para análise de sistemas multicomponentes tais como enzimas complexas, vírus e membranas, que são frequentemente difíceis de dissociar por outros métodos <sup>(61)</sup>.

Embora  $m_0$  em geis de poliacrilamida seja função da proteína, na presença de SDS,  $m_0$  é aproximadamente

constante<sup>(62)</sup>, independentemente da proteína e do peso molecular. Assim, se o grau de reticulação e o fator forma são mantidos constantes,  $\log m_R$  é função direta do peso molecular.

O método é relativamente simples e rápido requer equipamento não muito caro e quantidades da ordem de microgramas de proteínas. Os resultados são reprodutíveis e diferem no máximo em 10% dos pesos moleculares obtidos por outros métodos para proteínas entre 15000 e 200000 daltons.

### 3.1.3. Ultracentrifugação Analítica

Na superfície terrestre, todos os objetos estão sujeitos a uma força dirigida para o centro da Terra igual à sua massa multiplicada por  $1 g$ , onde  $g$  é  $9,80 \text{ m/s}^2$ . Esta força gravitacional é responsável por fenômenos bem conhecidos. Por exemplo, a formação de depósitos de argila se deve à sedimentação de partículas carregadas pela água dos rios.

Quando uma partícula se movimenta em um meio viscoso, ela está sujeita também a uma força de atrito contrária ao seu movimento e proporcional à sua velocidade. Quando a partícula adquire uma velocidade tal que a força de atrito anula a força gravitacional, ela passa a se movimentar com velocidade constante.

Medidas de velocidade de sedimentação de partículas suspensas em um líquido ou em um gás sob gravidade foram realizadas no início do século<sup>(63-65)</sup> com o objetivo de determinar tamanho de partículas, conhecendo-se o coeficiente de atrito, a densidade da partícula e do meio. Porém, a intensidade do campo gravitacional terrestre impôs um limite bem definido à aplicação destes métodos de medida. Somente partículas re



lativamente grandes e de densidades elevadas podiam ser estudadas desta maneira. Para a investigação de colóides e polímeros em solução, foi necessário aumentar muitas vezes a intensidade do campo inercial. A primeira tentativa neste sentido foi conduzida por Dumansky<sup>(66)</sup> em 1913, utilizando centrífugas comuns de laboratório. O campo gerado em uma centrífuga é semelhante ao campo gravitacional; entretanto, sua intensidade pode ser muitas vezes superior. Os resultados de Dumansky, porém, foram insatisfatórios, devido a problemas de convecção.

Em 1923, Svedberg e Nichols<sup>(67)</sup> construíram uma centrífuga óptica (campo inercial = 150 g), onde a sedimentação de partículas era acompanhada por observação direta ou por fotografias. O sistema foi posteriormente aperfeiçoado por Svedberg e Rinde<sup>(68)</sup> introduzindo as células em forma de vetor para evitar convecção e dando origem à primeira "ultracentrífuga" (campo inercial = 5000 g), assim chamada por permitir o "estudo de partículas que não podiam ser vistas no ultramicroscópio"<sup>(69)</sup>. O objetivo inicial era o estudo de sóis de ouro, mas logo se verificou, que o instrumento era potencialmente útil para a investigação de proteínas, desenvolvendo-se a ultracentrífuga para uso em velocidades de rotação cada vez mais altas. Atualmente, o nome "ultracentrífuga" foi generalizado para centrífugas de alta velocidade, independentemente da presença ou não de sistema óptico.

O movimento de moléculas ou partículas pequenas suspensas em uma solução, expostas à ação de um campo inercial, não é determinado somente pela sua sedimentação, mas também pela difusão. Quando há variações de concentração entre pontos distintos de um sistema, a difusão tende a minimizá-las, resta-

belecendo a igualdade de concentrações. Se uma solução é mantida sob ação do campo inercial por um tempo suficientemente longo, o estado de equilíbrio de sedimentação-difusão é alcançado. Isto significa que, durante um intervalo de tempo, a quantidade de moléculas que deixa uma região do sistema devido à sedimentação é igual àquela que migra em direção à mesma região devido à difusão. De maneira análoga, a atmosfera ao redor da Terra é impedida de se difundir indefinidamente em direção ao espaço devido à ação da sedimentação, enquanto que a difusão evita que ela se deposite como uma densa capa em torno do planeta<sup>(70)</sup>.

O peso molecular de polímeros em solução pode ser determinado, medindo-se a velocidade de sedimentação das macromoléculas em um campo inercial ou através da determinação da distribuição das macromoléculas no equilíbrio de sedimentação-difusão.

### 3.1.3.1. Velocidade de Sedimentação

A força centrífuga que atua sobre um mol de macromoléculas em solução<sup>(71)</sup>, sob ação de um campo inercial é  $M_2 (1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2 r$ , onde  $M_2$  é o peso molecular,  $\rho$  é a densidade da solução,  $\bar{v}_2$  é o volume específico parcial do soluto,  $\omega$  é a velocidade e  $r$  é a distância do eixo de rotação;  $(1 - \bar{v}_2 \rho)$  é o fator de flutuação devido ao empuxo.

A força de atrito é  $f \frac{dr}{dt}$ , onde  $f$  é o coeficiente de atrito por mol e  $t$  é o tempo. Igualando as duas forças, obtém-se<sup>(71)</sup>

$$M_2 (1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2 r = f \frac{dr}{dt} \quad (86)$$

e para uma solução diluída

$$f = \frac{RT}{D} \quad (87)$$

onde  $D$  é o coeficiente de difusão.

Considerando-se que o coeficiente de atrito efetivo na difusão é o mesmo que atua na sedimentação, obtêm-se

$$M_2 = \frac{RT}{D(1 - \bar{v}_2\rho)} \frac{dr/dt}{\omega^2 r} = \frac{RTS}{D(1 - \bar{v}_2\rho)} \quad (88)$$

onde  $S$  é o coeficiente de sedimentação, que é característico para uma espécie molecular em um dado sistema, em uma dada temperatura. Esta é a fórmula fundamental para cálculo de peso molecular a partir da velocidade de sedimentação. Para isto, determina-se, experimentalmente, além da velocidade de sedimentação do soluto em um campo inercial conhecido, o coeficiente de difusão, o volume específico parcial do soluto e a densidade da solução.

O fluxo de massa de soluto,  $J_S$ , durante a sedimentação pode ser descrito pela termodinâmica dos processos irreversíveis<sup>(1)</sup>, como sendo proporcional ao gradiente de potencial químico ao longo da coluna, de acordo com a equação fenomenológica 46

$$J^{SD} = - L^{SD} \frac{d\mu_2}{dr}$$

onde  $L^{SD}$  é o coeficiente de Onsager e o potencial químico do soluto,  $\mu_2$ , é dado pela equação 48:

$$\mu_2(r) = \mu_2^0 + RT \ln c_2 - M_2 (1 - \bar{v}_2\rho) \frac{\omega^2 r^2}{2}$$

onde  $c_2$  é a concentração do soluto.

Derivando a equação 48 com respeito a  $r$  obtêm-se

$$-\frac{d\mu_2(r)}{dr} = -RT \frac{d \ln c_2}{dr} + M_2(1 - \bar{v}_2\rho)\omega^2 r \quad (89)$$

e introduzindo a equação 89 na equação 46, obtêm-se

$$J^{SD} = L^{SD} M_2(1 - \rho\bar{v}_2)\omega^2 r - L^{SD} \frac{RT}{c_2} \frac{dc_2}{dr} \quad (90)$$

Mas, pelas eqs. 51 e 52,

$$D = L^{SD} \frac{RT}{c_2} \quad \text{e} \quad S = \frac{L^{SD} M_2(1 - \bar{v}_2\rho)}{c_2}$$

Portanto,

$$J^{SD} = Sc_2\omega^2 r - D \frac{dc_2}{dr} \quad (91)$$

Em uma coluna vertical de uma solução homogênea sendo o soluto mais denso que o solvente ( $S$  positivo), inicialmente, o fluxo de soluto para baixo é igual a  $Sc_2\omega^2 r$ . Este fluxo diminui à medida que um gradiente de concentração ao longo da coluna vai se desenvolvendo e se anula quando a contribuição da difusão é tal que  $Sc_2\omega^2 r = D \frac{dc_2}{dr}$ . Alcança-se neste ponto o estado de equilíbrio de sedimentação-difusão.

### 3.1.3.2. Aproximação ao Equilíbrio de Sedimentação

Archibald<sup>(72)</sup> propôs um método que permite a determinação de peso molecular antes que o equilíbrio seja alcançado, baseado no fato de que as moléculas não podem ultrapassar os extremos da célula e, assim, os fluxos de moléculas no menisco e no fundo são iguais a zero. O peso molecular pode ser calculado, conhecendo-se os gradientes de concentração nos extremos da célula. Uma das maiores desvantagens do método, porém, é que a determinação de gradientes de concentra-

ção nos extremos da célula nem sempre pode ser efetuada com grande precisão.

### 3.1.3.3. Equilíbrio de Sedimentação-Difusão

O método de equilíbrio de sedimentação tornou-se uma das técnicas mais importantes para a determinação de peso molecular, por ser baseado em firmes fundamentos termodinâmicos. Muitas das suposições necessárias e implícitas no método de velocidade de sedimentação estão ausentes no tratamento teórico do equilíbrio de sedimentação, tornando o método mais exato<sup>(73,74)</sup>.

No equilíbrio, todas as forças motrizes se compensam e  $d\mu/dr = 0$  para todos os componentes em todos os pontos da solução e a partir da equação 89:

$$-\frac{d\mu_2(r)}{dr} = 0 = -RT \frac{d \ln c_2}{dr} + M_2(1 - \bar{v}_2\rho)\omega^2 r .$$

A equação rearranjada

$$\frac{d \ln c_2}{dr^2} = \frac{M_2(1 - \bar{v}_2\rho)\omega^2}{2 RT} \quad (92)$$

é conhecida como equação barométrica e descreve o gradiente de concentração que caracteriza o estado de equilíbrio de sedimentação-difusão de um sistema, permitindo a determinação do peso molecular do soluto, a partir de observações de  $c_2$  em função de  $r$ .

Admitindo que  $\bar{v}_2\rho$  é constante a diferentes valores de  $r$  e levando em consideração a conservação de massa<sup>(75)</sup> a equação 92 pode ser integrada, obtendo-se

$$M_2 = \frac{2 RT}{\omega^2 (1 - \bar{v}_2\rho) (r_F^2 - r_T^2)} \frac{(c_{2F} - c_{2T})}{\bar{c}_2} \quad (93)$$

onde os índices F e T se referem, respectivamente ao fundo e topo da célula e  $\bar{c}_2$  é a concentração média de soluto na célula.

Utilizando o método de equilíbrio de sedimentação e com o desenvolvimento das ultracentrífugas foram verificados por Svedberg dois aspectos críticos no estudo de proteínas: elas são macromoléculas e são em grande maioria monodispersas. Até então, as proteínas eram encaradas como agregados de moléculas muito menores, formando partículas de massa indefinida.

Desde os primeiros estudos de Svedberg o procedimento clássico após o isolamento de uma proteína passou a ser a demonstração de sua homogeneidade e a determinação de seu peso molecular por medidas de velocidade de sedimentação e difusão ou por equilíbrio de sedimentação.

Atualmente, porém, a determinação física do peso molecular é apenas um dos estágios da análise de proteínas. Alguns métodos específicos para proteínas, tais como eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS e determinação de sequência de aminoácidos, surgiram como alternativas importantes às técnicas tradicionais. Os métodos de sedimentação, contudo, ainda mantêm seu papel de destaque no estudo dos vários estados de agregação que as cadeias de proteína podem assumir, reversível ou irreversivelmente<sup>(76)</sup>. Além disso, a análise por sedimentação é imprescindível na caracterização de macromoléculas polidispersas, tais como polissacarídeos e polímeros sintéticos<sup>(77,78)</sup>, que não são constituídos por subunidades homogêneas e estruturalmente específicas como as cadeias polipeptídicas das proteínas.

## SOLUTOS POLIDISPERSOS

Se uma mistura de componentes, cada um se comportando idealmente, é analisada por equilíbrio de sedimentação<sup>(74)</sup>, as equações 92 e 93 fornecem o peso molecular médio em peso. Os valores médios  $\bar{M}_n$  e  $\bar{M}_z$  podem, também, ser obtidos a partir das seguintes equações:

$$\bar{M}_n = \frac{c_2(r)}{\int_0^{c_2} \frac{dc_2(r)}{\bar{M}_w}} \quad (94)$$

$$\bar{M}_z = \frac{2 RT}{(1 - \bar{v}_2 \rho) \omega^2} \frac{d \ln (c_2 \bar{M}_w)}{dr^2} \quad (95)$$

onde  $c_2(r)$  é a concentração do soluto em um ponto cuja distância do eixo de rotação é  $r$ .

Dois pontos práticos, porém, devem ser salientados: (i) o cálculo de  $\bar{M}_z$  requer a segunda derivada de  $\ln c$  versus  $r^2$ , o que é difícil de fazer com precisão elevada; (ii) para obter  $\bar{M}_n$  se deve integrar a partir da concentração zero. Isto só é possível quando a centrifugação é realizada a alta velocidade, de maneira que  $c_2$  tenda a zero no menisco.

Uma avaliação das diferentes médias calculadas pelas equações 93, 94 e 95 pode dar informação a respeito da polidispersidade da amostra, uma vez que para solutos monodispersos e ideais  $\bar{M}_w = \bar{M}_n = \bar{M}_z$ . Solutos monodispersos e ideais são caracterizados por uma linha reta, quando  $\ln c_2$  é colocado em gráfico contra  $r^2$ . O inverso, porém, pode não ser verdadeiro. Quando se têm solutos polidispersos e não-ideais, a curvatura para cima produzida pela polidispersidade pode ser compensada por uma curvatura para baixo devido à não idealida-

de, fornecendo um gráfico linear de  $\ln c_2$  contra  $r^2$ .

#### SOLUTOS MONODISPERSOS NÃO-IDEAIS

A maioria das proteínas globulares apresenta um comportamento muito próximo da idealidade, especialmente, em concentrações baixas. Entretanto, mesmo soluções de proteínas, em certas situações podem sofrer desvios apreciáveis do comportamento ideal, por exemplo, (i) proteínas com moléculas altamente assimétricas, tais como miosina, (ii) proteínas altamente carregadas em água ou em solução tampão muito diluída e (iii) proteínas dissolvidas em solventes desnaturantes, tais como o cloreto de guanidíneo e a uréia<sup>(74)</sup>.

Polímeros sintéticos podem apresentar comportamento bastante não-ideal, dependendo do solvente e da temperatura em que são investigados.

Para solutos monodispersos não-ideais, o valor calculado a partir da equação 93 é um peso molecular aparente, que depende da concentração<sup>(53,74,75)</sup>. Esta dependência é usualmente expressa<sup>(74)</sup> em termos de uma expansão de virial:

$$\frac{1}{M_{2ap}} = \frac{1}{M_2'} + B_{SD} c_2 \quad (96)$$

onde  $B_{SD}$  é o coeficiente de virial determinado por equilíbrio de sedimentação-difusão;  $c_2$  é a concentração do soluto e  $M_{2ap}$  é o peso molecular aparente do soluto nesta concentração.

Uma extrapolação de  $1/M_{2ap}$  até concentração zero fornece o valor do peso molecular real,  $M_2'$ .



## SOLUTOS POLIDISPERSOS E NÃO-IDEAIS

A grande maioria dos polímeros sintéticos são polidispersos e se comportam de maneira não-ideal em solução. Para eles, a teoria é mais complexa<sup>(79)</sup>, pois a distribuição dos componentes de diferentes pesos moleculares em cada altura da célula de sedimentação diferirá daquela da amostra original e a correção com respeito à não-idealidade depende tanto da concentração total como da distribuição de pesos moleculares em cada ponto.

Há uma tendência em aplicar a equação 96 para soluções não-ideais de solutos polidispersos, simplesmente substituindo  $M_2'$  por  $\bar{M}_w$  e considerando o coeficiente de virial  $B_{SD}$  igual a  $B_{LS}$ . Fujita<sup>(80)</sup> demonstrou que a extrapolação do peso molecular aparente através da equação 96 fornece realmente  $\bar{M}_w$ . O coeficiente de virial obtido, porém, difere de  $B_{LS}$ . Quando o peso molecular médio  $\bar{M}_z$  for disponível,  $B_{SD}$  pode ser relacionado a  $B_{LS}$ <sup>(53)</sup>, através da expressão

$$B_{LS} = \frac{B_{SD}}{1 + \frac{1}{12} \left[ \frac{\bar{M}_z (1 - \bar{v}_2 \rho) (r_F^2 - r_T^2) \omega^2}{2 RT} \right]^2} \quad (97)$$

onde  $r_F$  e  $r_T$  se referem respectivamente ao fundo e ao topo da célula de sedimentação. A expressão, porém, é aproximada e válida somente quando

$$\left[ \frac{\bar{M}_z (1 - \bar{v}_2 \rho) (r_F^2 - r_T^2) \omega^2}{2 RT} \right]$$

for próximo de 1.

TEMPO REQUERIDO PARA O ALCANCE  
DO EQUILÍBRIO

A maior limitação do método de equilíbrio de sedimentação-difusão é o tempo necessário para obter, com um erro desprezível, o gradiente de concentração do equilíbrio.

Mason e Weaver<sup>(81)</sup>, em 1924, resolveram uma equação diferencial para a sedimentação de um soluto ideal no campo gravitacional. A partir daí, Weaver<sup>(82)</sup> calculou o limite superior para o tempo de alcance do equilíbrio como sendo igual a duas vezes o tempo necessário para a sedimentação de partículas do menisco ao fundo da coluna vertical. A teoria de Mason e Weaver foi estendida para a ultracentrífuga por van Holde e Baldwin<sup>(83)</sup> em 1958, verificando<sup>(75)</sup> que o estado de equilíbrio poderia ser mais rapidamente alcançado se (i) a coluna de solução fosse a mais curta possível e (ii) se a centrífuga operasse em velocidade de rotação máxima.

Operando a centrífuga em condições, nas quais

$$\frac{RT}{M_2(1 - \bar{v}_2\rho)\omega^2 \bar{r} h} > 0.6$$

onde  $\bar{r}$  é a distância entre o eixo de rotação e o meio da célula de sedimentação e  $h$  é a altura da coluna, a equação de van Holde e Baldwin pode ser escrita de maneira aproximada<sup>(84)</sup> como

$$t_{0,1\%} \cong 0,7 h^2/D \quad (98)$$

onde  $t_{0,1\%}$  é o tempo requerido para que a concentração de soluto seja 0,1% do seu valor de equilíbrio em qualquer ponto da célula. Neste caso, o tempo passa a ser praticamente independen

te da velocidade de rotação, mas a altura da coluna de solução ainda é o fator de influência preponderante. Por exemplo, para uma solução de albumina bovina ( $D = 6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ )<sup>(85)</sup>,  $t_{0,1\%} = 29$  horas em uma coluna de 3 mm, mas  $t_{0,1\%} = 120$  dias em uma coluna de 3 cm.

Assim, a utilização de colunas extremamente curtas (normalmente menores que 3 mm) passou a ser condição essencial para tornar o método de equilíbrio de sedimentação viável. A utilização de colunas curtas, porém, implica desvantagens, tais como menor precisão e menor sensibilidade à polidispersidade e a comportamentos não-ideais<sup>(86-88)</sup>.

Algumas propostas foram feitas com o objetivo de reduzir ainda mais o tempo de um experimento de equilíbrio de sedimentação. Pasternak e colaboradores<sup>(89)</sup> verificaram que o tempo era reduzido com o uso de células de fronteira sintética. Hexner<sup>(88)</sup>, Richards<sup>(90)</sup> e colaboradores sugeriram iniciar os experimentos com velocidades de rotação superiores até a formação de um gradiente de concentração adequado e, então, reduzir a velocidade até as condições desejadas. Tais artifícios, porém, não dispensam o uso de colunas curtas.

Yphantis<sup>(91)</sup> propôs um método de equilíbrio em velocidade de rotação elevada, utilizando colunas curtas e soluções diluídas. Nestas condições, a concentração próxima ao menisco se torna desprezível em comparação à concentração inicial. As concentrações na célula podem ser determinadas simplesmente como sendo proporcionais às diferenças de índice de refração entre a região do menisco e os pontos de interesse. O método requer um tempo relativamente pequeno para o alcance do equilíbrio de sedimentação. Permite o cálculo de  $\bar{M}_n$ ,

além de  $\bar{M}_w$  e  $\bar{M}_z$ , que podem, também, ser obtidos através dos métodos de baixa velocidade. Porém, o método de Yphantis tem precisão apenas moderada, sua aplicação a sistemas polidispersos, com distribuições largas de peso molecular, é limitada, sendo bastante sensível à presença de contaminantes de baixo peso molecular, que podem mascarar o resultado global<sup>(92)</sup>.

A osmossedimentação permite que o equilíbrio de sedimentação seja alcançado em um tempo relativamente curto, mesmo em colunas longas, sob gravidade. Sua aplicação ao estudo de polímeros de peso molecular entre 40000 e 200000 daltons, em centrífugas de baixa velocidade de rotação, é demonstrada neste capítulo, a seguir.

### 3.2. PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS

#### 3.2.1. Materiais e Equipamento

##### Materiais:

Acetato de celulose Carlo Erba (53% de ácido acético combinado,  $\bar{M}_v = 3 \times 10^4$ ).

Ácido acético glacial Mallinckrodt e Quimis.

Acetona PA-ACS Carlo Erba.

Albumina bovina A-7638 Sigma, lot 121 F-9325.

(livre de globulinas)

A-2153 Sigma - lot 41F-0059

(96-99% de albumina e o restante de globulinas).

Ovalbumina A-5503 Sigma, lot 108C - 8135.

Gamaglobulina 82-042-3 Pentex-Miles Laboratories, lot 1012.

Sephadex G-100 Pharmacia nº 17-0060-02.

Equipamento :

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

Espectrofotômetro UV-visível Zeiss PMQ-II.

Espectrofotômetro UV-visível Micronal B 382, acoplado a registrador da Instrumentos Científicos CG Ltda.

Osciloscópio Tektronix 7623 A (com memória).

Densímetro PAAR-DMA 60/602.

3.2.2. Preparação das Membranas

As membranas utilizadas nos experimentos de osmo-centrifugação são membranas assimétricas de acetato de celulose preparadas a partir das seguintes soluções, de acordo com procedimento desenvolvido em nosso laboratório<sup>(39-41)</sup>:

solução A	11% (m/m) de acetato de celulose
	23% (m/m) de água bidestilada
	43% (m/m) de acetona
	23% (m/m) de ácido acético glacial
solução B	11% (m/m) de acetato de celulose
	23% (m/m) de água bidestilada
	13% (m/m) de acetona
	53% (m/m) de ácido acético glacial.

Para a preparação das membranas, as soluções foram espalhadas sobre uma placa de vidro, provida de dois fios de níquel-cromo de 0,4 mm de espessura (fio nº 26), esticados para possibilitar o controle de uniformidade da espessura do filme. Para espalhar as soluções, foi utilizado um bastão de vidro, que corria sobre os fios. Deixou-se o solvente evaporar por 10 minutos, introduzindo-se, então, a placa em um recipiente com

água filtrada, para que o polímero coagulasse, a T ambiente.

Membranas preparadas a partir da solução B têm maior permeabilidade à água, porém têm corte de peso molecular mais elevado e foram utilizadas somente nos experimentos com gamaglobulina.

### 3.2.3. Células de Osmocentrifugação

O início do trabalho foi dedicado à construção e avaliação das células que mais se adequassem aos experimentos de osmocentrifugação. As células utilizadas em experimentos de osmossedimentação, sob gravidade, eram confeccionadas com acrílico, porém após certo tempo de uso em centrífuga o material deformava, provocando vazamentos.

Nas experiências com albumina bovina, utilizaram-se as células descritas na Figura 4, onde as placas de acrílico foram substituídas por placas de alumínio de 1 cm de espessura, com janelas de acrílico de 1 mm de espessura coladas sobre o alumínio. As placas de alumínio foram escavadas, permitindo a formação de dois compartimentos de  $4,8 \text{ cm}^3$  cada um, revestidos com resina epoxi. A área útil de membrana foi de  $12,0 \text{ cm}^2$ . As placas foram parafusadas, colocando-se entre elas a membrana e guarnições de PVC (poli(cloreto de vinila)).

As células de alumínio ainda apresentaram problemas de vazamento, exigindo uma montagem cuidadosa, além de exigirem constante manutenção do revestimento de epoxi, uma vez que algumas proteínas sofrem alterações quando em contato com superfícies metálicas. Tais problemas foram eliminados, construindo-se as células de poliéster reforçado com fibra de vidro, descritas na Figura 5, com compartimentos de  $4,5 \text{ cm}^3$  cada

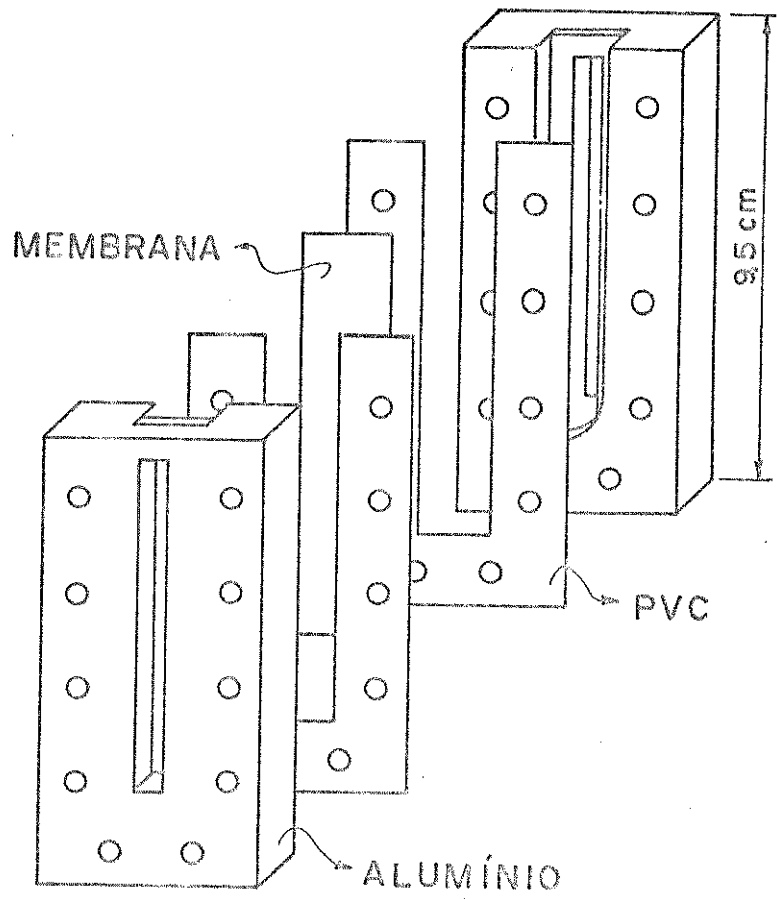


FIGURA 4. Células de alumínio para osmocentrifugação.

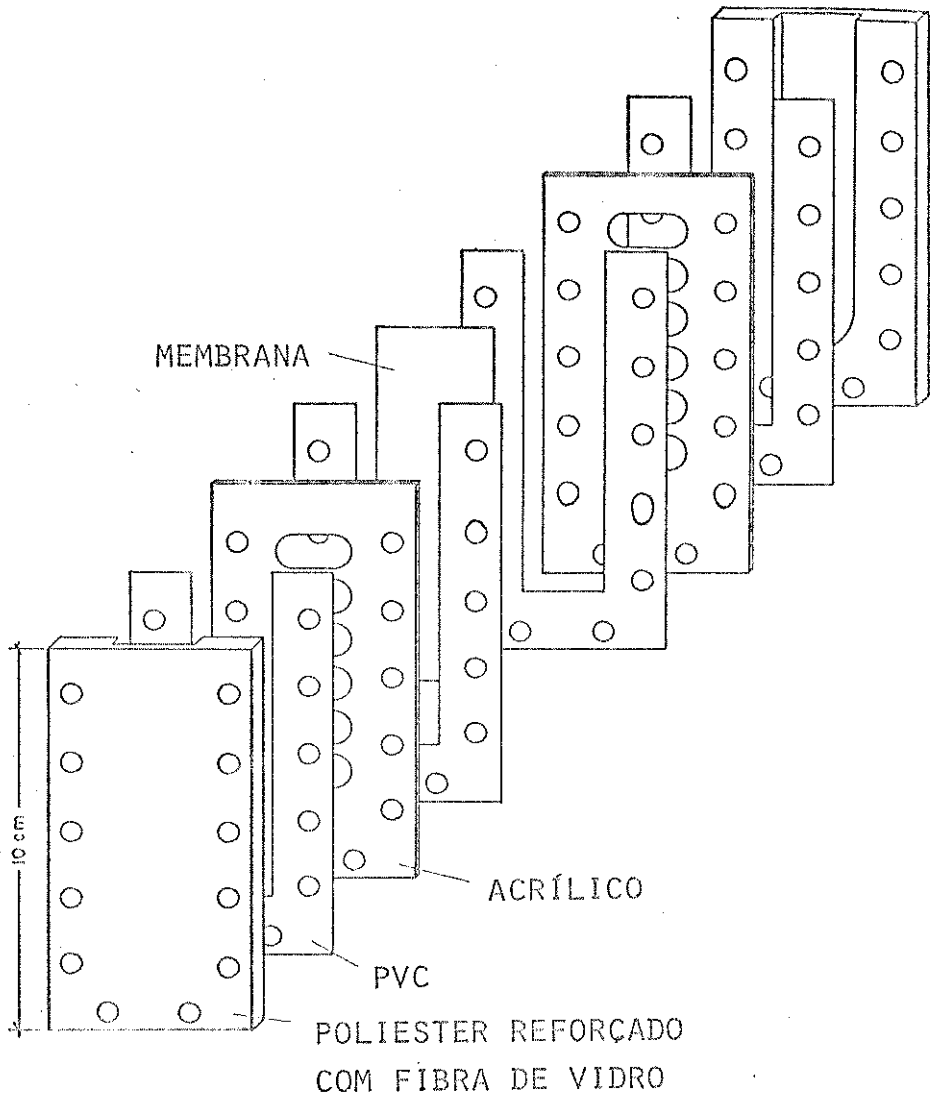


FIGURA 5. Células de poliéster reforçado com fibra de vidro para osmocentrifugação.



um, separados por 15 cm<sup>2</sup> de membrana. O material translúcido dispensou o uso das janelas de acrílico.

#### 3.2.4. Calibração da Centrífuga

Para verificar a confiabilidade do medidor de velocidade da centrífuga, fez-se uma calibração, utilizando um osciloscópio e a montagem da Figura 6. O centro do rotor foi revestido com fita isolante preta e sobre ela foi colocada uma pequena tira de alumínio. Logo acima da tira de papel de alumínio, foi posicionada uma fotocélula, utilizando-se um projetor para iluminar o rotor e uma lente entre os dois, para focalizar a luz sobre a tira de alumínio. A fotocélula foi ligada ao osciloscópio, de maneira a responder cada vez que a tira de alumínio fosse iluminada durante a rotação do rotor. Obtiveram-se, assim, picos consecutivos no visor do osciloscópio e a distância entre eles, através de comparação com a frequência da rede (60 Hz), permitiu a determinação da velocidade angular do rotor.

Os valores de velocidade angular determinados com auxílio do osciloscópio diferiram no máximo 0,7% dos valores nominais registrados no marcador da centrífuga, em velocidades acima de 1000 rpm e 2% em medidas realizadas a 800 rpm.

#### 3.2.5. Preparação de Ovalbumina

A ovalbumina foi obtida no laboratório a partir de clara de ovo, segundo o método de Kekwick e Cannan<sup>(93)</sup>.

Um volume de 420 ml de clara de ovo foi misturado a um volume igual de solução aquosa de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de concentração

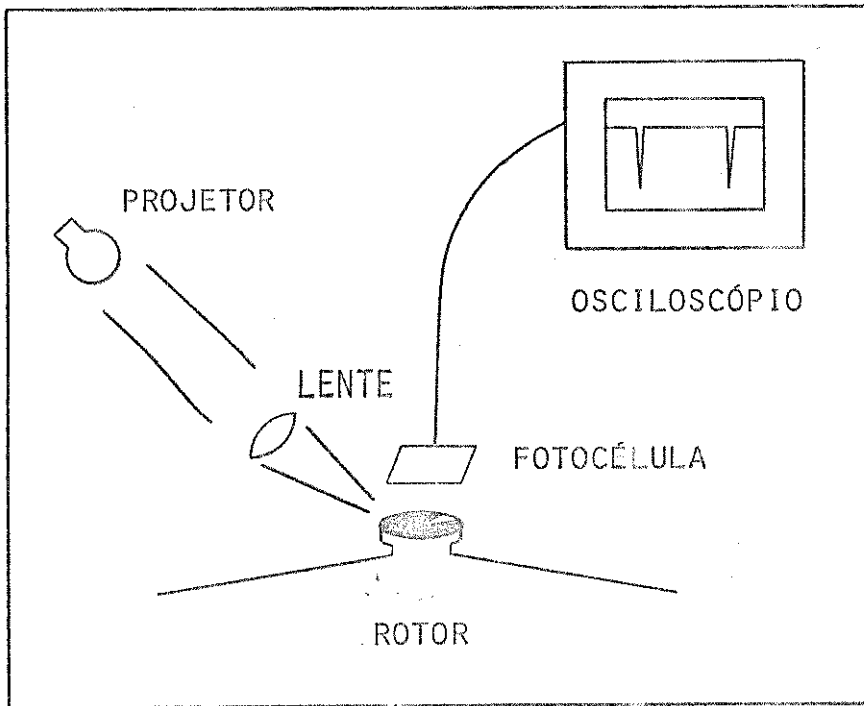


FIGURA 6. Sistema para calibração da centrífuga.

367 g.l<sup>-1</sup>, agitando-se acima de 30°C durante 2 horas. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi filtrado. O pH foi abaixado até 4,7, adicionando-se solução 0,2 N de ácido sulfúrico. Adicionou-se Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido até surgir opalescência e deixou-se em repouso por 2 dias. O precipitado, depois de filtrado, foi redissolvido em água com posterior reprecipitação com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 5 vezes. A solução foi, então, dialisada contra água durante 4 dias e depois liofilizada, obtendo-se a ovalbumina cristalizada.

### 3.2.6. Caracterização da Ovalbumina por Cromatografia em Gel

A ovalbumina obtida no laboratório foi comparada com a ovalbumina produzida pela Sigma (nº A-5503, lot 108C-8135), por cromatografia em gel.

Empacotou-se uma coluna de 1 cm de diâmetro e 81 cm de altura com Sephadex G-100 em tampão acetato pH 4,65, mantendo-se um fluxo de solvente de aproximadamente 27 ml.h<sup>-1</sup>. A parte inferior da coluna foi conectada a uma célula de fluxo, de quartzo, que permitiu a leitura contínua de absorção a 280 nm em espectrofotômetro Micronal B-382 e a obtenção do cromatograma no registrador. Obtiveram-se os cromatogramas da ovalbumina preparada no laboratório e da ovalbumina Sigma, que são apresentados na Figura 7.

Os dois cromatogramas correspondem a solutos de pesos moleculares equivalentes, embora a ovalbumina preparada no laboratório contenha uma fração de alto peso molecular, correspondente a aproximadamente 6% do total (de absorbância a 280 nm), que sai da coluna após um volume correspondente a V<sub>0</sub> ser eluí-

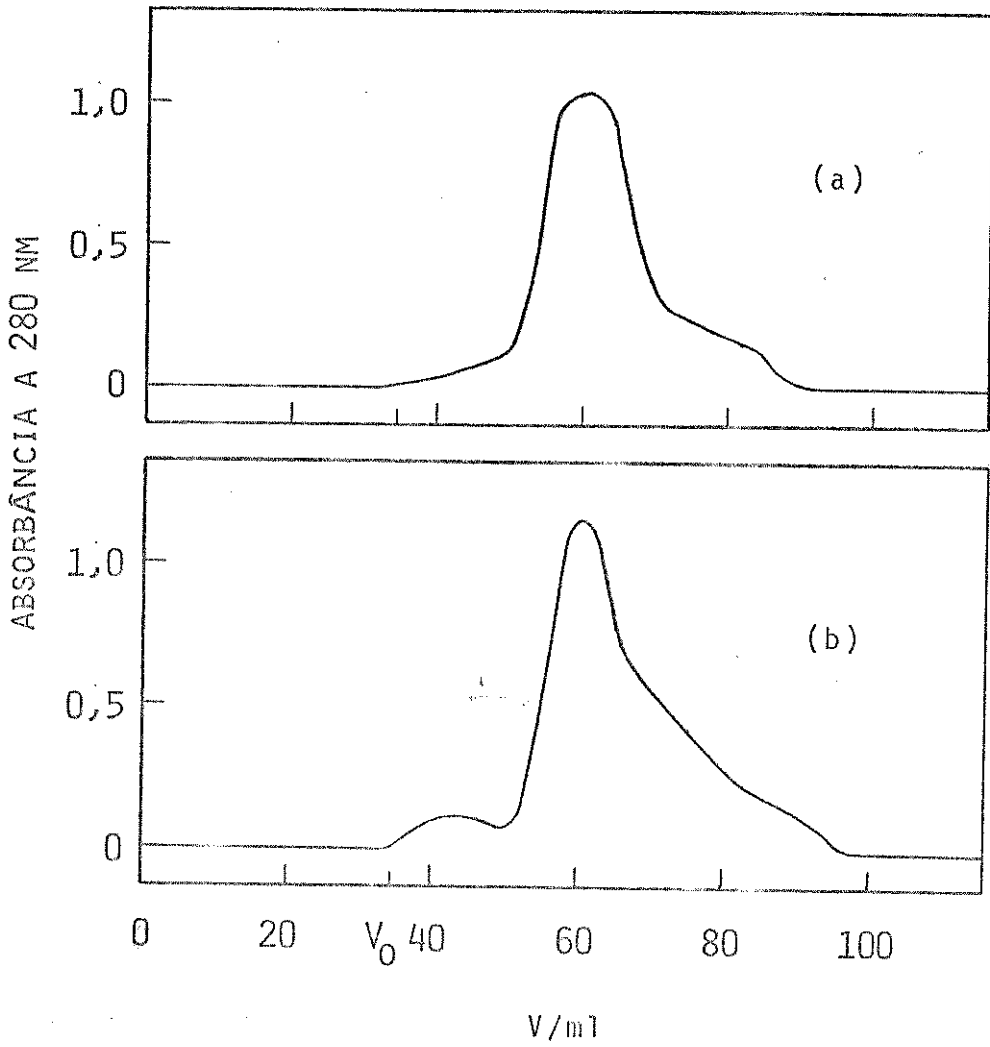


FIGURA 7. Cromatogramas de ovalbumina. (a) Sigma A-5503 e (b) obtida no laborat6rio, em Sephadex G-100.

do.  $V_0$  é o volume de eluição de moléculas maiores que os poros do gel<sup>(94)</sup> e foi determinado experimentalmente, obtendo-se o cromatograma de dextrana azul ( $M = 2 \times 10^6$  daltons).

### 3.2.7. Experimentos de Verificação do Alcance de Equilíbrio de Sedimentação-Difusão em Células de Osmocentrifugação

Soluções de albumina bovina foram colocadas nas células de osmocentrifugação, descritas na Figura 4, até a altura de 7,5 cm e centrifugadas durante tempos diferentes (até 13 dias) a 1000 rpm ( $220 \times g$ ),  $4^\circ\text{C}$ .

Em um tipo de experimento (tipo A), um dos compartimentos da célula foi preenchido com solução de concentração  $c$ , enquanto que o outro foi preenchido com solvente (tampão acetato ou solução 0,5 M de KCl). Paralelamente, em experimentos do tipo B, a metade inferior de um dos compartimentos da célula foi preenchida com solução de concentração  $2c$ , completando-se até o topo com solvente e preenchendo, também, com solvente o outro compartimento. Após algum tempo de centrifugação, foram retiradas alíquotas de solução pelo topo da célula, com auxílio de uma seringa ligada a um capilar de vidro, e suas absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 280 nm. Os resultados são apresentados nas Tabelas 1 e 2. O alcance do equilíbrio é ilustrado na Figura 8, que apresenta as razões entre absorbâncias de alíquotas correspondentes à quinta parte superior e inferior da célula.

O mesmo gradiente de concentração final foi observado nos dois tipos de experimentos. No experimento tipo A, o soluto se movimentou para baixo, enquanto que no tipo B ele se

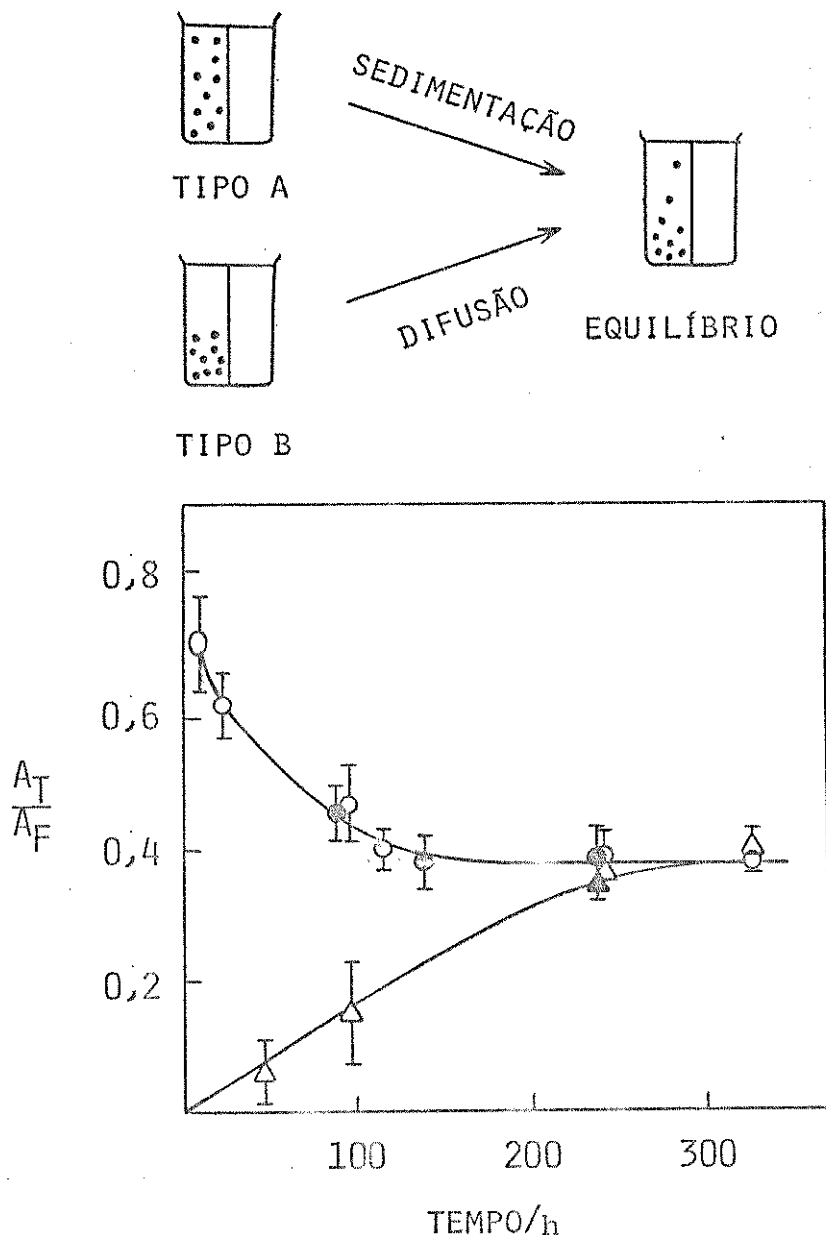


FIGURA 8. Razão entre absorvâncias da solução no quinto superior ( $A_T$ ) e inferior ( $A_F$ ) da célula de osmocentrifugação em função do tempo. Experimentos tipo A realizados a  $4^{\circ}\text{C}$ , 1000 rpm ( $220 \times g$ ) com soluções 1,0% (m/m) de (●) albumina bovina Sigma nº A-7638 em KCl 0,5 M (pH 5,9) ou (○) albumina bovina Sigma nº A-2153 em tampão acetato (pH 5,3); nos experimentos tipo B (▲) e (△), a metade inferior das células foi preenchida com solução 2,0% (m/m) de albumina.

movimentou para cima, por difusão. O atingimento do mesmo estado final, a partir de condições iniciais opostas, mostra que este é o estado de equilíbrio de sedimentação-difusão.

### 3.2.8. Determinação do Peso Molecular de Albumina Bovina

Os gradientes de concentração de soluções de albumina bovina, no equilíbrio, fornecem gráficos lineares de  $\log c_2$  (ou  $\log A$ )  $\times r^2$ , conforme a Figura 9. Tal comportamento é característico de soluções monodispersas e ideais. Albumina é um soluto praticamente homogêneo<sup>(95,96)</sup> e pequenos desvios da idealidade são observados somente em concentrações acima daquelas utilizadas nestes experimentos<sup>(76)</sup>.

A equação 92 pode, então, ser utilizada para determinar o peso molecular de albumina bovina, calculando-se por regressão linear a declividade da reta  $\ln c_2 \times r^2$ . A Tabela 3 apresenta os pesos moleculares de albumina calculados a partir dos experimentos tipo A de 239 e 326 horas da Tabela 1 e de 136 e 237,5 horas da Tabela 2, conhecendo-se a densidade da solução ( $\rho = 1,022 \text{ g/cm}^3$ ) e o volume específico parcial da albumina ( $\bar{v} = 0,734 \text{ cm}^3/\text{g}$ )<sup>(97)</sup>.

TABELA 1. Osmocentrifugação de albumina bovina ( $A_{280}^{1\%} = 0,580$ ) Sigma A-2153 em tampão acetato pH 5,3 (solução 0,1 M NaCl, 0,1 M KAc e 0,013M HAc) a 1000 rpm (220 x g), 4°C.

## Experimentos tipo A

Tempo (horas)	r (cm)	Absorbâncias					Solvente (média)
		17,0	18,5	20,0	21,5	23,0	
8		0,370	0,440	0,518	0,568	0,606	0,005
		0,422	0,481	0,518	0,556	0,588	0,008
		0,430	0,489	0,516	0,554	0,605	0,004
		0,406	0,485	0,518	0,549	0,586	0,005
		0,469	0,524	0,553	0,571	0,597	0,010
		0,533	0,566	0,569	0,569	0,574	controle
22		0,440	0,525	0,572	0,612	0,670	0,004
		0,405	0,475	0,542	0,612	0,670	0
		0,408	0,481	0,551	0,620	0,692	0,002
		0,439	0,512	0,546	0,592	0,658	0,001
		0,376	0,474	0,542	0,600	0,668	0,004
		0,522	0,580	0,588	0,590	0,586	controle
46		0,367	0,456	0,541	0,660	0,808	0,017
		0,380	0,478	0,548	0,632	0,785	0,020
		0,334	0,403	0,508	0,628	0,772	0,023
		0,550	0,551	0,575	0,570	0,578	controle
94		0,328	0,410	0,525	0,640	0,782	0,025
		0,395	0,486	0,560	0,703	0,770	0,017
113,5		0,279	0,393	0,493	0,608	0,734	0,006
		0,337	0,427	0,518	0,628	0,745	0,006
		0,300	0,415	0,498	0,642	0,760	0,003
		0,292	0,403	0,517	0,651	0,743	0,006
		0,555	0,573	0,573	0,579	0,585	controle



Continuação - Tabela 1

239	0,285	0,371	0,490	0,638	0,738	0,015
	0,340	0,438	0,535	0,681	0,795	0,015
	0,287	0,388	0,509	0,660	0,802	0,015
	0,528	0,565	0,575	0,578	0,595	controle
326	0,195	0,286	0,361	0,433	0,508	0,027
	0,228	0,313	0,386	0,490	0,571	0,038
	0,203	0,284	0,366	0,465	0,559	0,042
	0,493	0,556	0,571	0,582	0,611	controle
Experimentos tipo B						
46	0,077	0,345	0,530	0,692	0,830	0,003
	0,014	0,154	0,574	0,770	0,903	0,019
	0,011	0,036	0,560	0,960	1,08	controle
94	0,071	0,368	0,568	0,704	0,805	0,008
	0,164	0,382	0,469	0,610	0,750	0,010
	0,006	0,053	0,520	0,950	1,10	controle
239	0,295	0,387	0,500	0,630	0,790	0,008
	0,243	0,418	0,514	0,640	0,755	0,017
	0,247	0,373	0,480	0,593	0,678	0,017
	0,080	0,100	0,490	0,920	1,06	controle
326	0,136	0,236	0,245	0,275	0,369	0,015
	0,120	0,169	0,211	0,259	0,295	0,010
	0,039	0,168	0,386	0,755	0,947	controle

TABELA 2. Osmocentrifugação de solução de albumina bovina ( $A_{280}^{1\%} = 0,580$ )  
Sigma A-7638 em KCl 0,5 M (pH 5,9), a 1000 rpm ( $220 \times g$ ),  $4^{\circ}\text{C}$ .

## Experimentos tipo A

Tempo (horas)	r (cm)	Absorbâncias a 280 nm					Solvente (média)
		17,0	18,5	20,0	21,5	23,0	
87,5		0,382	0,464	0,540	0,632	0,750	0,003
		0,354	0,428	0,522	0,652	0,798	0
		0,326	0,437	0,507	0,650	0,762	0,005
		0,305	0,419	0,514	0,650	0,755	0,003
		0,382	0,498	0,570	0,680	0,780	0,011
		0,360	0,456	0,545	0,661	0,765	0,003
		0,518	0,571	0,578	0,580	0,581	controle
136		0,322	0,433	0,501	0,658	0,850	0,005
		0,336	0,440	0,528	0,651	0,800	0,016
		0,280	0,390	0,490	0,608	0,868	0,004
		0,302	0,402	0,505	0,640	0,765	0,004
		0,268	0,369	0,502	0,621	0,778	0,004
		0,545	0,568	0,580	0,586	0,595	controle
237,5		0,289	0,376	0,471	0,597	0,706	0,014
		0,336	0,409	0,520	0,641	0,796	0,030
		0,280	0,352	0,467	0,546	0,841	0,009
		0,517	0,557	0,566	0,572	0,579	controle

## Experimentos tipo B

237,5		0,257	0,392	0,538	0,701	0,776	0,006
		0,221	0,341	0,452	0,565	0,921	0,005
		0,246	0,346	0,470	0,568	0,676	0,011
		0,025	0,065	0,452	0,926	1,056	controle

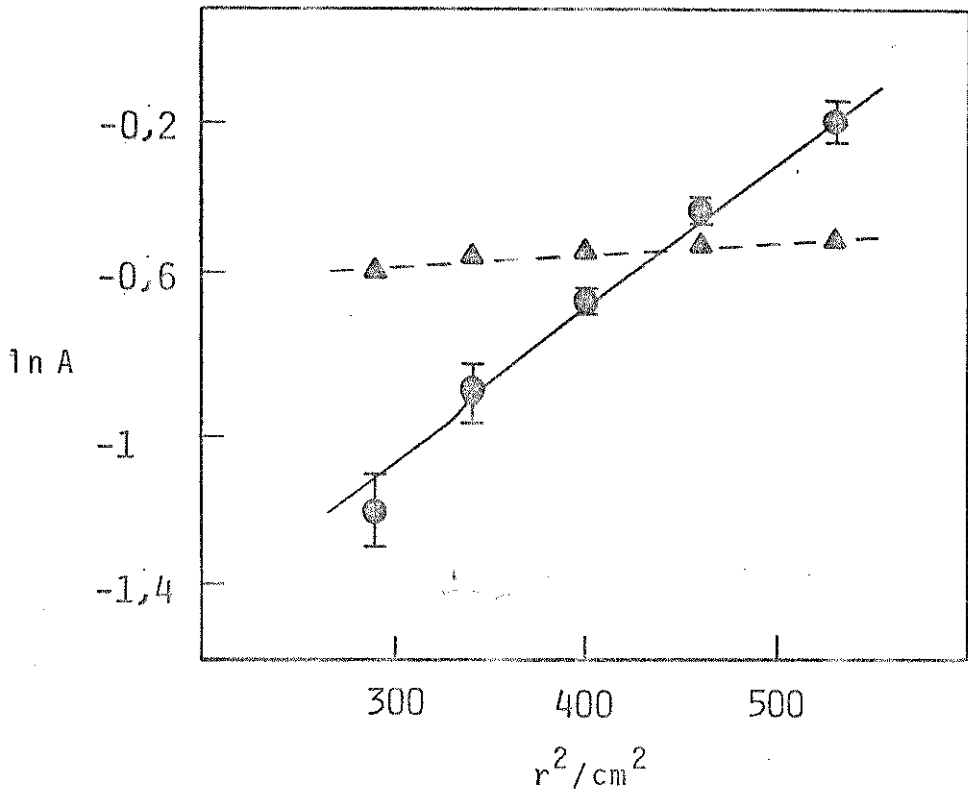


FIGURA 9. Absorbância a 280 nm em função do quadrado da distância entre o eixo de rotação e o ponto considerado na célula. Solução de albumina bovina Sigma A-7638 em KCl 0,5 M (pH 5,9), após 136 h de centrifugação a 1000 rpm, 4°C em (○) células de osmocentrifugação e (▲) células sem membrana.

TABELA 3. Pesos moleculares de albumina bovina calculados a partir das Tabelas 1 e 2.

Pesos moleculares $\times 10^4$ ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	
Albumina A-2153	Albumina A-7638
6,81	6,60
5,97	5,94
7,21	7,57
7,59	6,48
6,36	7,39
7,01	6,27
	6,08
	7,41

Para a albumina bovina A-2153, encontrou-se um valor médio de peso molecular  $\bar{M}_W = (6,82 \pm 0,59) \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Para a albumina A-7638 encontrou-se um valor médio de peso molecular  $\bar{M}_W = (6,72 \pm 0,65) \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

### 3.2.9. Determinação do Peso molecular de Ovalbumina

Foram realizados experimentos de osmocentrifugação com ovalbumina em tampão acetato pH 4,65 (0,15 M NaCl, 0,001 M KAc e HAc), a  $4^\circ\text{C}$  e 1500 rpm (500 x g). Somente experimentos do tipo A, isto é, partindo de concentração inicial uniforme, foram realizados. Em experimentos deste tipo, o equilíbrio é alcançado mais rapidamente, como foi mostrado na Figura 8. A realização de experimentos em tempos diferentes indicou que o patamar da curva de  $\frac{A_T}{A_F}$  x tempo, correspondente ao equilíbrio, foi alcançado. A Figura 10 mostra que o gráfico de  $\ln c_2$  (ou

ln A) x  $r^2$  para ovalbumina não é linear como no caso da albumina bovina, sugerindo um comportamento não-ideal. Realizaram-se, então, experimentos a várias concentrações. Os resultados são apresentados na Tabela 4. Calculou-se, então, para cada concentração um peso molecular médio aparente, através da equação 93, utilizando os dados em tempos mais longos. A Tabela 5 mostra os valores de peso molecular calculados, conhecendo-se os valores de  $\bar{v}_2 = 0,748 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  (97) e  $\rho = 1,0055 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , que são apresentados em um gráfico de  $1/\bar{M}_{2ap}$  x concentração na Figura 11. A extrapolação à concentração zero forneceu o valor de  $\bar{M}_w = (4,26 \pm 0,61) \times 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , e a partir do coeficiente angular da reta obtida, foi possível estimar o valor do segundo coeficiente de virial  $B_{SD} = 6 \times 10^{-4} \text{ mol g}^{-2} \cdot \text{cm}^3$ .

Para o cálculo dos desvios do coeficiente linear e angular da reta apresentada na Figura 11, utilizou-se o tratamento estatístico de Draper e Smith (98) com um nível de confiança de 95%.

TABELA 4. Osmocentrifugação de ovalbumina ( $A_{280}^{1\%} = 0,664$ ) em tampão acetato (pH 4,65), a 1500 rpm (500 x  $\varnothing$ ), 4°C.

		Absorbâncias a 280 nm											
$\bar{c}_2$ (%)	r (cm) Tempo(h)	16,6	17,4	18,1	18,9	19,6	20,4	21,1	21,9	22,6	23,4	Solv.	
0,852	94	0,236	0,294	0,365	0,445	0,520	0,595	0,640	0,755	0,865	0,940	0,199	
0,855		0,225	0,283	0,340	0,389	0,515	0,608	0,720	0,785	0,880	0,935	0,176	
1,28		0,682	0,782	0,830	0,860	0,870	0,870	0,875	0,880	0,895	0,940	controle	
0,588	89	0,143	0,210	0,278	0,332	0,376	0,411	0,450	0,487	0,576	0,641	0,184	
0,590		0,122	0,180	0,266	0,314	0,369	0,411	0,462	0,507	0,610	0,680	0,113	
0,647		0,168	0,200	0,254	0,312	0,390	0,454	0,511	0,585	0,670	0,750	0,108	
0,603		0,162	0,212	0,283	0,326	0,371	0,417	0,454	0,512	0,590	0,679	0,135	
0,531	118	0,143	0,169	0,206	0,266	0,331	0,377	0,424	0,467	0,538	0,605	0,128	
0,561		0,154	0,192	0,237	0,277	0,324	0,371	0,436	0,498	0,591	0,648	0,159	
0,620		0,156	0,206	0,270	0,329	0,383	0,424	0,480	0,530	0,630	0,712	0,163	
0,578		0,147	0,193	0,246	0,317	0,368	0,410	0,444	0,497	0,572	0,649	0,136	
0,207	138	0,092	0,113	0,143	0,175	0,204	0,229	0,258	0,274	0,307	0,274	0,112	
0,135		0,075	0,084	0,093	0,107	0,118	0,127	0,142	0,160	0,211	0,236	0,110	
0,312	190	0,094	0,107	0,135	0,160	0,179	0,202	0,238	0,275	0,324	0,357	0,106	

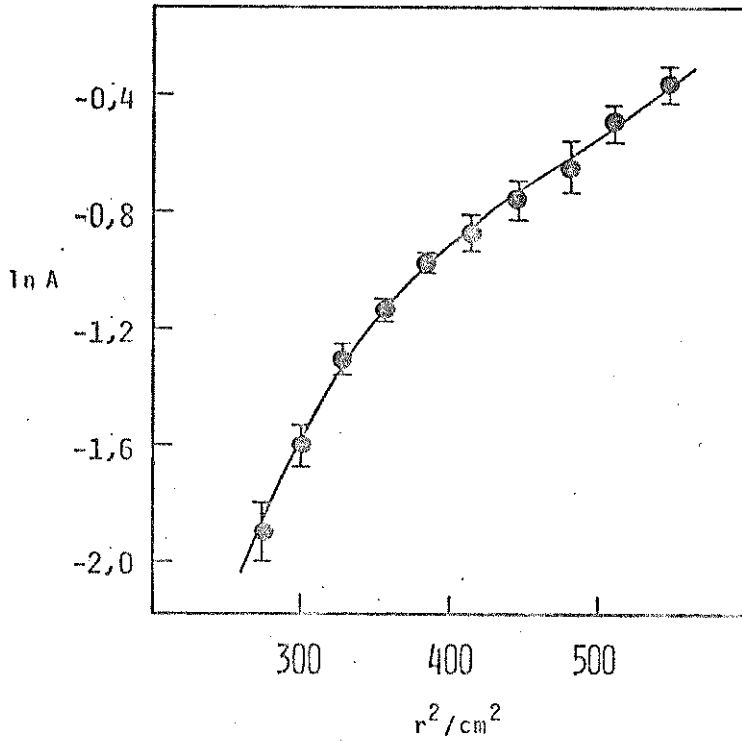


FIGURA 10. Absorbância a 280 nm em função do quadrado da distância entre o eixo de rotação e um ponto na célula. Solução de ovalbumina (concentração inicial 0,6%) em tampão acetato (pH 4,65), após 89 h de osmocentrifugação a 1500 rpm, 4°C.

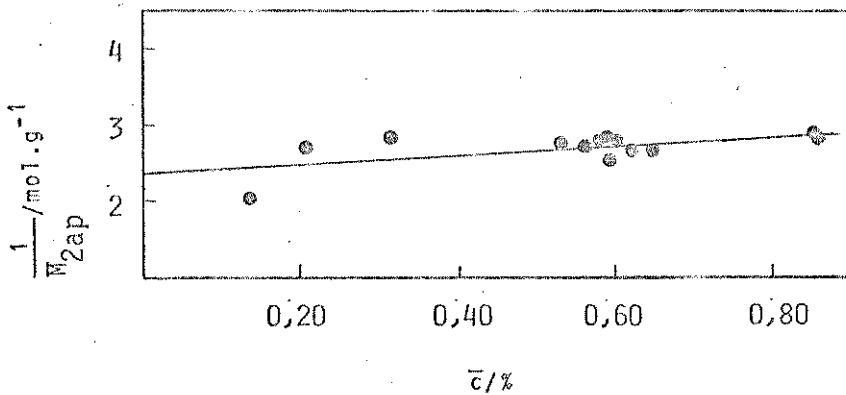


FIGURA 11. Gráfico de  $\frac{1}{M_{2ap}}$  x concentração de ovalbumina em tampão acetato (pH 4,65).

TABELA 5. Pesos moleculares aparentes de ovalbumina calculados a partir dos dados da Tabela 4.

$\bar{c}_2$ (%)	$\bar{M}_{2ap} \times 10^{-4}$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$\frac{1}{\bar{M}_{2ap}} \times 10^5$ (mol.g <sup>-1</sup> )
0,852	3,45	2,90
0,855	3,46	2,89
0,588	3,53	2,83
0,590	3,94	2,54
0,647	3,75	2,67
0,603	3,57	2,80
0,531	3,63	2,76
0,561	3,67	2,72
0,620	3,74	2,67
0,578	3,62	2,76
0,207	3,67	2,73
0,135	4,97	2,01
0,312	3,51	2,85

coeficiente angular:  $(6,5 \pm 5,7) \times 10^{-6}$

coeficiente linear:  $(2,35 \pm 0,33) \times 10^{-5}$

coeficiente de correlação: 0,60

### 3.2.10. Determinação do Peso Molecular de Gamaglobulina

Experimentos de osmocentrifugação do tipo A com gamaglobulina em tampão fosfato pH 7,0 (0,05 M H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub> e 0,03 M NaOH) foram realizados a 900 rpm (180 x g) e 4°C. Neste caso, o gráfico de ln c<sub>2</sub> (ou ln A) x r<sup>2</sup> mostrado na Figura 12, também, não é linear. Obtém-se uma curva em forma de S, que está de acordo com o esperado, uma vez que a gamaglobulina é relativamente polidispersa<sup>(99)</sup> e mostra uma tendência à agregação em concentrações altas<sup>(100)</sup>. Assim, foram, também, realizados experimentos a diversas concentrações, que são apresentados na Ta



TABELA 6. Osmocentrifugação de gamaglobulina ( $A_{280}^{1\%} = 1,30$ ) em tampão fosfato (pH 7,0), a 900 rpm (180 x g), 4°C.

Absorbâncias a 280 nm													
$\bar{c}_2$ (%)	Tempo (h)	r (cm)	16,6	17,4	18,1	18,9	19,6	20,4	21,1	21,9	22,6	23,4	solv.
		0,538	50	0,113	0,272	0,402	0,498	0,588	0,725	0,800	0,940	1,20	1,45
0,586		0,197	0,274	0,365	0,443	0,525	0,602	0,708	1,01	1,56	1,94	0,009	
0,579		0,174	0,230	0,340	0,467	0,602	0,720	0,890	1,06	1,44	1,61	0,015	
0,592		0,600	0,680	0,735	0,765	0,780	0,791	0,800	0,802	0,835	0,910	controle	
0,525	89	0,122	0,190	0,299	0,404	0,493	0,601	0,733	0,943	1,28	1,75	0,017	
0,469		0,108	0,163	0,231	0,322	0,438	0,526	0,683	0,900	1,13	1,59	0,022	
0,474		0,121	0,158	0,244	0,258	0,367	0,455	0,678	0,913	1,27	1,70	0,017	
0,467	112	0,082	0,145	0,223	0,312	0,405	0,470	0,638	0,950	1,30	1,55	0,020	
0,481		0,107	0,180	0,258	0,334	0,414	0,479	0,670	0,878	1,28	1,65	0,010	
0,121	117	0,051	0,072	0,095	0,119	0,131	0,155	0,176	0,192	0,263	0,320	0,014	
0,134		0,071	0,084	0,105	0,116	0,130	0,151	0,195	0,212	0,317	0,356	0,011	
0,133		0,069	0,080	0,104	0,122	0,135	0,160	0,180	0,223	0,301	0,352	0,012	
0,125	143	0,051	0,062	0,079	0,099	0,118	0,142	0,169	0,217	0,313	0,372	0,013	
0,137		0,087	0,097	0,115	0,131	0,150	0,165	0,189	0,223	0,270	0,348	0,011	
0,309	210	0,081	0,115	0,147	0,185	0,245	0,324	0,412	0,587	0,867	1,05	0,018	
0,142		0,055	0,071	0,084	0,102	0,120	0,145	0,185	0,252	0,357	0,478	0,018	
0,138		0,053	0,068	0,079	0,095	0,107	0,129	0,177	0,258	0,356	0,477	0,013	
0,141		0,050	0,063	0,080	0,087	0,112	0,132	0,186	0,251	0,389	0,485	0,014	

bela 6.

Calculou-se, para cada concentração, nos experimentos onde o equilíbrio foi alcançado, um peso molecular médio aparente, através da equação 93. A Tabela 7 mostra os valores de peso molecular calculados, conhecendo-se os valores de  $\bar{v}_2 = 0,720 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  (97) e  $\rho = 1,0047 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , que são apresentados, também, em um gráfico de  $1/\bar{M}_{2ap}$  x concentração na Figura 13. A extrapolação à concentração zero forneceu o valor de  $\bar{M}_w = (1,59 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  e, a partir do coeficiente angular da reta obtida, foi possível estimar o valor do segundo coeficiente de virial  $B_{SD} = -7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-2} \cdot \text{cm}^3$ . Os desvios do coeficiente angular e linear da reta apresentada na Figura 13 foram calculados de maneira análoga à utilizada para o valbumina.

TABELA 7. Pesos moleculares aparentes de gamaglobulina calculados a partir dos dados da Tabela 6.

$\bar{c}_2$ (%)	$\bar{M}_{2ap} \times 10^{-5}$ ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$\frac{1}{\bar{M}_{2ap}} \times 10^6$ ( $\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ )
0,138	1,63	6,13
0,141	1,64	6,10
0,142	1,57	6,37
0,309	1,66	6,02
0,467	1,66	6,02
0,469	1,67	5,99
0,474	1,76	5,68
0,481	1,70	5,88
0,525	1,64	6,10

coeficiente angular:  $(-7,3 \pm 7,7) \times 10^{-7}$

coeficiente linear:  $(6,29 \pm 0,29) \times 10^{-6}$

coeficiente de correlação: 0,65

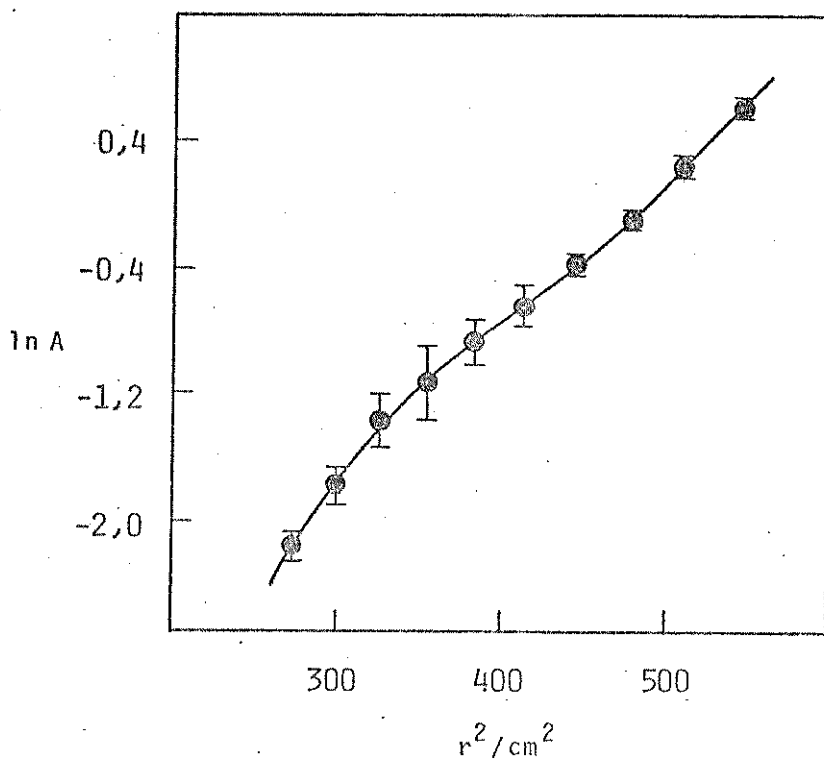


FIGURA 12. Absorbância a 280 nm em função do quadrado da distância entre o eixo de rotação e um ponto na célula. Solução de gamaglobulina (concentração inicial 0,5%) em tampão fosfato (pH 7,0), após 89 h de centrifugação a 900 rpm, 4°C.

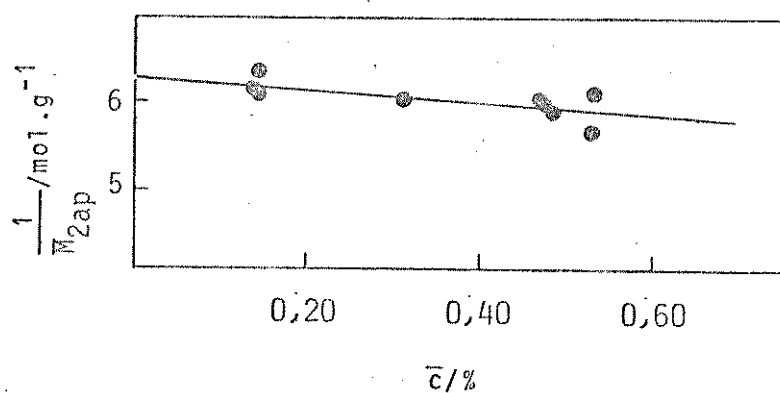


FIGURA 13. Gráfico de  $\frac{1}{\bar{M}_{2ap}}$  x concentração de gamaglobulina em tampão fosfato (pH 7,0).

### 3.3. DISCUSSÃO

A albumina bovina é um exemplo de proteína simples, isto é, que contém na cadeia somente resíduos de aminoácido<sup>(101)</sup> e tem sido considerada como uma proteína modelo, cujo comportamento vem sendo investigado por inúmeras técnicas físico-químicas. É relativamente abundante e homogênea<sup>(95,96)</sup>. Assim, esta proteína foi inicialmente escolhida para comprovar a eficiência da osmocentrifugação na determinação de pesos moleculares.

A Tabela 8 mostra valores de pesos moleculares de albumina bovina fornecidos na literatura. Variações pequenas nos valores apresentados podem ser atribuídas a erros inerentes dos métodos, à presença de globulinas contaminantes e à presença de dímeros ou agregados maiores<sup>(95)</sup>. A albumina é raramente obtida totalmente livre de agregados, de maneira que os valores de peso molecular têm uma incerteza<sup>(108)</sup> de no mínimo  $\pm 2000$ . Os valores  $(6,82 \pm 0,59) \times 10^4$  e  $(6,72 \pm 0,65) \times 10^4$  obtidos em experimentos de osmocentrifugação são coerentes com aqueles obtidos pelos métodos convencionais. A linha reta correspondente ao gráfico de  $\ln c_2 \times r^2$  (Figura 9), também, é compatível com dados da literatura<sup>(76)</sup>, pois, na faixa de concentração utilizada, a albumina apresenta comportamento ideal.

A ovalbumina contém aproximadamente 3,2% de carboidratos e é classificada como uma glicoproteína<sup>(109)</sup>. Devido à sua disponibilidade (ovalbumina está presente na clara de ovo a uma concentração de aproximadamente 7,5 mg/ml), é bastante utilizada como material padrão na investigação de propriedades, composição e estrutura de proteínas. Por certo tempo, a ovalbumina foi considerada uma proteína pura, porém verificou-se já há muito, que ela não é eletroforéticamente homogênea<sup>(110,111)</sup>.

TABELA 8. Pesos moleculares de albumina bovina apresentados na literatura.

$M \times 10^{-4}$	Método	pH	Conc. inicial	Ref.
6,70 <sup>a</sup>	velocidade de	4,0-5,1	< 6%	85
6,92	sedimentação-difusão			
6,67	equilíbrio sed. dif.	4,6	0,3%	102
6,60 <sup>b</sup>	eq. sed. dif.	4,4	< 0,2%	91
7,29 <sup>c</sup>				
7,92 <sup>d</sup>				
6,67	eq. sed. dif.	4,6	0,3-0,9%	103
6,60	pressão osmótica	3,5-3,6	1-5%	104
6,62	composição de amino-ácido			101
6,71	veloc. sed. dif.	5,6	0,5-2,0%	105
6,67	veloc. sed. dif.	4,8	0,3-1,3%	106
6,82	eq. sed. dif.	4,8	1%	106
6,85	eq. sed. dif.	8,0	0,5%	76
6,78	eq. sed. dif.			107

<sup>a</sup> Componente principal

<sup>b</sup> Monômero

<sup>c</sup> 9,5% de dímero

<sup>d</sup> 10,5% de dímero

A Tabela 9 apresenta valores de peso molecular de ovalbumina fornecidos na literatura. O valor  $(4,26 \pm 0,61) \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup> obtido por osmocentrifugação está de acordo com aqueles determinados por métodos convencionais. Um desvio da linearidade no gráfico de  $\ln c_2 \times r^2$  (Figura 10) e a variação do peso molecular aparente com a concentração, que permitiu avaliar o valor de  $B_{SD}$ , mostraram que a ovalbumina apresenta comportamento não-ideal nas condições estudadas.

TABELA 9. Pesos moleculares de ovalbumina apresentados na literatura.

$M \times 10^{-4}$	Método	pH	Conc. inicial	Ref.
4,02-4,58	eq. sed. dif.	4,65	0,43-0,62%	112
4,52	pressão osmótica	4,7	0,05-3,8%	113
4,50	pressão osmótica	4,65	1-9%	114
4,57	espalhamento de luz	4,6	1,2%	115
4,40	monocamada			116
4,38	veloc. sed. dif.			117

A gamaglobulina, assim como a ovalbumina, contém uma pequena porção de carboidratos. Gamaglobulinas são bastante heterogêneas, sendo esta heterogeneidade evidente por qualquer critério que seja aplicado (99,118).

A Tabela 10 mostra valores de peso molecular de gamaglobulina determinados por métodos convencionais. O valor  $(1,59 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  é concordante com os valores apresentados na tabela. A curva em forma de  $\underline{s}$  no gráfico de  $\ln c_2 \times r^2$  (Figura 12) é característica de solutos heterogêneos e não-ideais.

O equilíbrio de sedimentação-difusão foi alcançado em um tempo muito inferior ao necessário por centrifugação normal. Na Figura 8, pode ser observado, por exemplo, que uma solução de albumina bovina em células de 7,5 cm de altura, centrifugada a 1000 rpm alcança o equilíbrio após 136 horas de osmocentrifugação. Tempos próximos a este foram necessários para que soluções de ovalbumina e gamaglobulina também alcançassem o equilíbrio, em experimentos de osmocentrifugação. Utilizando a equação 98, é possível estimar o tempo requerido, por centrifugação normal, para que a concentração de soluto seja 0,1% do

seu valor de equilíbrio em qualquer ponto da célula. Tempos as sim calculados, são apresentados na Tabela 11, para soluções de albumina bovina, ovalbumina e gamaglobulina.

TABELA 10. Pesos moleculares de gamaglobulina bovina apresentados na literatura.

$M \times 10^{-5}$	Método	pH	Conc. inicial	Ref.
1,71	pressão osmótica	6,8	1-9%	104
1,49	eq. sed. dif.	7,0	0,16%	102
1,49	eq. sed. dif.	7,0	0,16%	119
1,69	pressão osmótica	5,3	0,4%	120
1,61	eq. sed. dif.			107

TABELA 11. Tempos requeridos para alcance do equilíbrio de sedimentação-difusão por centrifugação normal.

Proteína	$D \times 10^7$ ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	Tempo (dias)
albumina	5,81 (82)	780
ovalbumina	7,76 (114)	580
$\gamma$ -globulina	4,1 (92)	1100

Resumindo, os resultados apresentados neste capítulo mostram que: (i) o equilíbrio de sedimentação pode ser alcançado em colunas longas, em baixo campo inercial, em um tempo relativamente curto, em células de osmocentrifugação; (ii) os pesos moleculares determinados por esta técnica concordam com os valores da literatura e (iii) características de não-idealidade e polidispersidade podem ser, assim, facilmente investigadas.

Comprovada sua eficiência, a osmocentrifugação pode ser aplicada ao estudo de amostras desconhecidas de, por exemplo, polímeros sintéticos, cuja caracterização muitas vezes se torna difícil por outros métodos<sup>(121)</sup>.



## 4. OSMOCENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE

### 4.1. INTRODUÇÃO

A primeira aplicação da ultracentrífuga preparativa foi a concentração de macromoléculas em solução e a separação parcial de macromoléculas por centrifugação diferencial<sup>(122)</sup>.

A utilização da ultracentrífuga preparativa foi sensivelmente ampliada na década de 50, com o desenvolvimento de técnicas de centrifugação em gradientes de densidade, cuja introdução é atribuída a Brakke<sup>(123)</sup>, que utilizou gradiente de sacarose para purificação do vírus anão da batata.

#### 4.1.1. Ultracentrifugação em Gradiente de Densidade

A separação de partículas e macromoléculas com base na velocidade de sedimentação pode seguir, basicamente, dois procedimentos: a centrifugação diferencial e a centrifugação zonal (em gradiente de densidade).

Na centrifugação diferencial, esquematizada na Figura 14a, a mistura a ser separada é suspensa em um meio homogêneo, de densidade constante. Durante a centrifugação, os diferentes componentes sedimentam com diferentes velocidades. Porém, só ocorre uma boa separação, quando as características das diferentes partículas forem bem afastadas entre si. É o caso, por exemplo, de uma mistura de núcleos de células (diâmetro = 10000 nm), mitocôndrias (1000 nm) e ribossomos (15 nm). Mas frequentemente este requisito não é preenchido e somente um fraçãoamento grosseiro é possível.

Na centrifugação zonal<sup>(124)</sup>, esquematizada na Figura 14b, a mistura é suspensa em um meio pouco denso e posicio-

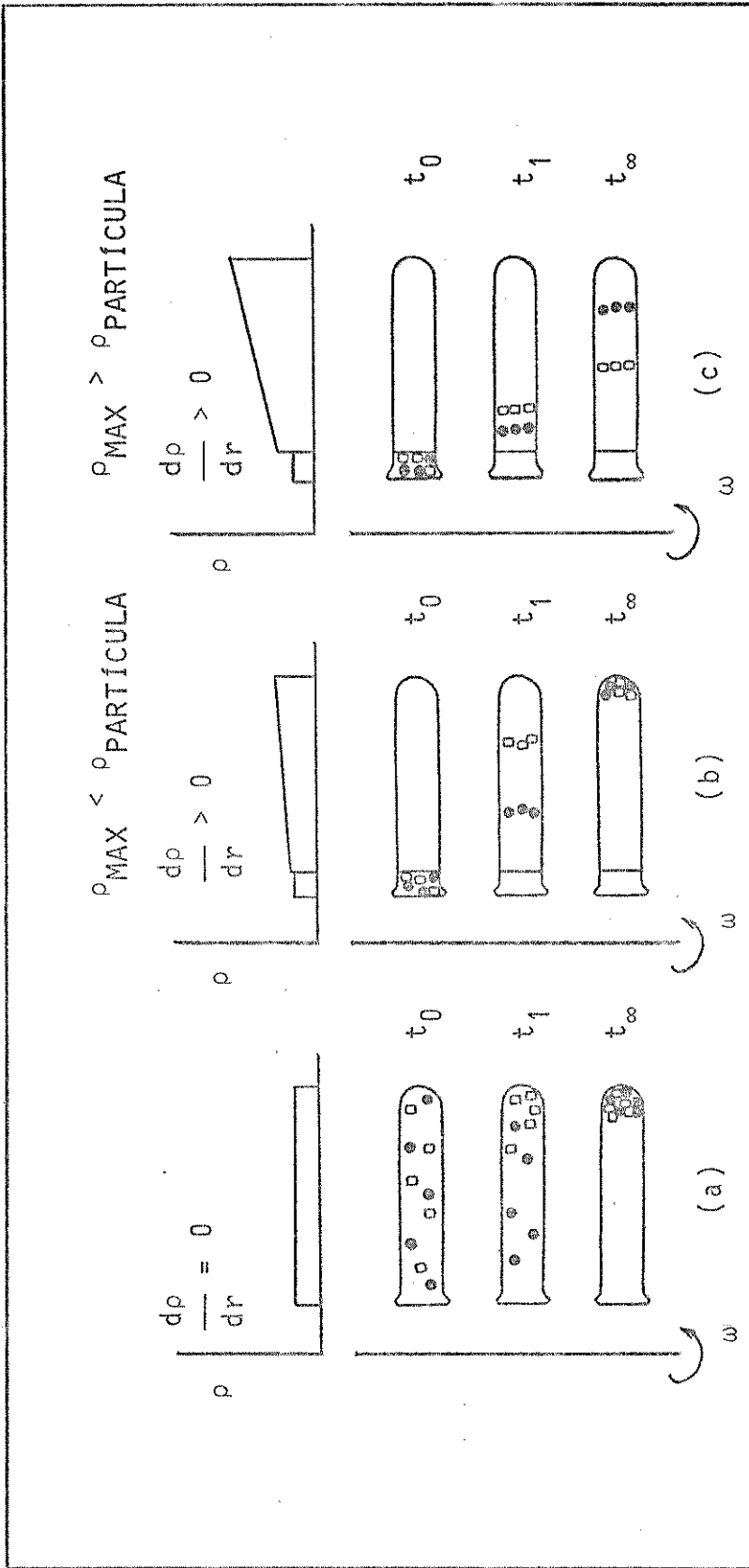


FIGURA 14. Esquemas da separação de uma mistura de partículas por (a) centrifugação diferencial, (b) centrifugação zonal e (c) centrifugação zonal isopícnica.

nada como uma camada fina acima de uma coluna com um gradiente de densidade. Durante a centrifugação, cada componente sedimenta a velocidades diferentes, formando zonas discretas. Estas zonas são suficientemente estabilizadas pelo gradiente de densidade para permitirem uma separação quantitativa, com resolução superior à da centrifugação diferencial.

Além da centrifugação zonal, cuja eficiência como método de separação depende, principalmente da diferença entre os coeficientes de sedimentação das partículas, a centrifugação em gradiente de densidade permite outro tipo de separação: a separação zonal isopícnica, baseada na diferença de densidades das partículas. O processo é esquematizado na Figura 14c. A amostra contendo a mistura a ser separada é, também, colocada sobre uma coluna de densidade variável. Escolhe-se, porém, uma faixa de densidades que inclua as densidades das partículas que se quer separar. Durante a centrifugação, as partículas se deslocam até alcançar, cada uma, a zona de igual densidade, atingindo sua posição de equilíbrio, que é independente do tamanho da partícula. A separação zonal isopícnica teve grande importância na análise de DNA, desde o desenvolvimento do trabalho clássico de Meselson, Stahl e Vinograd<sup>(125)</sup>.

#### 4.1.2. Materiais Formadores de Gradiente de Densidade

Gradientes de densidade são normalmente obtidos com soluções ou sois de materiais mais densos que a água. As propriedades requeridas de um material ideal utilizado na formação de gradientes são as seguintes: densidade alta, viscosidade baixa, pressão osmótica desprezível, inatividade fisiológica e química, transparência à luz visível e ultravioleta e bai

xo custo<sup>(44)</sup>. Infelizmente, não existe um material que reúna todos estes requisitos, mas combinações de algumas destas propriedades caracterizam vários materiais disponíveis. Alguns deles são apresentados na Tabela 12.

TABELA 12. Propriedades físicas de alguns materiais formadores de gradientes de densidade<sup>(44,126,127)</sup>.

Substância	Solução estoque usual		
	Concentração (% (m/m))	Densidade (g.cm <sup>-3</sup> ) (°C)	Viscosidade (centipoise) (°C)
CsCl	60	1,79 (20 <sup>0</sup> )	-
D <sub>2</sub> O	100	1,11 (20 <sup>0</sup> )	-
Ficoll	49	1,12 (25 <sup>0</sup> )	41 (25 <sup>0</sup> )
Glicerol	100	1,26 (20 <sup>0</sup> )	1490 (20 <sup>0</sup> )
Ludox AM	30	1,21	16 (25 <sup>0</sup> )
Metrizamida	85	1,47 (5 <sup>0</sup> )	246 (5 <sup>0</sup> )
Sorbitol	60	1,26 (4 <sup>0</sup> )	103 (4 <sup>0</sup> )
Sacarose	65	1,33 (4 <sup>0</sup> )	57 (20 <sup>0</sup> )
Percoll	23 <sup>a</sup>	1,13	10 (20 <sup>0</sup> )

<sup>a</sup> Composição das partículas coloidais: 88% de sílica e 12% de polivinilpirrolidona.

A sacarose foi o material pioneiro<sup>(123)</sup> na obtenção de gradientes de densidade, sendo ainda muito usada devido à sua alta solubilidade, transparência, baixo custo e relativa inatividade fisiológica. Porém, sua maior desvantagem é a elevada pressão osmótica de soluções concentradas, que pode causar problemas na separação de células e organelas subcelulares. Por esta razão, a sacarose é considerada inferior a materiais tais como Percoll e Ficoll<sup>(126)</sup> em certas aplicações.

As maiores densidades em sistemas aquosos podem ser obtidas com soluções salinas. São empregados, principalmente, cloreto de césio, sais de rubídio e brometo de sódio. Gradientes de CsCl permitiram a Meselson e Stahl<sup>(128)</sup> observar a separação em bandas de DNAs bacterianos que diferiam somente no grau de substituição isotópica de nitrogênio. Sais de césio são, porém, muito caros e extremamente corrosivos para rotores de alumínio. Sua aplicação ao fracionamento de biopartículas é, também, limitada pela pressão osmótica elevada. Quando a pressão osmótica é elevada, como há uma membrana ao redor das células biológicas, impermeável ao soluto formador do gradiente de densidade, há perda progressiva de água da célula à medida que ela migra para regiões mais concentradas (mais densas). A célula, então, se contrai e se torna mais densa, isto é, tem sua densidade de flutuação elevada. Estas alterações não só complicam consideravelmente o comportamento da partícula durante a sedimentação, como podem provocar mudanças irreversíveis na estrutura da célula<sup>(44)</sup>.

#### 4.1.2.1. Ficoll

Ficoll é um copolímero de sacarose com epícloridrina, altamente ramificado, hidrofílico e neutro, com peso molecular médio  $\bar{M}_w = 400000$  daltons. É solúvel até aproximadamente 50% (m/m) em água, mas soluções mais concentradas que 30% (m/m) são extremamente viscosas<sup>(44,126)</sup>.

O alto peso molecular do Ficoll é responsável por duas vantagens importantes<sup>(129)</sup>: (i) soluções de Ficoll têm pressão osmótica muito mais baixa que soluções de sacarose de densidades equivalentes, permitindo a preservação da

integridade funcional e morfológica das células e organelas se paradas; (ii) Ficoll não penetra membranas biológicas, de maneira que, em uma separação isopícnica, células e organelas são bandeadas em sua densidade de flutuação real (geralmente menor que a observada em gradientes de sacarose).

Gradientes de Ficoll são especialmente úteis para separação de linfócitos<sup>(130)</sup>.

#### 4.1.2.2. Percoll

Percoll é uma dispersão de sílica coloidal, cujas partículas são cobertas por uma camada de polivinilpirrolidona (11-12% do peso da partícula seca). Esta camada de polímero estabiliza o colóide e minimiza sua toxicidade<sup>(131,132)</sup>.

Devido ao seu elevado peso molecular ( $\bar{M}_w = 6,5 \times 10^6$  daltons<sup>(131)</sup>), Percoll apresenta importantes vantagens: baixa pressão osmótica, incapacidade de penetrar membranas biológicas e possibilidade de formar gradientes autogerados por centrifugação em campos inerciais moderados<sup>(133)</sup>. Além disso, Percoll é compatível com materiais biológicos, pode ser fornecido estéril e ser reesterilizado, pode ser facilmente removido do material purificado e tem viscosidade baixa. Suas desvantagens são o custo relativamente alto e a forte absorção no ultravioleta, devida à absorção da polivinilpirrolidona e ao espalhamento de luz pelas partículas coloidais.

Gradientes descontínuos são obtidos preenchendo-se um tubo com camadas de solução de diferentes concentrações. Gradientes contínuos podem ser obtidos por vários métodos, por exemplo, agitando levemente um gradiente descontínuo pré-formado ou gerando gradientes com auxílio de bombas pé

ristálticas. Gradientes autogerados podem ser obtidos, centrifugando-se soluções de Percoll em altos campos inerciais<sup>(127)</sup>. Tais gradientes são especialmente importantes para separação isopícnica de células e organelas. Assim, células podem ser bandeadas, sendo mantidas em Percoll durante a formação do gradiente. Em alguns casos, por exemplo, quando as partículas a serem bandeadas têm uma densidade superior à solução original de Percoll, é conveniente pré-formar os gradientes de Percoll, por centrifugação a alta velocidade de rotação, e depois usá-los para bandejamento isopícnico de células e partículas subcelulares.

Células podem ser bandeadas em baixo campo inercial, de maneira que altas velocidades de rotação são necessárias somente para a obtenção dos gradientes de densidade.

Neste capítulo são apresentados resultados relativos a uma nova técnica de centrifugação isopícnica. Nesta técnica os gradientes de densidade são autogerados por omocentrifugação a baixo campo inercial.

## 4.2. PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS

### 4.2.1. Materiais e Equipamento

#### Materiais:

Percoll - Pharmacia Fine Chemicals (nº 17891-01, lot HI 26238).

Ficoll - Pharmacia Fine Chemicals (nº 17-0400-01, lot HC-24638).

#### Equipamento:

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

Densímetro PAAR - DMA 60/602.

Refratômetro Abbe Bausch & Lomb.

Microscópio óptico Carl Zeiss.

4.2.2. Curvas de Calibração: Índice de Refração x Densidade

Foram medidas as densidades,  $\rho$ , de soluções aquosas de Percoll de diferentes concentrações, a 25°C, em densímetro PAAR - DMA 60/602. Os índices de refração,  $\eta$ , das mesmas soluções foram determinados, também a 25°C, em refratômetro Abbe, obtendo-se uma curva de calibração  $\eta \times \rho$ . Curvas análogas foram obtidas para Percoll em solução 0,15 M de cloreto de sódio e para Ficoll em solução aquosa. Os resultados são apresentados na Tabela 13 e as curvas de calibração na Figura 15.

TABELA 13. Índices de refração e densidades de soluções aquosas de Ficoll, Percoll e Percoll em cloreto de sódio 0,15 M, a 25°C.

Ficoll		Percoll		Percoll/NaCl 0.15 M	
$\eta_D^{25} \pm 0,0001$	$\rho \pm 0,00001$ (g.cm <sup>-3</sup> )	$\eta_D^{25} \pm 0,0001$	$\rho \pm 0,00001$ (g.cm <sup>-3</sup> )	$\eta_D^{25} \pm 0,0001$	$\rho \pm 0,00001$ (g.cm <sup>-3</sup> )
1,3406	1,01578	1,3361	1,02129	1,3370	1,02562
1,3486	1,03534	1,3400	1,04842	1,3405	1,04865
1,3576	1,05538	1,3435	1,07332	1,3442	1,07197
1,3655	1,07391	1,3476	1,10067	1,3475	1,09616
1,3736	1,09345	1,3517	1,12803	1,3510	1,11979

$$\eta_{\text{água}} = 1,3325$$

$$\rho_{\text{água}} = 0,99704$$

$$\eta_{\text{NaCl } 0,15 \text{ M}} = 1,3336$$

$$\rho_{\text{NaCl } 0,15 \text{ M}} = 1,00298$$



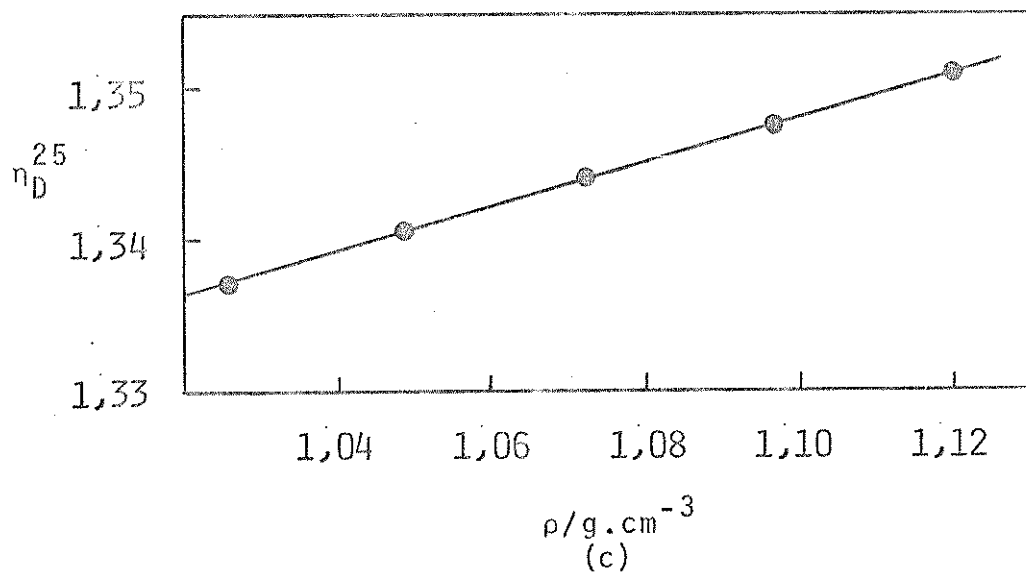
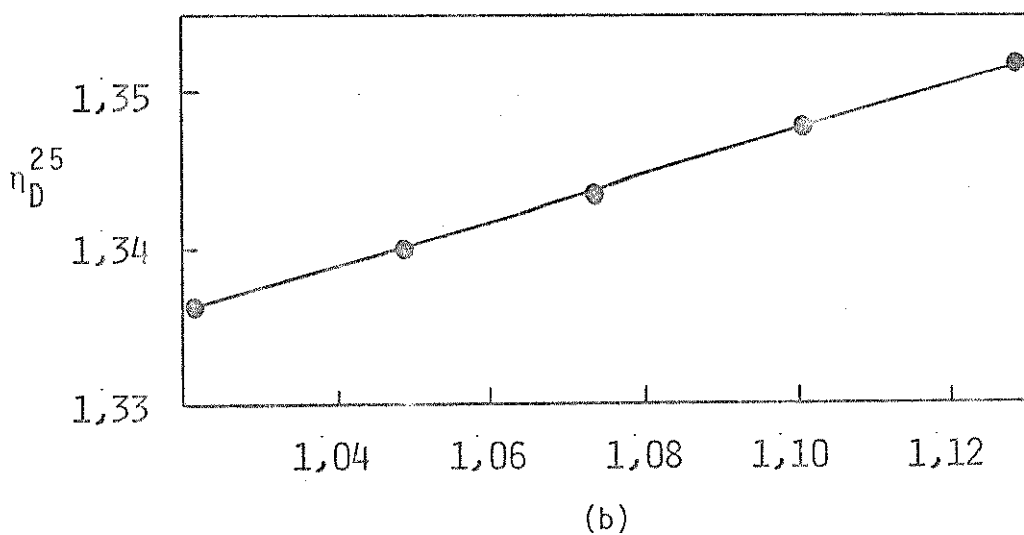
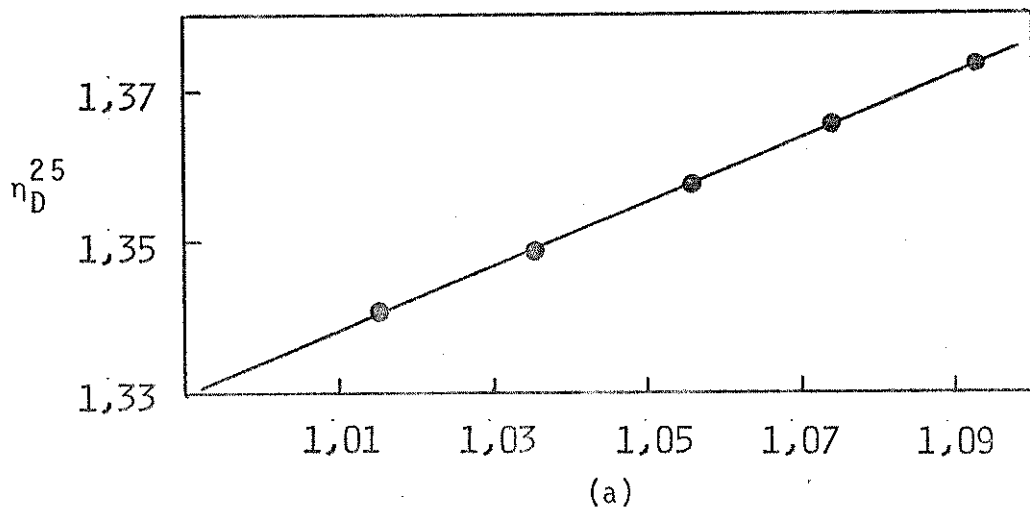


FIGURA 15. Curvas de calibração de índice de refração x densidades de soluções aquosas de (a) Ficoll, (b) Percoll e (c) Percoll em cloreto de sódio 0,15 M, a 25°C.

#### 4.2.3. Obtenção de Gradientes de Densidade por Osmocentrifugação

Foram realizados experimentos de osmocentrifugação, utilizando as células descritas na Figura 5 (Capítulo 3), providas de membranas de acetato de celulose, preparadas segundo procedimento descrito na seção 3.2.2, a partir da solução A.

Soluções de Percoll (densidade nominal  $1,12 \text{ g.cm}^{-3}$ ) foram centrifugadas nas células de osmocentrifugação durante 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , a velocidades de rotação entre 1000 e 3000 rpm (220 a  $2010 \times g$ ). Formaram-se gradientes acentuados, conforme a Figura 16. Foram obtidos gradientes de densidade com diferentes inclinações, a diferentes velocidades. Em experimentos de controle, onde a membrana foi substituída por um filme impermeável de PVC, foram obtidos gradientes muito suaves, nas mesmas condições. Os resultados são apresentados na Tabela 14. Experimentos similares foram realizados com soluções de Percoll em NaCl 0,15 M, centrifugando-as a 1800 rpm ( $725 \times g$ ) de 10 a 30 minutos. Os resultados são apresentados na Tabela 15 e as curvas obtidas são ilustradas na Figura 17. As soluções de Percoll em NaCl 0,15 M foram, também, centrifugadas durante 30 minutos a 1000 rpm ( $220 \times g$ ) e a 2500 rpm ( $1400 \times g$ ). Os resultados são apresentados na Tabela 16 e na Figura 18.

Experimentos de osmocentrifugação foram realizados com solução aquosa de Ficoll 27% (m/m) a  $4^{\circ}\text{C}$  e 3000 rpm ( $2010 \times g$ ), durante períodos de tempo entre 30 e 120 minutos. Os resultados são apresentados na Tabela 17 e os gradientes de densidade obtidos são mostrados na Figura 19.

TABELA 14. Gradientes de densidade de Percoll (densidade nominal  $1,12 \text{ g.cm}^{-3}$ ) obtidos por osmocentrifugação durante 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , a velocidades de rotação diferentes.

		Densidades ( $\text{g.cm}^{-3}$ )								
		1000			2000			3000		
Distância do menisco (cm)	Velocidade (rpm)	cont.			cont.			cont.		
	16,6		1,075	1,076	1,128	1,027	1,024	1,121	1,006	1,110
17,4		1,086	1,083	1,131	1,032	1,036	1,124	1,017	1,113	
18,1		1,094	1,103	1,131	1,051	1,055	1,121	1,027	1,117	
18,9		1,103	1,108	1,131	1,073	1,072	1,121	1,043	1,120	
19,6		1,114	1,114	1,130	1,093	1,087	1,123	1,073	1,121	
20,4		1,117	1,120	1,131	1,123	1,110	1,126	1,127	1,121	
21,1		1,132	1,132	1,131	1,148	1,149	1,128	1,161	1,121	
21,9		1,142	1,138	1,131	1,167	1,157	1,129	1,186	1,123	
22,6		1,146	1,146	1,132	1,194	1,182	1,129	1,208	1,125	
23,4		1,148	1,148	1,132	1,190	1,189	1,128	1,211	1,128	

TABELA 15. Gradientes de densidade de Percoll (em NaCl 0,15 M, densidade inicial =  $1,12 \text{ g.cm}^{-3}$ ) obtidos por osmocentrifugação a  $4^{\circ}\text{C}$ , a 1800 rpm, por tempos diferentes.

		Densidades ( $\text{g.cm}^{-3}$ )									
		16,6	17,4	18,1	18,9	19,6	20,4	21,1	21,9	22,6	23,4
Tempo (min)	Distância do menisco (cm)										
	10		1,046	1,072	1,083	1,099	1,108	1,116	1,122	1,142	1,169
10		1,040	1,066	1,089	1,096	1,105	1,112	1,124	1,136	1,164	1,190
20		1,022	1,047	1,064	1,082	1,095	1,109	1,124	1,155	1,205	1,207
20		1,026	1,046	1,066	1,084	1,103	1,111	1,139	1,170	1,221	1,223
30		1,021	1,043	1,056	1,070	1,090	1,112	1,136	1,189	1,254	1,205
30		1,013	1,025	1,040	1,068	1,083	1,110	1,145	1,181	1,245	1,230
30 (cont)		1,109	1,113	1,117	1,119	1,119	1,122	1,122	1,122	1,122	1,123

TABELA 16. Gradientes de densidade de Percoll (em NaCl 0,15 M, densidade inicial =  $1,12 \text{ g.cm}^{-3}$ ) obtidos por osmo-centrifugação a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.

Distância do menisco (cm) Velocidade (rpm)	Densidades ( $\text{g.cm}^{-3}$ )										
	16,6	17,4	18,1	18,9	19,6	20,4	21,1	21,9	22,6	23,4	
1000	1,047	1,076	1,087	1,103	1,110	1,116	1,126	1,141	1,155	1,199	
1000	1,047	1,072	1,092	1,104	1,112	1,120	1,126	1,136	1,175	1,188	
1000 (cont.)	1,120	1,120	1,122	1,122	1,122	1,122	1,122	1,122	1,122	1,123	
2500	1,009	1,017	1,029	1,041	1,062	1,093	1,152	1,213	1,274	1,239	
2500	1,009	1,017	1,026	1,042	1,060	1,092	1,149	1,197	1,252	1,257	
2500 (cont.)	1,115	1,119	1,120	1,120	1,120	1,121	1,122	1,122	1,123	1,124	

TABELA 17. Gradientes de densidade de Ficoll (densidade inicial =  $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$ ) obtidos por osmocentrifugação a  $4^{\circ}\text{C}$ , 3000 rpm.

Distância do menisco (cm) Tempo (min)	Densidades ( $\text{g.cm}^{-3}$ )										
	16,6	17,4	18,1	18,9	19,6	20,4	21,1	21,9	22,6	23,4	
30	0,998	1,037	1,044	1,046	1,051	1,052	1,056	1,057	1,058	1,060	
30 (cont.)	1,052	1,057	1,057	1,057	1,058	1,058	1,058	1,059	1,059	1,059	
60	1,037	1,041	1,045	1,049	1,052	1,056	1,058	1,059	1,063	1,064	
60 (cont.)	1,054	1,055	1,057	1,058	1,058	1,058	1,058	1,059	1,059	1,059	
90	1,031	1,038	1,042	1,047	1,051	1,055	1,058	1,060	1,063	1,065	
90 (cont.)	1,053	1,055	1,058	1,058	1,058	1,058	1,059	1,059	1,059	1,059	
120	1,031	1,039	1,042	1,049	1,052	1,056	1,059	1,062	1,067	1,065	

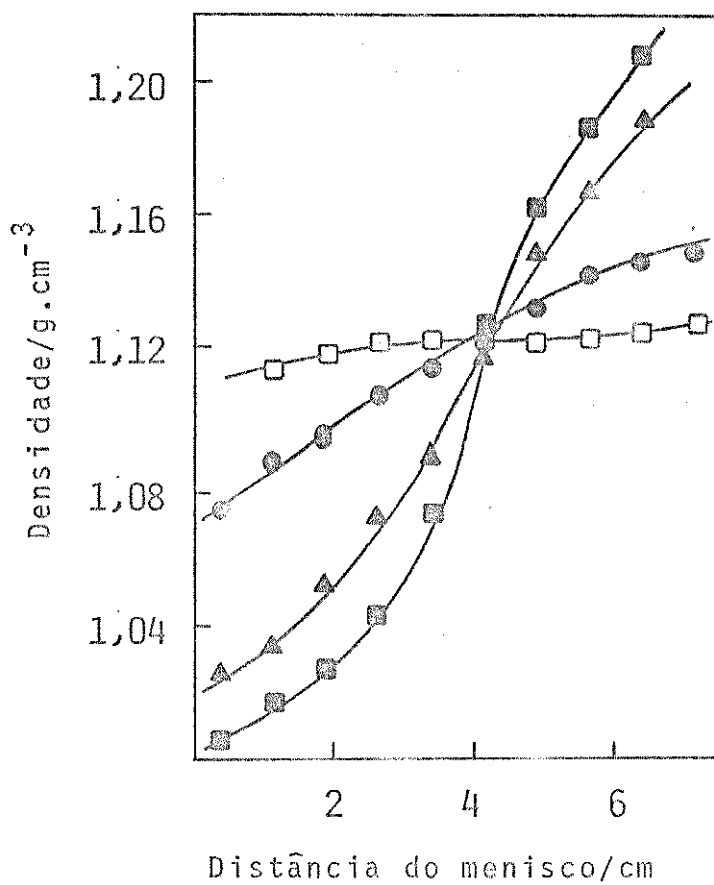


FIGURA 16. Gradientes de densidade de Percoll (densidade nominal  $1,12 \text{ g.cm}^{-3}$ ) obtidos por osmocentrifugação durante 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ , a (●) 220, (▲) 900 e (■) 2010 x  $g$ ; (□) experimento de controle (centrifugação convencional a 2010 x  $g$ ).

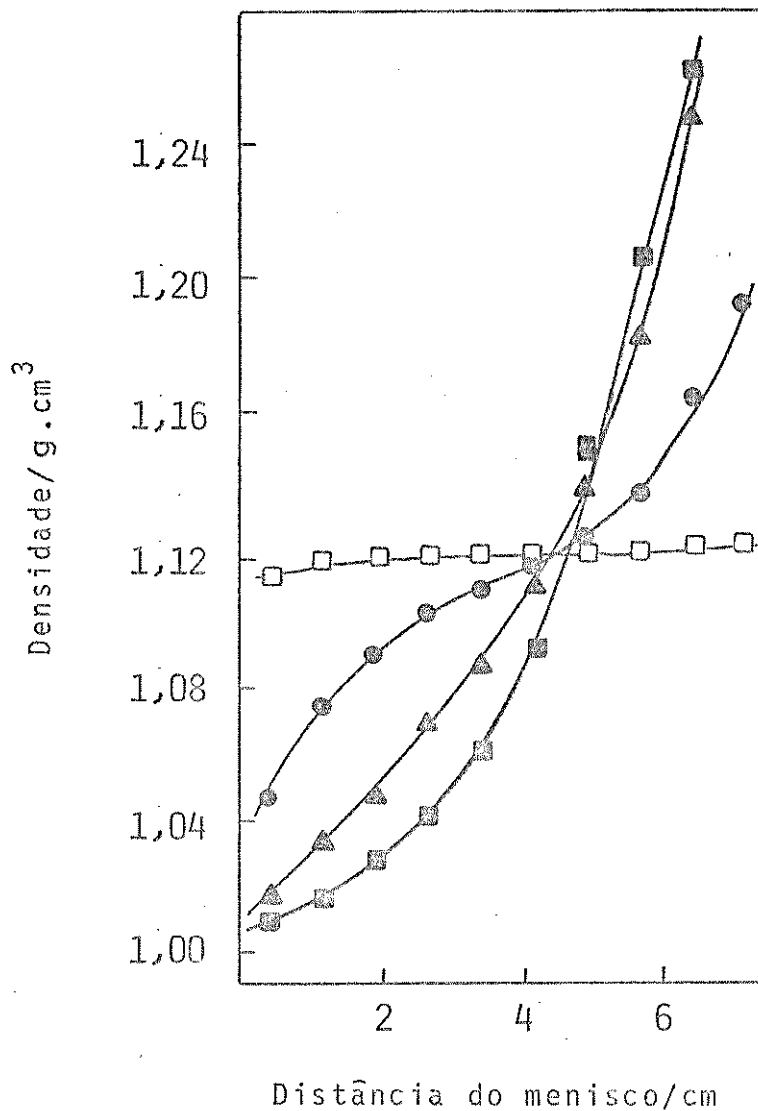


FIGURA 18. Gradientes de densidade de Percoll (em NaCl 0,15 M, densidade inicial 1,12 g. cm<sup>-3</sup>), obtidos por osmocentrifugação durante 30 minutos, a 4<sup>o</sup>C, a (●) 220, (▲) 710 e (■) 1400 x g; (□) experimento de controle (centrifugação convencional a 1400 x g).

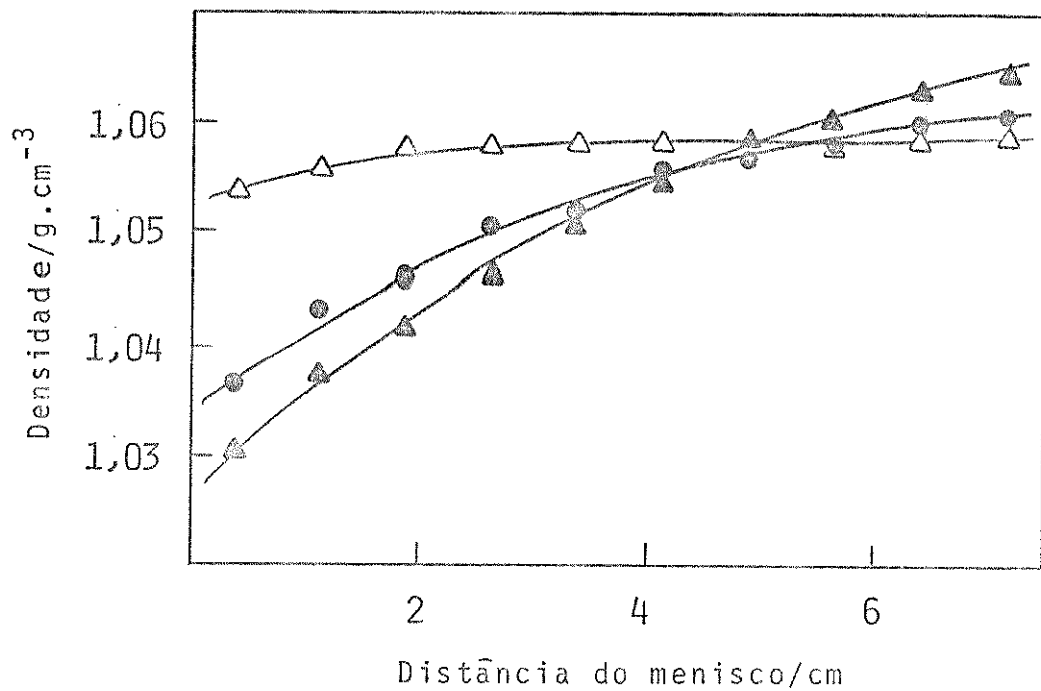


FIGURA 19. Gradientes de densidade de Ficoll (densidade inicial  $1,06 \text{ g.cm}^{-3}$ ), obtidos por osmocentrifugação a  $2010 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , durante (●) 30 e (▲) 90 minutos; (Δ) experimento de controle (centrifugação convencional durante 90 minutos).

#### 4.2.4. Osmocentrifugação de Sangue em Gradientes de Densidade

Amostras de sangue foram centrifugadas em uma coluna de Percoll em células de osmocentrifugação. Dois tipos de experimentos foram realizados: um com amostras de sangue humano diluído 1:5 com solução 0,15 M de NaCl e outro com amostras de sangue diluído com água e, portanto, hemolisado. As amostras (0,6 ml) foram aplicadas no topo de uma coluna homogênea de Percoll (em NaCl 0,15 M, densidade inicial  $1,12 \text{ g.cm}^{-3}$ ) de 6,8 cm de altura. O compartimento do solvente foi preenchido com solução 0,15 M de NaCl e as células foram centrifugadas durante 30 minutos a  $710 \times g$ . Experimentos de controle dos dois tipos foram, também, realizados. Os experimentos foram fotografados e os resultados são mostrados na Figura 20. Foram, então, retiradas alíquotas, que foram observadas em microscópio óptico para verificar a presença ou não de hemáceas.

À medida que os gradientes de Percoll se formavam nas células de osmocentrifugação, as amostras de sangue sedimentaram e, quando se utilizou sangue não-hemolisado, uma banda estreita de hemáceas foi observada a aproximadamente 4 cm do menisco, que corresponde a uma densidade de  $1,10 \text{ g.cm}^{-3}$ , a densidade esperada para bandeamento isopícnico de hemáceas<sup>(133)</sup>. Usando sangue hemolisado, uma banda larga e difusa foi observada na metade superior da coluna. Nos experimentos de controle, onde os gradientes de concentração não foram obtidos, as zonas de sangue aplicadas no topo da coluna de Percoll não se moveram significativamente.



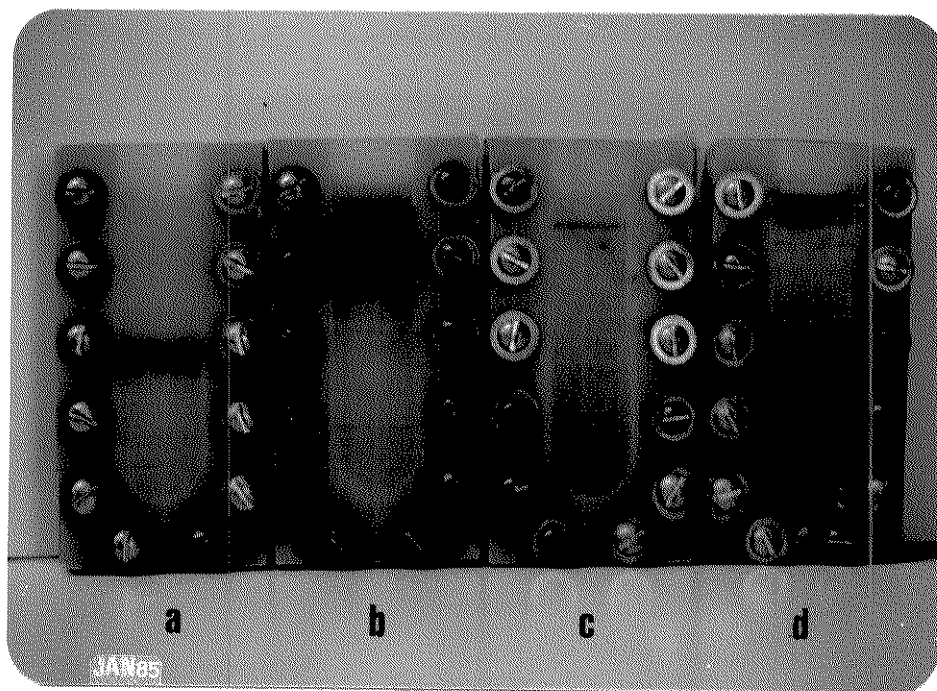


FIGURA 20. Bandeamento de sangue em gradientes de densidade de Percoll. Amostras de (a,c) sangue e (b,d) sangue hemolisado foram aplicadas no topo de uma solução homogênea de Percoll (em NaCl 0,15 M, densidade inicial  $1,12 \text{ g.cm}^{-3}$ ). Experimentos de (a,b) osmocentrifugação e (c,d) centrifugação convencional foram realizados durante 30 minutos a  $710 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3. DISCUSSÃO

Gradientes de densidade de Percoll com inclinações de até  $7,5 \times 10^{-3} \text{ g.ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  no meio do tubo de centrifugação (a 4 cm do menisco) foram obtidos por Pertoft e colaboradores<sup>(132)</sup> por centrifugação convencional a  $10^6 \text{ g} \times \text{min}$  (campo inercial  $\times$  tempo de centrifugação). Segundo a Tabela 18, as inclinações dos gradientes de densidade de Percoll, obtidos por osmocentrifugação, durante 30 minutos, em baixo campo inercial são comparáveis àqueles obtidos por centrifugação convencional a  $10^6 \text{ g} \times \text{min}$ . Por exemplo, gradientes de densidade de Percoll com inclinações de  $11 \times 10^{-3} \text{ g.ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  foram obtidos por osmocentrifugação a  $6,6 \times 10^3 \text{ g} \times \text{min}$ .

Gradientes de densidade com diferentes inclinações, adequadas para diferentes experimentos de separação, podem ser obtidos, variando-se o tempo e a velocidade de osmocentrifugação. Mesmo gradientes de densidade de Ficoll podem ser gerados após 30 minutos de osmocentrifugação a  $2010 \times \text{g}$ . Gradientes mais acentuados podem ser obtidos após algumas horas de centrifugação.

Nos experimentos descritos neste capítulo, os tempos utilizados foram muito curtos para que o equilíbrio de sedimentação do soluto formador de gradiente fosse alcançado. No planejamento de experimentos para fracionamento de partículas por osmocentrifugação em gradientes de densidade é necessário considerar dois pontos principais: i) a velocidade de sedimentação das partículas e ii) a velocidade de formação e de alteração do gradiente de densidade.

Quando as partículas a serem separadas são muito grandes, é conveniente pré-formar o gradiente de densidade e só então

TABELA 18. Caracterização de gradientes de densidade autogerados.

Material	Solvente	Densidades iniciais ( $\text{g.cm}^{-3}$ )	Campos inerciais $\times$ tempos $\times 10^{-3}$ ( $g \times \text{min}$ )	Gradientes de densidade <sup>a</sup> $\times 10^3$ ( $\text{c.ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 10^3$ )	Método
Percol	água	1,12	6,6	14	osmocentrifugação
			27	33	osmocentrifugação
			60	63	osmocentrifugação
Percol	NaCl 0,15 M	1,12	6,6	11	osmocentrifugação
			22	34	osmocentrifugação
			42	34	osmocentrifugação
Ficol	água	1,06	60	3	osmocentrifugação
Percol	NaCl 0,15 M	1,06 - 1,13	1000	6	ultracentrifugação <sup>(132)</sup>
		1,05 - 1,14	1000	7,5	ultracentrifugação <sup>(132)</sup>

<sup>a</sup> Gradiente de densidade ( $dp/dz$ ) à meia altura da célula de centrifugação, onde  $z$  é a distância entre o menisco e um ponto da célula.

aplicar a amostra. Em experimentos com partículas tais como hemáceas, a amostra pode ser aplicada sobre uma solução homogênea de Percoll ou Ficoll e o gradiente de densidade pode ser gerado simultaneamente com a sedimentação das partículas.

Portanto, a geração de gradientes de densidade por osmo-centrifugação, que pode ser feita em centrífugas de baixa velocidade, pode ser vista como uma alternativa efetiva ao uso de ultracentrifugação em altos campos inerciais<sup>(134)</sup>.

## 5. OSMOCENTRIFUGAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO DE ALBUMINA EM PRESENÇA DE POLIELETRÓLITOS

### 5.1. INTRODUÇÃO

#### 5.1.1. Complexos de Polieletrólitos

A interação entre polieletrólitos de carga oposta despertou o interesse de bioquímicos e biofísicos, uma vez que grande parte dos polímeros biológicos em sistemas vivos aparecem iônicamente associados.

Um dos primeiros estudos sobre a associação iônica entre polieletrólitos foi desenvolvido por Bungenberg de Jong (135,136), que investigou sistemas naturais tais como gelatina e goma arábica. Ele observou, que certos polieletrólitos em solução podem formar coacervados, isto é, fases separadas contendo maior quantidade de polímero que a solução restante. Tais coacervados ocorrem normalmente quando um dos componentes poliméricos é negativamente carregado (por exemplo, goma arábica) e o outro positivamente carregado (por exemplo, gelatina).

Deuel e colaboradores (137) estenderam o estudo de Bungenberg de Jong a outros polímeros naturais e sintéticos, tais como polietilenoimina. Porém, até então, somente polieletrólitos levemente ácidos ou levemente básicos haviam sido investigados. Fuoss e Sadek (138) observaram que a interação entre poliânions fortemente ácidos e policátions fortemente básicos fornecem precipitados coloidais com quantidades estequiométricas dos poliions, ao invés de coacervados gelatinosos.

Uma explicação provável para a formação dos complexos entre espécies de alto peso molecular parece ser a "tendência de escape" dos microions associados a cada poliion (139). A

interação entre pares de poliíons libera uma quantidade de microíons, que se difundem livremente para o meio do solvente, de maneira que o aumento de entropia devido à liberação dos microíons excede o decréscimo de entropia devido à condensação dos pares polication-poliânion. A hipótese de que a formação dos complexos é entropicamente dirigida é reforçada pela observação de que o complexo pode se dissolver em soluções de eletrólitos concentradas. Em alguns casos, porém, os próprios microíons podem limitar as interações, permitindo rearranjos de segmentos de cadeias logo após o contato entre elas e favorecendo a formação de complexos não estequiométricos. Complexos não-estequiométricos podem ser obtidos, variando as proporções relativas dos poliíons em solução.

Complexos de polieletrólitos têm o aspecto de resinas amorfas, homogêneas, transparentes, extremamente duras e quebradiças quando secas, mas bastante flexíveis quando úmidas. São altamente permeáveis a água, eletrólitos e outros microssolutos, mas são impermeáveis a macrossolutos. Possuem alta constante dielétrica quando úmidos e dopados com íons.

Estas propriedades podem favorecer importantes aplicações práticas. Por exemplo, devido à sua alta permeabilidade a água, os complexos de polieletrólitos são utilizados na obtenção de membranas para ultrafiltração. Ainda devido à sua permeabilidade à água e à maioria dos microssolutos encontrados no corpo humano e devido à sua semelhança com tecidos tais como colágeno, os complexos de polieletrólitos podem ser utilizados como substitutos de tecidos biológicos<sup>(139)</sup>.

### 5.1.2. Complexos entre Proteínas e Polieletrólitos Sintéticos

A associação entre proteínas diferentes em valores de pH entre seus pontos isoelétricos pode ser responsável por problemas sérios durante o fracionamento de proteínas. Por outro lado, esta mesma associação pode ser utilizada para auxiliar a separação de grupos de proteínas<sup>(140)</sup>.

A adição de um novo componente macromolecular carregado a uma solução, contendo uma mistura de proteínas, pode favorecer a separação seletiva de uma ou mais delas, através da formação de complexos. A complexação de proteínas por macroligantes solúveis em água foi utilizada por Hubert e colaboradores<sup>(141,142)</sup> para purificação de proteínas por partição de afinidade e filtração em gel e por Adamski-Medda e colaboradores<sup>(143)</sup> para ultrafiltração bioespecífica.

Sternberg e Hershberger<sup>(144)</sup> observaram que proteínas podiam ser precipitadas com ácido poliacrílico, sendo recuperadas, essencialmente, purificadas e sem desnaturação. A recuperação de proteínas através da formação de complexos insolúveis com polieletrólitos parece ter grande interesse prático. Comparada com outros métodos usados para separação de proteínas em larga escala, tais como precipitação por solvente ou "salting out", a complexação com polieletrólitos tem um custo geralmente baixo, visto que são utilizados reagentes relativamente baratos, efetivos em concentrações baixas e que não provocam problemas sérios de recuperação de efluentes.

A complexação de proteínas com ácido poliacrílico foi aplicada por Sternberg e colaboradores<sup>(145)</sup> à recuperação de proteínas do soro de leite. Na fabricação de queijo, o so-

ro de leite não aproveitado contém 5% de proteínas de alto valor nutricional. O método permitiu a recuperação de 86% das proteínas. Para isto, adicionou-se o ácido poliacrílico ao soro de leite, com pH 3,8-4,2, obtendo-se um precipitado branco, que foi separado por centrifugação ou filtração. Uma reação com carbonato de magnésio regenerou as proteínas, praticamente, sem desnaturação, obtendo-se um material com baixa concentração de lipídeos, lactose e muito pouco reagente residual.

Morawetz e Hughes<sup>(146)</sup> estudaram interações entre albumina bovina e alguns polieletrólitos sintéticos (ácido polimetacrílico, copolímero estireno-anidrido maleico, polivinilamina e copolímero ácido metacrílico-metacrilato de dietilaminoetila), investigando a utilidade dos reagentes para fracionamento de proteínas. A albumina bovina foi escolhida para os testes, pois, devido à sua alta solubilidade em água, somente precipitantes altamente efetivos seriam capazes de retirá-la da solução. A recuperação da proteína no seu estado nativo é um requisito importante para o processo de fracionamento. O ácido polimetacrílico e a polivinilamina puderam ser quantitativamente precipitados das soluções de albumina por íons sulfato e bário e a albumina foi recuperada intacta. Mesmo nos complexos de albumina com o copolímero estireno-ácido malêico não houve evidências de desnaturação, embora as forças de ligação entre a proteína e o polieletrólito fossem tão fortes que a separação dos componentes individuais foi impossibilitada. A aplicação dos polieletrólitos no fracionamento de proteínas foi ilustrado por Morawetz e Hughes através da separação entre albumina e oxihemoglobina, utilizando ácido polimetacrílico em pH entre os pontos isoelétricos das proteínas.

A ligação entre albumina e polieletrólitos sintéti



cos tem também interesse como modelo para investigação das interações entre polímeros biológicos "in vivo". Kuramoto e colaboradores (147) estudaram, recentemente, a complexação de albumina e ácido poliacrílico por viscosimetria, dicróismo circular e fluorescência.

No fracionamento de proteínas, para evitar desnaturação, é recomendável que o pH de precipitação não exceda os limites (extremamente ácidos ou alcalinos) de estabilidade da proteína. Em alguns casos, por exemplo, no fracionamento de proteínas do sangue, cujos pontos isoeletrícos são usualmente ácidos, pode ser conveniente o uso de polieletrólitos com carga positiva (146).

Neste capítulo, a formação de complexos entre albumina bovina e poliacrilamida catiônica é investigada, variando-se as proporções de polieletrólito e o pH da solução, em experimentos de centrifugação e osmocentrifugação. Poliacrilamidas têm um papel importante como floculante de partículas (148, 149) para clarificação de água, podendo ser encontradas na forma não-iônica, aniônica ou catiônica.

## 5.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.2.1. Materiais e Equipamento

#### Materiais

Poliacrilamida Crosfield Polyelectrolytes, Crosfloc CFC 307.

Albumina bovina A-2153 Sigma - lot 41F - 0059.

#### Equipamento

Centrífuga refrigerada de caçapas basculantes,

RC-3B Sorvall Instruments.

Espectrofotômetro UV-visível Micronal B 382.

Densímetro PAAR-DMA 60/602.

pH-metro Micronal B 274.

## 5.2.2. Caracterização da Poliacrilamida

### 5.2.2.1. Determinação do Volume Específico Parcial da Poliacrilamida

Para a determinação do volume específico parcial da poliacrilamida, utilizou-se a equação 99

$$V = \frac{(m_1 + m_2)}{\rho} = \bar{v}_1 m_1 + \bar{v}_2 m_2 \quad (99)$$

onde  $V$  é o volume de solução;  $m_1$  e  $m_2$  são, respectivamente, as massas de solvente e de soluto;  $\bar{v}_1$  e  $\bar{v}_2$  são os volumes específicos parciais de solvente e de soluto;  $\rho$  é a densidade da solução.

Foram preparadas soluções aquosas de poliacrilamida a partir de uma amostra seca do polímero, que havia sido mantida em dessecador com  $H_3PO_4$  até peso constante. Determinaram-se as densidades em densímetro PAAR-DMA 60/602 e, considerando uma massa fixa de água ( $m_1 = 6,00000$  g), traçou-se um gráfico de volume de solução em função de massa de poliacrilamida (Figura 21) com os valores apresentados na Tabela 19. A partir do coeficiente angular da reta  $V \times m_2$ , obteve-se o valor de  $\bar{v}_2 = 0,666 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  para a poliacrilamida.

TABELA 19. Valores de densidade de poliacrilamida em função da concentração.

Concentração (% (m/m))	$\rho$ (g.cm <sup>-3</sup> )	V (cm <sup>3</sup> )	$m_2 \times 10^2$ (g)
0	0,997043	6,01778	0
0,1657	0,997494	6,02506	0,99585
0,2826	0,997910	6,02961	1,70041
0,5029	0,998493	6,03943	3,03265
0,6489	0,999294	6,04346	3,91883

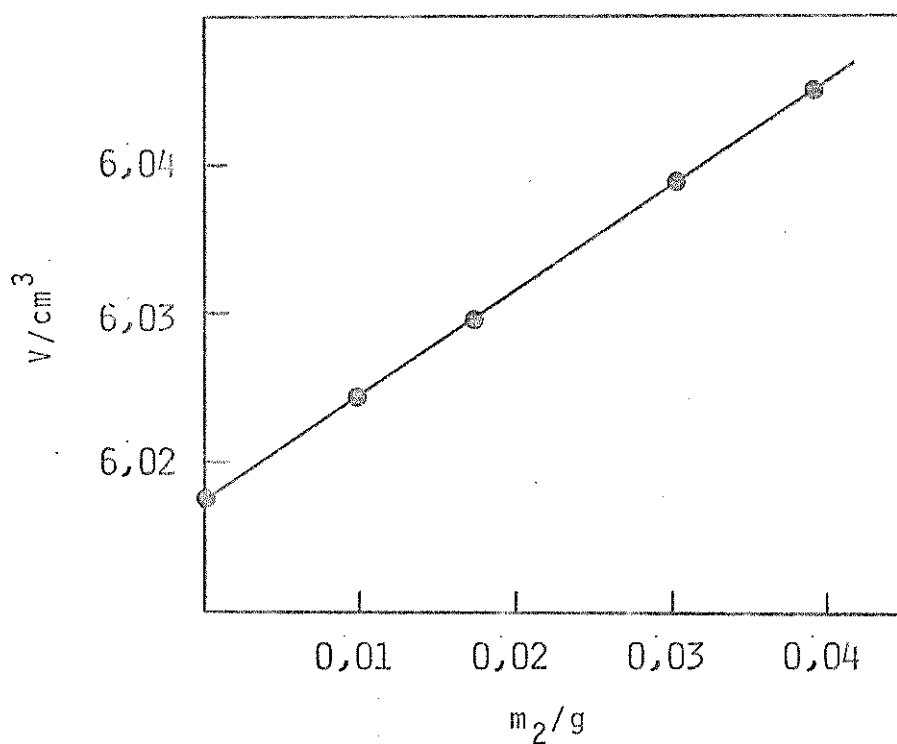


FIGURA 21. Determinação de  $\bar{v}$  da poliacrilamida. Gráfico de  $V$  em função de  $m_2$  com massa de solvente constante ( $m_1 = 6,00000$  g).

### 5.2.2.2. Determinação do Peso Molecular da Poliacrilamida

Determinou-se o peso molecular médio da amostra de poliacrilamida CFC 307 utilizada nos experimentos descritos na seção 5.2.4, por osmocentrifugação. Utilizaram-se as células descritas na Figura 5, providas de membranas de acetato de celulose, preparadas a partir da solução A (seção 3.2.2). Foram realizados experimentos a várias concentrações e alíquotas de solução, retiradas a diferentes alturas, foram analisadas por medidas de densidade (ao invés de absorbância).

Os experimentos de osmocentrifugação foram realizados a 900 rpm ( $180 \times g$ ), a  $6^{\circ}\text{C}$ . Os resultados são apresentados na Tabela 20 e uma curva de  $\ln c_2 \times r$  é apresentada na Figura 22. As concentrações das alíquotas de solução foram calculadas a partir de valores de densidade<sup>(43)</sup>, através da equação 70

$$c_2 = \frac{\rho - \rho_1}{1 - \rho_1 \bar{v}_2}$$

onde  $\rho_1$  é a densidade do solvente.

Calcularam-se a diferentes concentrações, a partir da equação 93, os pesos moleculares aparentes da poliacrilamida, que são apresentados na Tabela 21.

A curva de  $\frac{1}{\bar{M}_{2ap}}$  x concentração apresentada na Figura 23, de acordo com a equação 96, foi extrapolada à concentração zero, fornecendo um valor de  $\bar{M}_w = (2,70 \pm 0,87) \times 10^4$  e de  $B_{SD} = -1 \times 10^{-3} \text{ ml.mol.g}^{-2}$ .

TABELA 20. Osmocentrifugação de poliacrilamida CFC 307 em solução aquosa a 900 rpm (160 x g), 6°C.

r (cm) Tempo (h)	Concentração x 10 <sup>3</sup> (g.ml <sup>-1</sup> )										
	17,2	17,9	18,7	19,4	20,2	20,9	21,7	22,4	23,2	23,9	Solv.
285	0,744	0,804	0,823	0,883	0,883	0,913	0,992	1,01	1,05	1,12	0,134
	0,695	0,804	0,843	0,843	0,952	0,972	0,992	0,883	1,05	1,11	0,128
	0,764	0,823	0,863	0,883	0,952	0,952	0,992	1,03	0,972	1,11	0,119
	1,12	1,98	2,17	2,28	2,43	2,77	2,79	3,11	3,60	3,81	0,324
	1,16	1,96	2,17	2,26	2,45	2,71	2,88	3,13	3,54	3,75	0,316
281	0,653	0,762	0,940	0,810	1,21	1,28	1,45	1,57	1,79	1,84	0,027
306	0,672	0,886	1,00	1,10	1,19	1,27	1,46	1,60	1,75	2,02	0,095
	1,05	1,35	1,60	1,91	2,25	2,55	2,71	3,38	3,17	3,95	0,152
	1,25	1,37	1,65	2,00	2,12	2,48	2,91	3,13	3,33	3,82	0,241

TABELA 21. Pesos moleculares de poliacrilamida CFC 307 calculados a partir da Tabela 8.

$\bar{c}_2 \times 10^3$ (g.ml <sup>-1</sup> )	$\rho$ (g.ml <sup>-1</sup> )	$\bar{M}_{2ap} \times 10^{-4}$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$\frac{1}{\bar{M}_{2ap}} \times 10^5$ (mol.g <sup>-1</sup> )
2,61	0,997921	2,82	3,55
2,60	0,997917	2,79	3,59
1,30	0,997478	2,92	3,43
2,39	0,997847	3,39	2,95
2,43	0,997860	2,96	3,38
1,23	0,997456	2,69	3,72

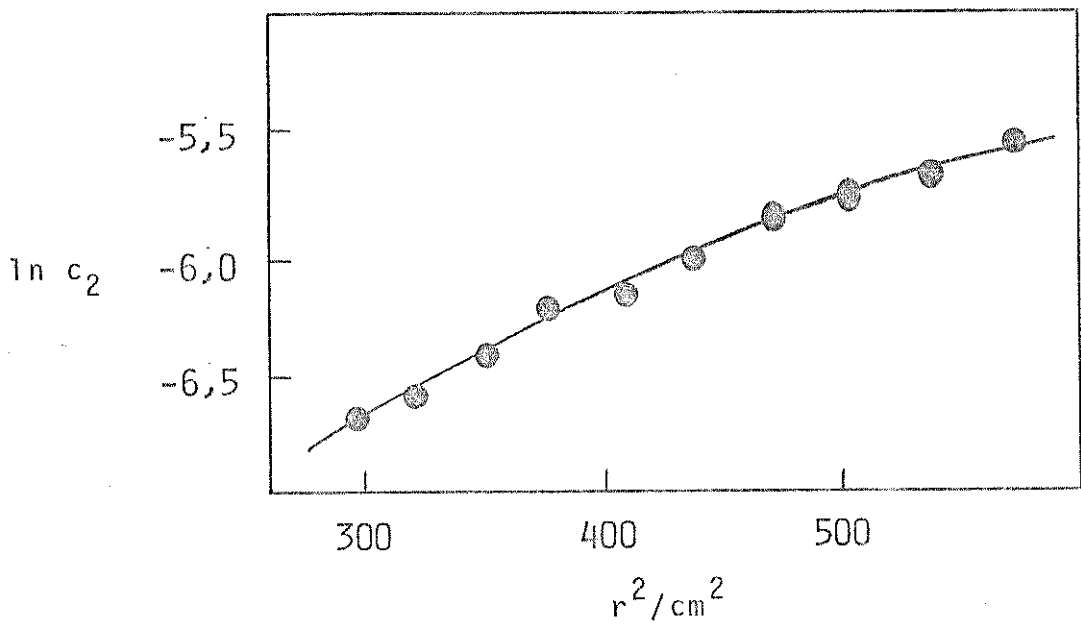


FIGURA 22. Gráfico de  $\ln c_2$  em função do quadrado da distância entre o eixo de rotação e um ponto na célula. Solução aquosa de poliacrilamida 2,4 g/l, após 306 h de osmocentrifugação a 900 rpm, 6°C.

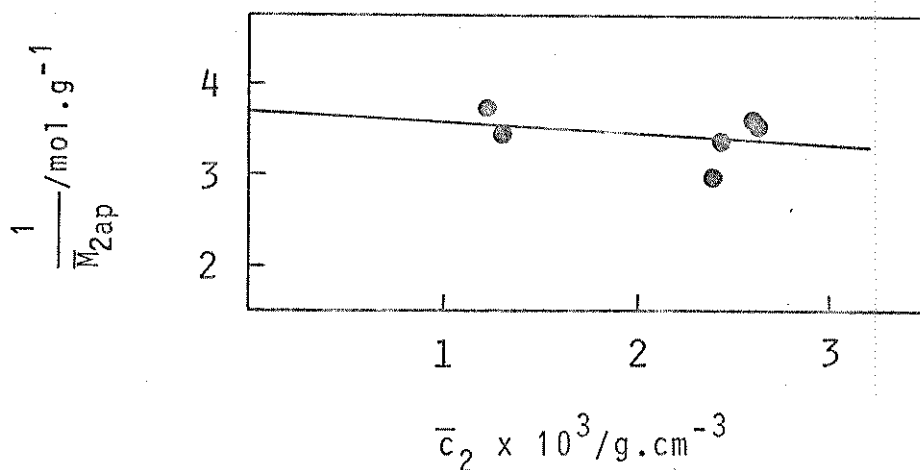


FIGURA 23. Gráfico de  $\frac{1}{\bar{M}_{2ap}}$  x concentração de poliacrilamida CFC 307 em solução aquosa.

#### 5.2.2.3. Titulação da Poliacrilamida com Ácido Poliacrílico

Com o objetivo de avaliar a densidade de carga da poliacrilamida (CFC 307) utilizada, foi efetuada uma titulação com ácido poliacrílico. A solução de ácido poliacrílico foi previamente dialisada contra água bidestilada, para eliminar impurezas. Determinou-se a densidade da solução ( $\rho = 0,999720 \text{ g.ml}^{-1}$ ) e conhecendo o valor de  $\bar{v}_2 = 0,73 \text{ ml.g}^{-1}$  (150) e utilizando-se a equação 70, obteve-se a concentração da solução. O pH da solução (pH 3,28) foi, então, com a adição de uma solução 0,6% de NaOH, elevado a 4,75 que coincide com o pK do ácido poliacrílico (151), isto é, o ponto de meia neutralização. A concentração final de ácido poliacrílico foi igual a 0,892% (m/m).

Diferentes proporções da solução de ácido poliacrílico foram adicionadas a alíquotas de uma solução este que de poliacrilamida ( $c_2 = 0,599\%$  (m/m)), mantendo um volume total constante. Formaram-se diferentes proporções de precipitado, que foi devidamente filtrado em funil de placa porosa, lavado com pequena quantidade de água e deixado em dessecador com sílica gel. O material seco foi pesado e os resultados são apresentados na Tabela 22. Um gráfico de massa de precipitado em função de concentração de poliacrilamida em solução (Figura 24) mostra um ponto máximo correspondente a 0,222% de poliacrilamida e 0,561% de ácido poliacrílico. Assim, neste ponto, a relação massa de ácido poliacrílico/massa de poliacrilamida é 2,53. Considerando que o mol de monômero do ácido poliacrílico pesa 71 g e que cada monômero contém um grupo carboxila, mas somente metade do número total destes grupos se encontra ionizada no polímero (em  $\text{pH} = \text{pK}$ ), é possível estimar a presença de 0,0178 mol de cargas positivas por grama de poliacrilamida, isto é, que o equivalente de monômero da poliacrilamida é 56 g.

TABELA 22. Titulação da poliacrilamida com ácido poliacrílico.

$c$ (ác. poliacrílico) %	$c$ (poliacrilamida) %	Massa de precipitado (g)
0,8028	0,0599	0,00765
0,7136	0,1198	0,01106
0,6244	0,1797	0,01495
0,4460	0,2995	0,01361
0,3568	0,3594	0,01231
0,2676	0,4192	0,00816
0,1784	0,4792	0,00622
0,0892	0,5391	0,00356



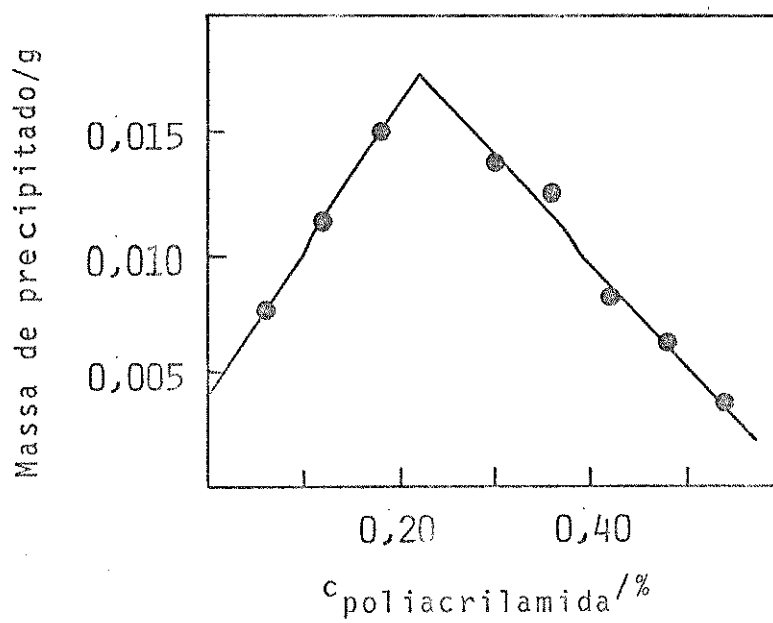


FIGURA 24. Titulação de poliacrilamida CFC 307 com ácido poliacrílico. Massa do precipitado obtido em função da concentração de poliacrilamida.

### 5.2.3. Método de Biureto para Análise de Proteínas

Nos experimentos descritos neste capítulo, o conteúdo de albumina foi analisado pelo método de Biureto<sup>(152)</sup>, pois a poliacrilamida presente na maioria das soluções investigadas, também, absorvia na região ultravioleta.

Preparou-se o reagente de Biureto: adicionaram-se 2,6 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 9 g de tartarato de sódio e potássio a 500 ml de solução 0,2 N de NaOH contendo 5 g de KI; elevou-se o volume a 1 l com solução 0,2 N de NaOH.

Para análise da proteína, adicionaram-se 1,5 ml de reagente de Biureto a 1 ml da solução investigada, misturando e aquecendo a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Esfriando até a temperatura ambiente, determinou-se a absorbância a 540 nm. A concentração de proteína foi determinada através de uma curva de calibração (Figura 25) de absorbância a 540 nm x concentração de albumina. Os valores experimentais utilizados para a construção da curva de calibração são apresentados na Tabela 23.

TABELA 23. Curva de calibração de absorbância a 540 nm x concentração de albumina para soluções analisadas com reagente de Biureto.

Concentração (%)	$A_{540}$
1,980	1,010
1,320	0,999
0,990	0,916
0,495	0,525
0,198	0,232
0	0,041

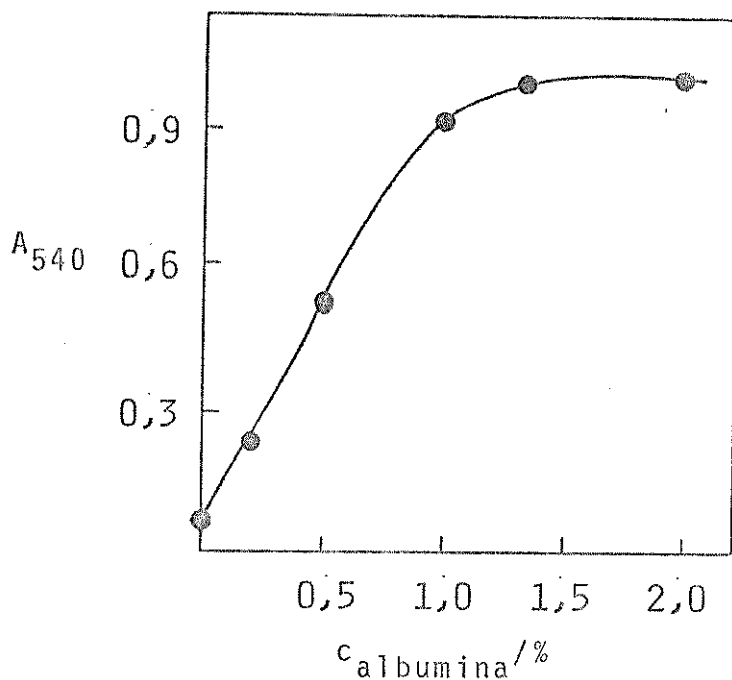


FIGURA 25. Curva de calibração de absorvância a 540 nm x concentração de albumina para soluções analisadas com reagente de Biureto.

#### 5.2.4. Centrifugação e Osmocentrifugação de Albumina em Presença de Poliacrilamida

Observou-se que soluções de albumina em presença de poliacrilamida catiônica apresentam turbidez na ausência de cloreto de sódio e em pH acima do ponto isoelétrico da proteína ( $pI = 4,7$  <sup>(95)</sup>)

Centrifugaram-se soluções de albumina em presença de poliacrilamida catiônica em pH 6,5, a 4000 rpm, 4°C, duran-

te 7 horas. Utilizaram-se as células descritas na Figura 5, providas de membranas de acetato de celulose preparadas a partir da solução A (seção 3.2.2) ou, no caso dos controles, de um filme impermeável de PVC. Após a centrifugação, alíquotas retiradas a diferentes alturas foram analisadas quanto ao conteúdo de albumina pelo método de Biureto. Antes, porém, a cada mililitro das alíquotas, foi adicionado 0,1 ml de solução 5% (m/m) de NaCl, para eliminar a turbidez das soluções, evitando interferência nas medidas espectrofotométricas. Na Tabela 24, são apresentados resultados de experimentos de osmocentrifugação e centrifugação normal, onde foram variadas as proporções de albumina/poliacrilamida, mantendo-se uma concentração total de soluto aproximadamente 1% (m/m).

A Tabela 25 mostra os resultados de experimentos onde soluções 0,5% (m/m) de albumina em NaCl 0,5% (m/m) e soluções aquosas 0,5% (m/m) de poliacrilamida catiônica foram centrifugadas separadamente. As concentrações de poliacrilamida foram determinadas através de medidas de densidade.

A partir dos dados apresentados na Tabela 24, é possível calcular a percentagem de massa de albumina acumulada no quinto inferior da célula de centrifugação (e osmocentrifugação) em função da relação concentração de albumina/concentração de poliacrilamida, conforme a Figura 26. Observa-se um máximo correspondente a  $c_{ALB}/c_{PAM} = 1,75$ .

Para verificar o efeito do pH sobre a sedimentação de albumina em presença de poliacrilamida catiônica, realizaram-se experimentos de osmocentrifugação de soluções 0,36% (m/m) de albumina e 0,45% (m/m) de poliacrilamida com valores de pH diferentes (pH diminuído com adição de ácido clorídrico). Os resultados estão apresentados na Tabela 26.

TABELA 24. Experimentos de osmocentrifugação e centrifugação normal (controle) de albumina em presença de poliacrilamida catiônica, a 4000 rpm, 4°C, pH 6,5.

r (cm) $\frac{c_{ALB}}{c_{PAM}}$ <sup>a</sup>	Concentrações de albumina (%)				
	17,0	18,5	20,0	21,5	23,0
0,23 <sup>b</sup>	0,060	0,090	0,145	0,240	0,388
0,23 <sup>c</sup>	0,160	0,180	0,180	0,180	0,194
0,67 <sup>b</sup>	0,030	0,080	0,190	0,345	1,07
0,67 <sup>c</sup>	0,135	0,165	0,210	0,320	0,755
1,67 <sup>b</sup>	0,020	0,040	0,042	0,043	2,67
1,67 <sup>c</sup>	0,042	0,050	0,058	0,055	2,66
2,33 <sup>b</sup>	0,037	0,072	0,094	0,110	2,67
2,33 <sup>c</sup>	0,110	0,121	0,121	0,121	2,79
3,33 <sup>c</sup>	0,242	0,253	0,253	0,264	2,14
3,70 <sup>b</sup>	0,130	0,180	0,230	0,320	1,80
3,70 <sup>c</sup>	0,250	0,280	0,295	0,285	1,50

<sup>a</sup> Relação entre concentrações de albumina e poliacrilamida catiônica.

<sup>b</sup> Experimentos de osmocentrifugação.

<sup>c</sup> Experimentos de controle.

TABELA 25. Experimentos de osmocentrifugação e centrifugação normal (controle) de soluções 0,5% (m/m) de albumina e de soluções 0,5% (m/m) de poliacrilamida catiônica, a 4000 rpm, 4°C.

		Concentrações (%)				
		17,0	18,5	20,0	21,5	23,0
Solutos	r (cm)					
albumina <sup>a</sup>		0,165	0,240	0,350	0,550	1,20
albumina <sup>b</sup>		0,450	0,480	0,490	0,490	0,510
poliacrilamida <sup>a</sup>		0,195	0,267	0,234	0,468	0,731
poliacrilamida <sup>b</sup>		0,461	0,454	0,477	0,477	0,484

<sup>a</sup> Experimentos de osmocentrifugação.

<sup>b</sup> Experimentos de controle.

TABELA 26. Experimentos de osmocentrifugação de soluções 0,36% (m/m) de albumina e 0,45% (m/m) de poliacrilamida a 3000 rpm, 4°C, durante 7 h em valores de pH diferentes.

		Concentrações de Albumina (%)				
		17,0	18,5	20,0	21,5	23,0
pH	r (cm)					
2,3		0,170	0,225	0,290	0,375	0,425
4,6		0,145	0,215	0,275	0,340	0,475
6,4		0,070	0,150	0,205	0,325	0,635

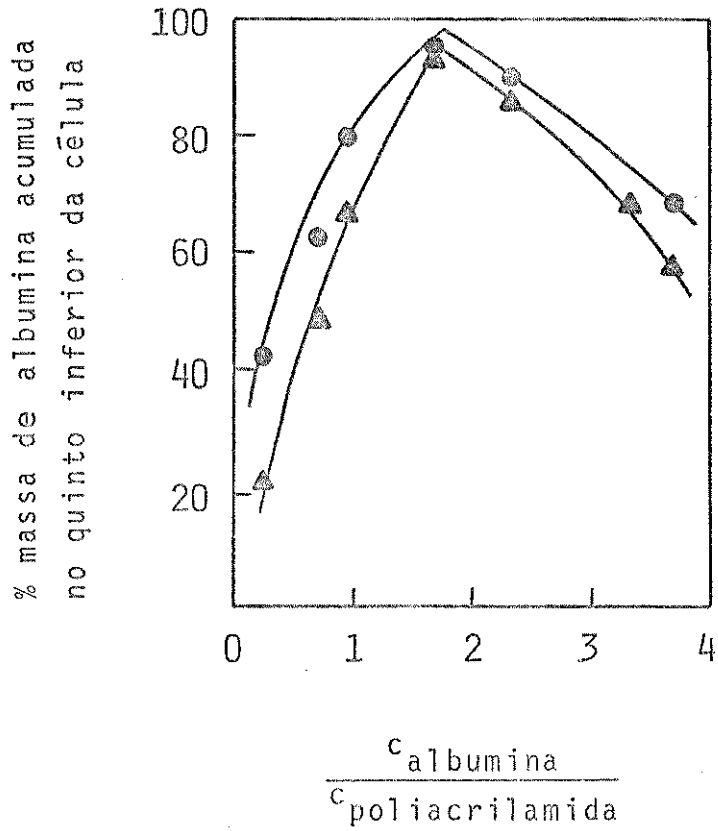


FIGURA 26. Percentagem de massa acumulada no quinto inferior da célula em função da relação concentração de albumina/concentração de poliacrilamida, em experimentos de (●) osmocentrifugação e (▲) centrifugação normal, a 4000 rpm, 4°C, durante 7 horas.

### 5.3. DISCUSSÃO

Observou-se a formação de complexos entre poliacrilamida catiônica e albumina bovina em pH 6,5. O produto desta complexação foi um coacervado gelatinoso, que pode ser recuperado no fundo da célula de centrifugação. Este aspecto gelatinoso é característico de complexos formados por polieletrólitos fracamente ácidos ou fracamente básicos. Embora se apresente na forma de um gel, quase a totalidade da albumina complexada pode ser concentrada no fundo de uma célula em experimentos de osmocentrifugação e até mesmo centrifugação normal, ajustando-se o pH e as proporções adequadas de poliacrilamida e proteína.

A eficiência do complexante é bastante influenciada pelo pH, conforme a Tabela 26. Em valores de pH abaixo do seu ponto isoelétrico ( $pI = 4,7$ ), a albumina apresenta carga positiva, inviabilizando a formação do complexo com o policâtion. O gradiente de concentração de albumina em presença de poliacrilamida, observado em experimentos de osmocentrifugação em pH 2,3, é comparável ao gradiente obtido com albumina livre (na ausência de poliacrilamida). Somente em pH acima do ponto isoelétrico (pH = 6,4, Tabela 26), a complexação passa a ser efetiva. Tal comportamento pode ser comparado com o observado por Morawetz e Hughes<sup>(146)</sup> para o sistema albumina/polivinilamina, onde o precipitante só se torna efetivo em pH acima de 7. A albumina bovina parece ter uma tendência fraca em complexar com polieletrólitos básicos, que se atribui<sup>(153)</sup> ao fato de esta proteína apresentar uma configuração em que grande parte dos grupos aniônicos estão localizados no interior da molécula.

Em experimentos realizados em pH constante (pH = 6,5, Tabela 24 e Figura 26), observou-se que há uma proporção crítica



de proteína e polication requerida como condição ótima de complexação. Quando esta proporção foi obedecida, praticamente 95% da albumina complexada pôde ser concentrada na quinta parte inferior de uma célula de centrifugação, tanto em experimentos de osmocentrifugação como de centrifugação normal. Aumentando-se a proporção da proteína ou do polication, menor quantidade de albumina foi complexada e recuperada no fundo da célula. Além disso, parte do complexo formado se manteve dispersa e, neste caso, os resultados obtidos em experimentos de osmocentrifugação foram sensivelmente melhores que aqueles obtidos por centrifugação normal. Provavelmente, quando as concentrações de proteína e polication estão fora da proporção crítica, formam-se complexos com excesso de carga positiva ou negativa, o que facilita a sua dispersão e, conseqüentemente, prejudica a recuperação da proteína no fundo da célula.

A proporção crítica entre albumina e poliacrilamida em pH 6,5 corresponde a  $c_{ALB}/c_{PAM} = 1,75$ , isto é, aproximadamente 3 moléculas de poliacrilamida para 2 de albumina. A partir da titulação da poliacrilamida catiônica com ácido poliacrílico, é possível estimar a existência de 480 cargas positivas por molécula de poliacrilamida. Este valor sugeriria um número de cargas por molécula de proteína excessivamente alto<sup>(154)</sup> se o complexo formado fosse estequiométrico. Provavelmente, porém, nem todas as cargas da poliacrilamida estão disponíveis para ligação com a albumina e grande quantidade de microíons é carregada pelo polication na formação do complexo. Além disso, a interação entre polieletrólitos envolve uma série de fatores mais ou menos complexos, de maneira que somente uma interpretação qualitativa dos resultados é aqui justificada. Por exemplo,

Kuramoto e colaboradores<sup>(147)</sup> sugerem que, embora as interações sejam principalmente iônicas, além do número de grupos iônicos, elas podem depender da geometria e estrutura dos componentes poliméricos.

Concluindo, a poliacrilamida catiônica pode ser uma alternativa para a separação de albumina por complexação em uma faixa de pH, onde polieletrólitos aniônicos como o ácido poliacrílico não são efetivos. Após a separação dos coacervados, por centrifugação, a proteína livre poderia ser recuperada, dissociando-se o complexo com a adição de cloreto de sódio e, então, retirando a poliacrilamida da solução por floculação ou por adição de resinas aniônicas.

## 6. ULTRAFILTRAÇÃO CENTRÍFUGA

### 6.1. INTRODUÇÃO

#### 6.1.1. Ultrafiltração

O uso de membranas como meio de concentração e/ou separação de solutos cresceu sensivelmente nos últimos vinte anos, deixando de ser uma simples curiosidade de laboratório para ter um papel essencial em processos industriais de larga escala<sup>(155)</sup>.

Entre os processos de separação e concentração por membrana, a ultrafiltração é responsável pelas aplicações mais importantes nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. O seu princípio básico é mostrado esquematicamente na Figura 27. A solução de alimentação é introduzida no módulo de ultrafiltração e, sob uma diferença de pressão hidrostática como força motriz, o solvente e as partículas pequenas atravessam a membrana como filtrado, enquanto que as partículas maiores são rejeitadas pela membrana e concentradas. Para isto, são utilizadas

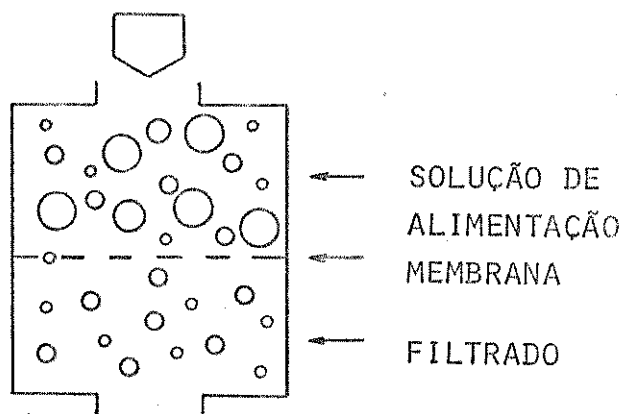


FIGURA 27. Princípio básico de operação da ultrafiltração<sup>(156)</sup>.

membranas (de acetato de celulose, policarbonato, poliamida, polissulfona, etc.) com poros de 1 a 100 nm.

A ultrafiltração é caracterizada por uma série de vantagens: consome relativamente pouca energia, é um processo atérmico e não há mudança de fase. Devido a estas vantagens, a ultrafiltração encontrou uma grande variedade de aplicações.

Uma das mais populares aplicações da ultrafiltração tem sido o tratamento de efluentes industriais para recuperação dos constituintes mais valiosos e reciclagem da água. Exemplos desta aplicação são a recuperação de tintas eletroforéticas da água de lavagem na pintura de peças metálicas (automóveis, etc.), separação de emulsões água-óleo em indústrias de processamento de metais e purificação e recuperação de efluentes de indústrias têxteis e de papel<sup>(156-158)</sup>. Outra aplicação interessante é a produção de água ultrapura para a indústria de semicondutores.

A indústria de alimentos é outra importante área de aplicação da ultrafiltração. É conveniente remover a água dos alimentos para favorecer a estabilidade microbiológica e reduzir a deterioração química e os custos de armazenamento e transporte. A etapa inicial da desidratação de vários alimentos pode ser realizada por ultrafiltração a custos bem inferiores do que por técnicas convencionais tais como evaporação e liofilização, sem perda de aroma e componentes voláteis. Na Tabela 27, são comparados os consumos de energia dos diversos processos de desidratação<sup>(159)</sup>, calculados para a concentração de 1000 kg/h de solução 10% até 35%.

A ultrafiltração tem duas aplicações principais na indústria de derivados do leite. O uso inicial foi no tratamento do soro do leite para reduzir problemas de poluição e ob

TABELA 27. Consumo de energia na concentração de 1000 kg/h de soluções de 10 a 35%.

Processo	Energia x 10 <sup>3</sup> (kWh)
Ultrafiltração (pressão 2,5 atm)	0,007
Osmose reversa (pressão 75 atm)	0,196
Liofilização	2,699
Pervaporação	7,769
Evaporação	
sem recuperação de aroma	7,769
com 90% de recuperação de aroma	8,790

ter um concentrado comercializável rico em proteínas<sup>(157)</sup>.

Mais recentemente, a ultrafiltração do leite vem sendo explorada para obter rendimentos maiores na produção de queijos mais uniformes. Concentrando a gordura e as proteínas do leite por ultrafiltração é possível obter um produto de composição idêntica à de queijos macios, tais como o "Camembert"<sup>(158,160,161)</sup>.

A esterilização e clarificação de bebidas, especialmente vinho, por ultrafiltração, também, é bastante vantajosa. O vinho obtido após a fermentação contém pequenas quantidades de proteínas, polissacarídeos e outras impurezas coloidais, que são geralmente removidas por floculação ou precipitação química. Este tratamento afeta a qualidade do vinho. A ultrafiltração, por outro lado, remove estas impurezas de maneira efetiva e, também, esteriliza o vinho<sup>(156)</sup>.

Na indústria farmacêutica, a ultrafiltração é um mé

todo importante para o isolamento, concentração e purificação substâncias biologicamente ativas tais como enzimas, vírus, ácidos nucléicos e proteínas<sup>(156,162)</sup>. Métodos tradicionais, tais como extração por solvente, diálise, precipitação e cromatografia, são normalmente menos eficientes e de maior custo, com perda considerável de produto. Usando a ultrafiltração, o isolamento e a concentração dos produtos podem ser feitos em uma única etapa, com economia significativa. Produtos farmacêuticos obtidos por extração a partir de plantas ou animais são frequentemente contaminados com impurezas macromoleculares. Em muitos casos, estas impurezas podem, também, ser removidas por ultrafiltração e um produto clarificado e de alta qualidade pode ser obtido.

#### 6.1.2. Polarização de Concentração

O maior problema da ultrafiltração é a chamada polarização de concentração, isto é, o acúmulo das macromoléculas retidas e decréscimo de concentração das moléculas menores (permeantes) na região adjacente à superfície da membrana, conforme a Figura 28. Esta polarização de concentração leva a uma queda da permeabilidade e uma alteração das características de rejeição de soluto da membrana.

As causas e consequências deste fenômeno vêm sendo explicadas com base nos modelos de pressão osmótica<sup>(164,165)</sup> e de camada de gel<sup>(166-168)</sup>. O primeiro modelo é mais adequado quando o material retido pela membrana tem baixo peso molecular. Devido ao aumento da concentração de soluto, há um aumento de pressão osmótica na superfície da membrana. Isto leva a uma diminuição do fluxo de solvente através da membrana para u

ma determinada pressão hidrostática. Além disso, a qualidade do filtrado pode ser afetada, pois, em uma membrana não ideal, o vazamento de soluto é diretamente proporcional à sua concentração.

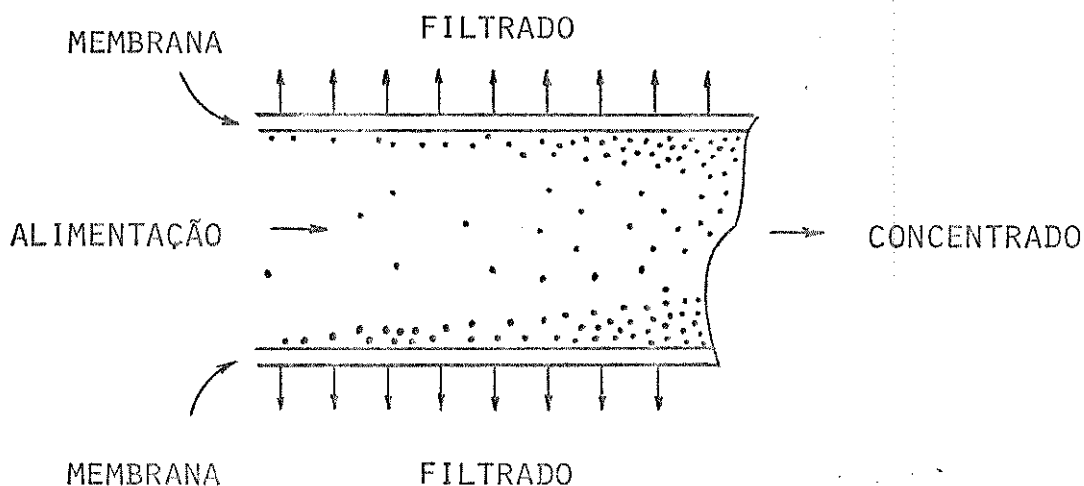


FIGURA 28. Desenvolvimento da camada de polarização<sup>(163)</sup>.

O modelo de camada de gel se aplica quando o material retido pela membrana tem peso molecular elevado e o aumento de pressão osmótica devido à polarização é desprezível. Neste caso, a concentração de material pode ser suficiente para permitir a formação de uma camada de gel na superfície da membrana. Esta camada atua também como uma membrana, afetando as características de filtração, reduzindo o fluxo e alterando a retenção de componentes de baixo peso molecular. O fluxo não é recuperado nem com aumento da pressão hidrostática, que provocaria um acúmulo adicional de soluto com espessamento da camada de gel.

Além da polarização de concentração, interações entre o soluto macromolecular e a membrana podem ser responsáveis por alterações nas características de fluxo e retenção.

Por exemplo, no tratamento de efluentes de óleos solúveis<sup>(168)</sup> por ultrafiltração, há adsorção de óleo na membrana, modificando sua molhabilidade e o diâmetro efetivo dos poros. Na ultrafiltração de proteínas<sup>(169,170)</sup> há adsorção substancial das proteínas na membrana. A quantidade adsorvida aumenta com o tempo, levando a uma diminuição do fluxo de permeante.

A polarização de concentração na ultrafiltração não pode ser completamente evitada, mas seu efeito pode ser controlado, provocando-se agitação da solução na superfície da membrana. Velocidades de cisalhamento altas na superfície da membrana são essenciais para minimizar os efeitos da polarização. Nos processos de ultrafiltração, os custos de bombeamento para recirculação de líquido representam uma fração apreciável do custo total<sup>(155)</sup>.

O controle da polarização de concentração influencia de modo apreciável o projeto dos módulos de ultrafiltração. Há quatro módulos básicos em uso atualmente<sup>(156)</sup>: i) módulo de membrana tubular, ii) módulo tipo filtro prensa, iii) módulo espiral e iv) módulo de fibra oca. Cada um deles se torna mais adequado em aplicações diferentes. Nenhum deles, porém, elimina o efeito da polarização e uma consideração importante é a facilidade com que as membranas podem ser limpas.

Para a limpeza de membranas utilizadas com soluções ricas em proteínas, principalmente na indústria de derivados do leite utilizam-se soluções de proteases<sup>(171)</sup>. Para a limpeza de membranas utilizadas na ultrafiltração de microemulsões água-óleo, uma solução micelar de um surfactante em álcool e água parece eficiente<sup>(168)</sup>. Em alguns casos, uma melhora substancial do desempenho da membrana pode ser obtida revertendo-se temporariamente o fluxo de solvente através dela<sup>(171)</sup>. Es-



ta "retrolavagem" pode se tornar mais eficiente com a aplicação de corrente elétrica através da membrana, provocando um fluxo eletrosmótico<sup>(172)</sup>. A corrente elétrica pode ser utilizada, também, de outra maneira para melhorar a eficiência da ultrafiltração. É o caso, por exemplo, da eletroultrafiltração<sup>(173)</sup>, onde um campo elétrico é utilizado para atrair proteínas em direção oposta à do fluxo de líquido através da membrana. A formação de uma camada de proteína na superfície da membrana é, então, minimizada, ajustando-se o campo elétrico e o pH adequado.

Andien<sup>(174)</sup> utilizou o campo inercial produzido em uma centrífuga para diminuir o efeito da polarização de concentração. Foi utilizada uma centrífuga contínua, onde um cartucho de fibra oca foi colocado paralelamente ao eixo de rotação. A pressão necessária para produzir o fluxo de líquido através da membrana foi fornecida por uma bomba e a solução foi alimentada continuamente. O campo inercial produzido (perpendicular à membrana) favoreceu o transporte convectivo de soluto da membrana para o meio da solução, reduzindo a polarização.

Neste capítulo da tese, são descritos experimentos de ultrafiltração, onde se utiliza um módulo adaptado a uma centrífuga de baixa velocidade de rotação, de maneira que o próprio peso da coluna de líquido impulsione o filtrado através da membrana, ao mesmo tempo em que o campo inercial contribui para sua despolarização.

Boerner<sup>(175)</sup> descreveu um pequeno dispositivo para filtração, que utilizava, também, o campo inercial produzido em uma centrífuga como força motriz para a passagem do líquido através da membrana. Tal dispositivo porém, tinha capacidade limitada e, uma vez que a membrana era posicionada paralelamente ao eixo de rotação (e perpendicular ao campo inercial), não e-

ra adequado a soluções viscosas, apresentando problemas de polarização de concentração.

## 6.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.2.1. Materiais e Equipamento

#### Materiais

Ovalbumina (obtida no laboratório, segundo preparação descrita na seção 3.2.5).

Dextrana T 500 Pharmacia Fine Chemicals, nº 17-0320-01, lot G1-21917.

Citocromo-C (de cavalo), Sigma nº C-2506, lot 91F-7050.

Albumina bovina, Sigma nº A-2153, lot 41F-0059.

Gamaglobulina, Pentex-Miles Laboratories, nº 82-042-3, lot 1012.

#### Equipamento

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

Espectrofotômetro UV-visível Micronal B 382.

Densímetro PAAR-DMA 60/602.

pH-metro Micronal B 274.

Compressor-aspirador Dia-Pump, FANEM modelo Ca, BF-600.

### 6.2.2. Módulo de Ultrafiltração

Nos experimentos de ultrafiltração descritos neste capítulo foram utilizados módulos análogos ao apresentado na Fi

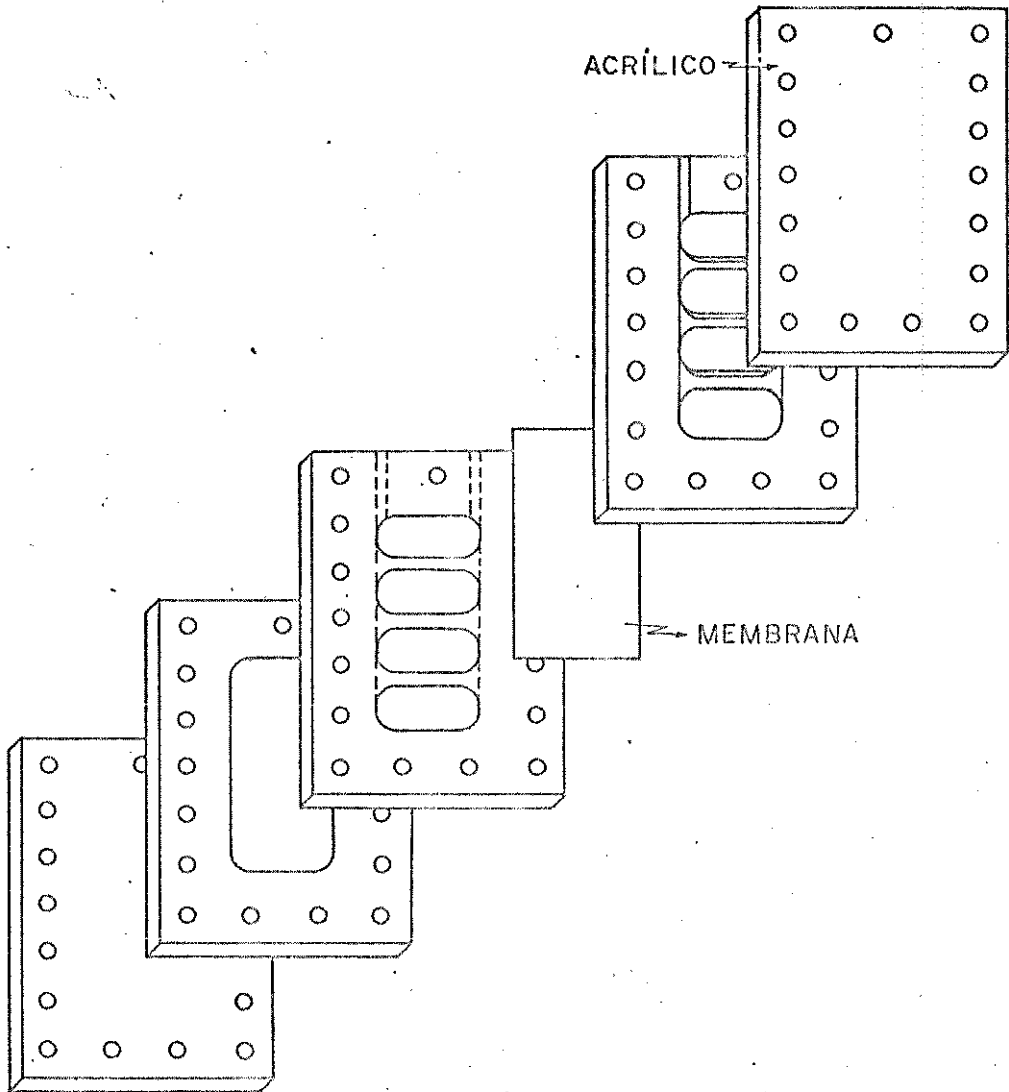


FIGURA 29. Módulo para ultrafiltração em centrífuga.

gura 29. Cada módulo era composto por placas rígidas de acrílico, justapostas e parafusadas, de maneira a formar dois compartimentos separados entre si por uma membrana semipermeável (área =  $23,8 \text{ cm}^2$ ). O compartimento destinado ao filtrado tinha capacidade duas vezes maior (32 ml) que a do compartimento do concentrado (16 ml). Entre as placas rígidas do dispositivo foram colocadas guarnições de PVC (poli(cloreto de vinila)), para facilitar a acomodação e evitar vazamentos.

Foram utilizadas, nestes experimentos, membranas de acetato de celulose, preparadas no laboratório, a partir da solução A (seção 3.2.2). As membranas foram ajustadas, no módulo, sobre um suporte de níquel perfurado por eletroerosão. Este suporte contém 1444 furos por  $\text{cm}^2$ , sendo o diâmetro dos furos igual a 0,02 mm.

### 6.2.3. Experimentos de Ultrafiltração

Nos experimentos de ultrafiltração, os módulos foram colocados nas caçapas da centrífuga, de maneira que a membrana se posicionasse perpendicularmente ao eixo de rotação (paralelamente ao campo inercial), durante a centrifugação.

Somente o compartimento menor foi preenchido, com a solução a ser concentrada. A pressão exercida pelo peso da coluna de solução, sob ação de um campo inercial, funcionou como força motriz para a passagem do solvente e das partículas pequenas através da membrana.

#### 6.2.3.1. Experimentos de Concentração por Ultrafiltração em Centrífuga

Ultrafiltraram-se soluções, aproximadamen

te, 0,1% (m/m) de ovalbumina em NaCl 0,1 M, a 4°C, utilizando-se os módulos descritos na seção 6.2.2, preenchendo-se o compartimento destinado à solução, de maneira a se obter uma coluna inicial de líquido de 7,0 cm. Os resultados realizados a diferentes velocidades de rotação, durante diferentes tempos de centrifugação, são apresentados na Tabela 28, onde  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}}$  é a razão entre as concentrações do concentrado e do estoque inicial e a retenção é

$$R = \frac{\text{volume do concentrado} \times \text{concentração do concentrado}}{\text{volume concentrado} \times \text{conc. concentrado} + \text{volume filtrado} \times \text{conc. filtrado}}$$

A distância entre o eixo de rotação e o meio da coluna de solução era 19,9 cm. A determinação da concentração das soluções foi feita por espectrofotometria a 280 nm.

TABELA 28. Filtração de 15,8 ml de solução 0,1% (m/m) de ovalbumina em NaCl 0,1 M, em centrífuga a 4°C.

Veloc. rotação (rpm)	Tempo (min)	Volume filtrado (ml)	Volume concentrado (ml)	$\frac{c_{\text{final}}}{c_{\text{inicial}}}$	Retenção (%)
1500	5	5,3	10,3	1,3	98
1500	10	7,7	8,0	1,8	98
1500	15	8,7	7,0	2,0	98
1500	25	9,8	6,0	2,4	99
2000	5	6,5	9,3	1,6	98
2000	10	8,7	6,7	2,1	99
2500	5	7,7	7,7	1,8	99
2500	10	9,4	6,0	2,3	99
2500	21	10,1	5,3	2,5	98

Realizaram-se, também com ovalbumina, experimentos análogos aos anteriores, retirando-se, porém, o filtrado de 7 em 7 minutos. Nestes experimentos, centrifugando-se a solução a 2500 rpm, após um tempo total de 21 minutos, recolheram-se 12,5 ml de filtrado e 2,7 ml de concentrado, obtendo-se  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 5,0$  com uma retenção de 99% da ovalbumina.

Experimentos análogos aos apresentados na Tabela 28 foram realizados com dextrana T 500 ( $\bar{M}_w = 5 \times 10^5$  daltons), determinando-se as concentrações através de medidas de densidade. Centrifugando-se 15,5 ml de uma solução 0,15% (m/m) de dextrana a 2500 rpm, 4°C, durante 5 minutos, obtiveram-se 5,0 ml de filtrado, 10,3 ml de concentrado,  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 1,4$  e 99% de retenção. Em experimento realizado durante 10 minutos, obtiveram-se 8,3 ml de filtrado, 7,2 ml de concentrado,  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 1,9$  e 99% de retenção.

Em experimentos realizados com solução de dextrana 0,15% (m/m) a 2500 rpm, onde se retirou o filtrado de 7 em 7 minutos, após um tempo total de 28 minutos, recolheram-se 12,5 ml de filtrado e 2,6 ml de concentrado, obtendo-se  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 5,1$  e 99% de retenção. Em experimentos deste tipo, realizados com soluções 0,9% (m/m) de dextrana, após um tempo total de 35 minutos, recolheram-se 10,7 ml de filtrado e 4,0 ml de concentrado, obtendo-se  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 3,5$  e 99% de retenção.

#### 6.2.3.2. Experimentos de Concentração por Ultrafiltração Convencional

Para comparação, filtraram-se 16 ml de so

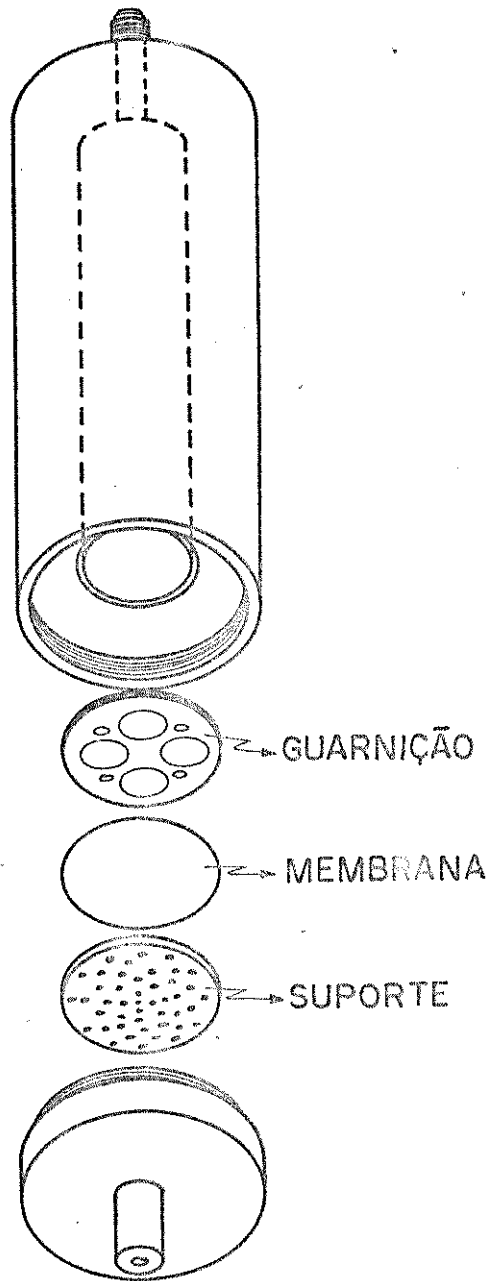


FIGURA 30. Célula de ultrafiltração convencional.

lução 0,1% (m/m) de ovalbumina em NaCl 0,1 M na célula de ultrafiltração convencional descrita na Figura 30, provida de membrana (área = 10,2 cm<sup>2</sup>) de acetato de celulose com as mesmas características daquelas utilizadas nos experimentos em centrífuga. Aplicou-se uma pressão de 2 atm, com auxílio de um compressor, durante 6,2 minutos, recolhendo-se, após este tempo, 5,0 ml de filtrado e 11,0 ml de concentrado, obtendo-se  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 1,3$ , com 99% de retenção. Aplicando pressão durante 13,4 minutos, recolheram-se 6,2 ml de filtrado e 9,8 ml de concentrado, obtendo-se  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 1,5$ , com 97% de retenção. Aplicando pressão sobre solução 0,08% (m/m) de ovalbumina durante 15 minutos, recolheram-se 8,0 ml de filtrado e 8,0 ml de concentrado, obtendo-se  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 1,7$ , com 91% de retenção.

Utilizando-se a célula de ultrafiltração descrita na Figura 30, filtraram-se 16 ml de solução de dextrana T 500. Aplicou-se uma pressão de 2 atm sobre a solução 0,9% (m/m) de dextrana, durante 150 minutos, recolhendo-se 4,2 ml de filtrado e 11,8 ml de concentrado e obtendo-se  $c_{\text{final}}/c_{\text{inicial}} = 1,3$  com 99% de retenção.

#### 6.2.3.3. Experimentos de Fracionamento por Ultrafiltração em Centrífuga

Foram realizados experimentos de ultrafiltração em centrífuga utilizando os módulos descritos na Figura 29, com soluções contendo uma mistura de ovalbumina e citocromo.

Inicialmente, foram realizados experimentos isolados com soluções 0,1% (m/m) de ovalbumina e com solu-



ções 0,1% (m/m) de citocromo c em NaCl 0,1 M, centrifugando-se a 2500 rpm, 4°C, durante 15 minutos. As concentrações foram determinadas por espectrofotometria a 280 nm (citocromo c + ovalbumina) e a 525 nm (citocromo c). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 29. Observou-se que a membrana utilizada apresentava boa retenção de ovalbumina ( $\bar{M}_w = 42600$  daltons), mas a retenção de citocromo c ( $\bar{M}_w = 15600$  daltons<sup>(71)</sup>) era ruim. Realizaram-se, então, experimentos de ultrafiltração com soluções contendo 0,1% (m/m) de ovalbumina e 0,1% (m/m) de citocromo c, para verificar a possibilidade de fracionamento.

Nestes experimentos, onde ovalbumina e citocromo c estão presentes na mesma solução, a determinação das concentrações de cada um foi possível, medindo-se a absorvância da solução a 280 e 525 nm, conhecendo-se, previamente, os valores das razões  $A_{280}/c_{\text{citocromo}} = 1,4268 (\%)^{-1}$ ,  $A_{525}/c_{\text{citocromo}} = 0,7280 (\%)^{-1}$ ,  $A_{280}/c_{\text{ovalbumina}} = 0,6601 (\%)^{-1}$  e  $A_{525}/c_{\text{ovalbumina}} = 0$  e utilizando-se as relações

$$c_{\text{citocromo}} = A_{525} \left( \frac{A_{525}}{c_{\text{citocromo}}} \right)^{-1} = 1,3736 A_{525}$$

$$c_{\text{ovalbumina}} = \left[ A_{280} - \left( \frac{A_{280}}{c_{\text{citocromo}}} \right) c_{\text{citocromo}} \right] \left( \frac{A_{280}}{c_{\text{ovalbumina}}} \right)^{-1}$$

$$= 1,5149 (A_{280} - 1,4268 c_{\text{citocromo}})$$

Na Tabela 29 são apresentados os valores médios de retenção de citocromo e ovalbumina obtidos em experimentos realizados em valores de pH diferentes.

Como nos experimentos realizados em pH 6,9 a separação foi mais eficiente, fez-se uma série de ultrafiltrações consecutivas de uma solução de concentração inicial,

TABELA 29. Ultrafiltração de soluções, aproximadamente, 0,1% (m/m) de ovalbumina e 0,1% (m/m) de citocromo c em NaCl 0,1 M, em centrífuga a 2500 rpm, 4°C, durante 15 minutos.

Volume filtrado (ml)	Volume conc. (ml)	Retenção (%)		% Citocromo na mistura <sup>b</sup>		pH
		Citocromo	Ovalbumina	Inicial	Final	
10,3	5,2	38,7	-	100	100	
10,0	5,6	58,6 <sup>a</sup>	-	100	100	
10,1	5,7	-	95,7	0	0	
10,2	5,5	66,4	93,9	48,3	43,6	6,9
8,8	6,9	89,6	89,8	45,4	46,2	12,2
9,3	6,1	100	100	38,1	38,2	2,1

<sup>a</sup> Ultrafiltração de solução de citocromo em módulo previamente utilizado com uma mistura de citocromo e ovalbumina.

<sup>b</sup>  $\frac{\text{massa de citocromo}}{\text{massa de citocromo} + \text{massa de proteína}} \times 100$ .

TABELA 30. Ultrafiltrações consecutivas de uma solução inicial, aproximadamente 0,1% (m/m) de citocromo c e 0,1% (m/m) de ovalbumina em NaCl 0,1 M, em centrífuga a 2500 rpm, 4°C, pH 6,9, durante 15 minutos.

	Volume filtrado (ml)	Volume conc. (ml)	Retenção (%)		% Citocromo na mistura <sup>a</sup>	
			Citocromo	Ovalbumina	Inicial	Final
1ª UF	10,0	5,4	68,5	95,0	53,8	43,1
2ª UF	10,0	5,5	67,3	95,0	43,1	34,8
3ª UF	10,0	5,5	62,0	91,4	34,8	26,1
4ª UF	9,9	5,3	58,6	90,6	26,1	19,9
5ª UF	10,2	5,7	62,7	87,6	19,9	12,8

$$a = \frac{\text{massa de citocromo}}{\text{massa de citocromo} + \text{massa de proteína}} \times 100$$

aproximadamente, 0,1% (m/m) de citocromo c e 0,1% (m/m) de ovalbumina em NaCl 0,1 M nas mesmas condições, com o seguinte procedimento. A cada ultrafiltração, desprezou-se o filtrado e o concentrafo foi diluído até o volume inicial com uma solução 0,1 M de NaCl. A solução foi, então, recolocada no módulo, cuja membrana havia sido lavada com água destilada, para que uma nova ultrafiltração fosse realizada. Partindo-se de uma mistura contendo 53,8% de citocromo c e 46,2% de ovalbumina, obteve-se uma mistura final com 12,8% de citocromo, após cinco ultrafiltrações consecutivas, perdendo-se um total de 34,5% da ovalbumina como filtrado. Os resultados são apresentados na Tabela 30.

#### 6.2.3.4. Gradientes de Concentração na Coluna de Solução Concentrada por Ultrafiltração em Centrífuga

Para avaliar o gradiente de concentração formado no compartimento do módulo de ultrafiltração destinado à solução concentrada, utilizaram-se as células descritas na Figura 5, preenchendo-se somente um dos seus lados até a altura de 7,5 cm. Realizaram-se experimentos de ultrafiltração em centrífuga a 1000 rpm, 4°C, durante 2 horas, com solução 0,6% (m/m) de gamaglobulina em NaCl 0,1 M, solução 0,5% (m/m) de albumina bovina em KCl 0,5 M e solução 0,6% (m/m) de dextrana T 500 em água. O tempo de experimento é suficiente para que o nível do filtrado, praticamente, se iguale ao nível da solução concentrada. Os resultados são apresentados na Tabela 31 e na Figura 31. As concentrações de gamaglobulina e albumina foram determinadas por espectrofotometria a 280 nm e as concentrações

de dextrana, por medidas de densidade. Os gradientes de concentração observados mostram um comportamento diferente do esperado, caso fosse atingido o equilíbrio de sedimentação. O formato das curvas, para solutos diferentes, é semelhante.

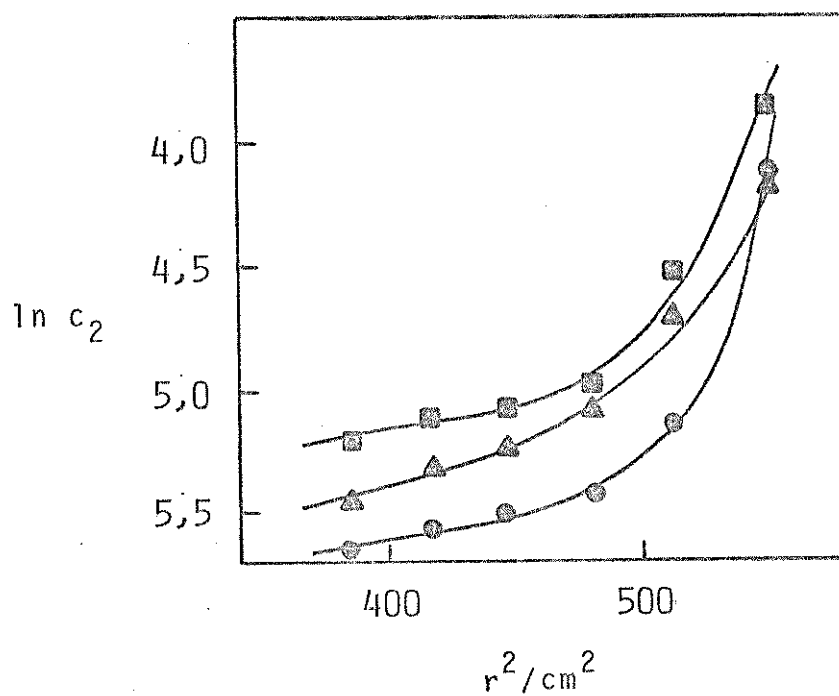


FIGURA 31. Gradientes de concentração de soluto, observados em experimentos de ultrafiltração em centrífuga a 1000 rpm, 4<sup>o</sup>C, durante 2 horas, com soluções de ( $\bullet$ ) albumina bovina, ( $\blacktriangle$ ) gamaglobulina e ( $\blacksquare$ ) dextrana T 500.

TABELA 31. Gradientes de concentração de soluto, observados em experimentos de ultrafiltração em centrífuga a 1000 rpm, 4°C, durante 2 horas.

r (cm)	Concentração x 10 <sup>3</sup> (g.ml <sup>-1</sup> )					
	19,6	20,4	21,1	21,9	22,6	23,4
Soluto						
albumina	3,48	3,83	4,03	4,45	5,86	16,1
gamaglobulina	4,20	4,83	5,27	6,18	9,11	15,4
dextrana	5,46	5,89	6,15	6,82	10,7	21,2

### 6.3. DISCUSSÃO

O módulo descrito na Figura 29 mostrou-se bastante eficiente para a ultrafiltração de solutos macromoleculares em centrífuga.

Uma comparação entre a ultrafiltração em centrífuga (seção 6.2.3.1) e a ultrafiltração convencional (seção 6.2.3.2) pode ser feita, com relação ao seu desempenho na concentração de solutos macromoleculares. No início dos experimentos em centrífuga, a solução em cada ponto do módulo está sujeita a uma pressão  $\Delta P$ , acima da pressão atmosférica, igual a

$$\Delta P = \rho \omega^2 (r^2 - r_T^2) \quad (100)$$

onde  $\rho$  é a densidade da solução,  $r$  é a distância entre o eixo de rotação e um ponto na coluna de solução e  $r_T = r$  no menisco. A solução está sujeita, inicialmente, a uma pressão média dada pela equação 101

$$\Delta \bar{P} = \frac{\int_{r_T}^{r_F} \rho \omega^2 (r^2 - r_T^2) dr}{\int_{r_T}^{r_F} dr} \quad (101)$$

Por exemplo, nos experimentos descritos na seção 6.2.3.1, as soluções centrifugadas a 1000 rpm estavam inicialmente sujeitas a uma pressão média de 1,42 atm, as centrifugadas a 1500 rpm estavam sujeitas a 3,19 atm, as centrifugadas a 2000 rpm, a 5,68 atm e as centrifugadas a 2500 rpm, a 8,87 atm. Esta pressão de cresce com o tempo, uma vez que o filtrado atravessa a membrana, diminuindo a altura do menisco (e aumentando  $r_T$ ).

Uma avaliação do efeito da polarização nestes experimentos pode ser feita da seguinte maneira. O fluxo de solvente através da membrana em função de  $r$ , no início do experimento é igual a

$$J_V = Lp\Delta P = Lp [\rho\omega^2 (r^2 - r_T^2)] \quad (102)$$

onde  $J_V$  é o fluxo volumétrico de solvente através da membrana a uma distância  $r$  do eixo de rotação e  $Lp$  está diretamente relacionado com a permeabilidade da membrana. Depois de iniciado o experimento, quando parte do solvente já atravessou a membrana,  $J_V$  continua sendo expresso pela equação 102 para valores de  $r$  entre o menisco da solução concentrada ( $r = r_T$ ) e o menisco do solvente filtrado ( $r = r_{MF}$ ), mas para valores de  $r$  entre  $r_{MF}$  e o fundo do módulo ( $r = r_F$ ),  $J_V$  passa a ser expresso pela equação 103

$$J_V = Lp [\rho\omega^2 (r^2 - r_T^2) - \rho_1\omega^2 (r^2 - r_{MF}^2) - \Delta\Pi] \quad (103)$$

onde  $\rho_1$  é a densidade do solvente (filtrado) e  $\Delta\Pi$  é a pressão osmótica da solução concentrada. Em soluções diluídas de macromoléculas de alto peso molecular,  $\Delta\Pi \approx 0$ .

O volume de filtrado atravessando a membrana por unidade de tempo é dado pela equação 104,

$$\phi_V = \int_A J_V dA \quad (104)$$

mas  $dA = \ell dr$ , onde  $\ell$  é a largura da membrana utilizada. Portanto,

$$\phi_V = \ell \int_{r_T}^{r_F} J_V dr \quad (105)$$

$$\text{ou } \phi_V = \ell L_p \left[ \int_{r_T}^{r_{MF}} [\rho \omega^2 (r^2 - r_T^2)] dr + \int_{r_{MF}}^{r_F} [\rho \omega^2 (r^2 - r_T^2) - \rho_1 \omega^2 (r^2 - r_{MF}^2)] dr \right]. \quad (106)$$

Resolvendo-se as integrais, obtém-se

$$\phi_V = \ell L_p \left[ \rho \frac{\omega^2}{3} (r_F^3 - r_T^3) - \rho \omega^2 r_T^2 (r_F - r_T) - \rho_1 \omega^2 r_F \left( \frac{r_F^2}{3} - r_{MF}^2 \right) - \frac{2}{3} \rho_1 \omega^2 r_{MF}^3 \right] \quad (107)$$

$$\phi_V = \ell L_p Y. \quad (108)$$

A partir dos resultados de experimentos realizados com soluções 0,1% de ovalbumina a 1500 rpm, apresentados na Tabela 28 e conhecendo-se os valores de  $r_T$  e  $r_{MF}$  em diversos tempos, é possível obter os valores de  $\phi_V$  e  $Y$  médios apresentados na Tabela 32.

Construindo um gráfico de  $\bar{\phi}_V$  em função de  $\bar{Y}$  é possível avaliar  $L_p$ , conhecendo  $\ell = 3,5$  cm. Conforme a Figura 32, obtém-se uma linha reta, mostrando que  $L_p = 3,2 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>.s.g<sup>-1</sup> e praticamente não variou com  $\bar{Y}$ . Como  $\bar{Y}$  foi obtido a partir de valores de  $\bar{r}_T$  e  $\bar{r}_{MF}$  em tempos diferentes,  $L_p$  também não variou com o tempo. Este fato é uma evidência de que a polarização de concentração nestes experimentos foi desprezível, pois  $L_p$  é diretamente proporcional à permeabilidade total da membrana, en-



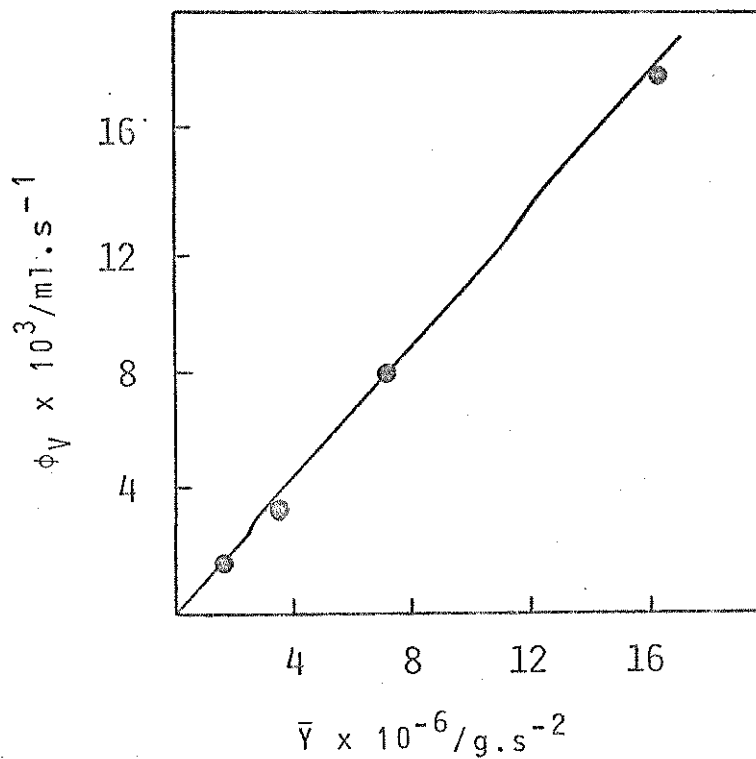


FIGURA 32. Gráfico de  $\bar{\phi}_V$  em função de  $\bar{Y}$ , em experimentos de ultrafiltração em centrífuga, com soluções 0,1% de ovalbumina em NaCl 0,1 M.

tendendo-se, aqui, por membrana o conjunto formado pela própria membrana polimérica e uma possível camada de polarização na sua superfície.

TABELA 32. Valores de  $\bar{\phi}_V$  em função de  $\bar{Y}$  em experimentos de ultrafiltração em centrífuga com soluções 0,1% (m/m) de ovalbumina a 1500 rpm.

Tempo (min)	$\bar{\phi}_V$ (ml.s <sup>-1</sup> )	$r_T$ (cm)	$\bar{r}_T$ (cm)	$r_{MF}$ (cm)	$\bar{r}_{MF}$ (cm)	$\bar{Y} \times 10^{-6}$ (g.s <sup>-2</sup> )
0 → 5	0,0177	16,4 → 18,8	17,6	23,4 → 22,1	22,8	16,2
5 → 10	0,0080	18,8 → 19,9	19,3	22,1 → 21,5	21,9	7,1
10 → 15	0,0033	19,9 → 20,4	20,1	21,5 → 21,4	21,4	3,5
15 → 25	0,0018	20,4 → 20,8	20,6	21,4 → 21,0	21,2	1,6

Nos experimentos de ultrafiltração em centrífuga, a polarização de concentração é minimizada por convecção. Durante a ultrafiltração, a migração de solvente através da membrana deixa uma camada de solução mais concentrada na sua superfície. Forma-se, assim, um gradiente de densidade horizontal. Mas, sob ação do campo inercial, a camada mais densa é deslocada para o fundo do módulo, conforme a Figura 33, enquanto a porção de solução mais rica em solvente (menos densa) é levada para cima. Há, então, renovação do líquido na superfície da membrana, sem a necessidade de agitação adicional.

Nos experimentos de ultrafiltração convencional com ovalbumina pode-se calcular

$$L_p = \frac{\phi_V}{A\Delta P} \quad (109)$$

Utilizou-se uma membrana, cujo valor inicial de  $L_p$  foi  $6,5 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{g}^{-1}$ . Mas este valor caiu nos primeiros 13 minutos para  $3,7 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{g}^{-1}$  evidenciando um considerável efeito

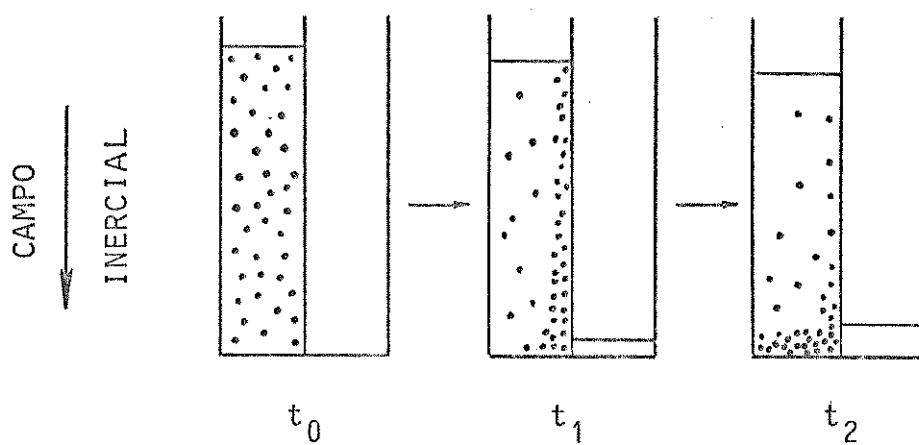


FIGURA 33. Despolarização da superfície da membrana, por convecção, durante a ultrafiltração em centrifuga.

de polarização, além da compactação normal da membrana.

A concentração de soluções macromoleculares por ultrafiltração em centrífuga tornou-se significativamente vantajosa nos experimentos com soluções 0.9% de dextrana T 500. Neste caso, os efeitos da polarização nos experimentos de ultrafiltração convencional foram evidentes, sendo a operação extremamente lenta. Muitas vezes, procura-se minimizar o efeito da polarização de concentração, promovendo uma agitação constante e vigorosa. Esta agitação, porém, pode causar danos sérios a moléculas como proteínas, por cisalhamento.

A ultrafiltração em centrífuga foi, também, aplicada com sucesso ao fracionamento de proteínas, conforme os resultados apresentados na Tabela 30. Partindo de uma mistura contendo 53,8% de citocromo c ( $\bar{M}_w = 15600$  daltons) e 46,2% de ovalbumina ( $\bar{M}_w = 42600$  daltons) foi possível chegar a uma mistura final com 12,8% de citocromo c e 87,2% de ovalbumina, com perda de 34,5% da ovalbumina no filtrado, em 5 etapas de ultrafiltração de 15 minutos. É possível avaliar que a ovalbumina praticamente pura poderia ser obtida com mais 2 etapas de ultrafiltração. Este resultado é bastante significativo, uma vez que o fracionamento de espécies diferindo em peso molecular por um fator menor que 10 é raramente alcançado pela ultrafiltração convencional<sup>(155)</sup>.

Uma das razões do mau desempenho da ultrafiltração convencional no fracionamento de proteínas é a larga distribuição de tamanho de poros. Mas outro fator de grande influência é a variação das características de retenção de um determinado soluto na presença de outro soluto macromolecular. Por exemplo, Baker e Strathmann<sup>(176)</sup> verificaram, que a membrana XM-100 da Amicon Corporation tinha uma retenção de 0 a 10% para albumina

e de 60 a 80% para gamaglobulina quando cada soluto era testado individualmente, mas os resultados com misturas de albumina e gamaglobulina foram bem diferentes. Uma solução 1% (m/m) de albumina a 3,3 atm atravessou a membrana livremente, mas na presença de 0,25% (m/m) de gamaglobulina, a albumina foi completamente retida. O efeito pode ser explicado como sendo devido à camada de gel formada na superfície da membrana. A gamaglobulina rejeitada acumulou na superfície da membrana, impedindo a passagem da albumina. Uma maneira de eliminar este problema foi proposta por Radovich e colaboradores<sup>(173)</sup>, utilizando a eletroultrafiltração, isto é, aplicando um campo elétrico em uma solução de pH 4,7 (ponto isoelétrico da albumina), de maneira que a gamaglobulina (com carga positiva) fosse atraída para longe da superfície da membrana, minimizando a polarização. Os resultados, porém, não foram muito significativos.

Outro exemplo da variação da retenção de um soluto quando presente em uma mistura é apresentado por Siezen<sup>(177,178)</sup>, que demonstrou que a ultrafiltração é inadequada para a detecção de associações entre proteínas. Estudando interações entre proteínas do cristalino por ultrafiltração, Siezen verificou que o aumento da retenção da  $\gamma$ -cristalina ( $M = 20000$  daltons) e da  $\beta$ -cristalina ( $M = 50000 - 200000$  daltons) na presença da  $\alpha$ -cristalina ( $M = 800000$  daltons), que havia sido erroneamente atribuído à formação de complexos entre elas, se devia em grande parte à polarização da membrana. A  $\alpha$ -cristalina, cuja retenção era de 95%, acumulava na membrana, formando uma barreira adicional para a penetração das proteínas menores. Além disso, a  $\alpha$ -cristalina ocupava espaços de onde a  $\gamma$ -cristalina era efetivamente excluída.

Nos experimentos de fracionamento de citocromo c e ovalbu

mina por ultrafiltração em centrífuga, apresentados na Tabela 29, observou-se, também, um aumento de retenção de citocromo c de 38,7% para 66,4% na presença de ovalbumina (solução 0,1 % (m/m)) porém, em um grau bem inferior ao observado por Baker e Strathmann<sup>(176)</sup>. Na ultrafiltração convencional<sup>(155)</sup>, a presença de 0,1% (m/m) de gamaglobulina eleva a retenção de albumina de 0 a 80%.

Parte do aumento de retenção observado nos experimentos de ultrafiltração em centrífuga pode ser devido à adsorção de ovalbumina na membrana, ocupando espaços dentro dos poros, que anteriormente eram disponíveis para a passagem do citocromo c. Esta hipótese pode ser reforçada pelo fato de que uma membrana, anteriormente, usada com uma solução de citocromo c e ovalbumina e, depois, lavada com água destilada e utilizada na ultrafiltração de uma solução contendo apenas citocromo c, apresentou uma retenção de 58,6% (Tabela 29), valor superior àquele verificado para membrana sem uso anterior. O desempenho da ultrafiltração pode ser bastante alterado pela adsorção de proteínas na membrana<sup>(170)</sup>.

Também na Tabela 29, é possível observar que a retenção de citocromo aumenta em valores de pH muito elevados (pH = 12,2) ou muito baixos (pH = 2,1) inviabilizando o fracionamento. Este efeito pode ser devido a variações de conformação e de carga da proteína. Em valores extremos de pH, as proteínas se encontram altamente carregadas, adquirindo uma conformação mais expandida; em valores de pH mais próximos do ponto isoelétrico (ponto isoelétrico do citocromo c = 9,7<sup>(71)</sup>), a proteína se encontra mais compacta e sua retenção é menor.

Nos experimentos de ultrafiltração em centrífuga formam-se gradientes de concentração verticais no compartimento da so

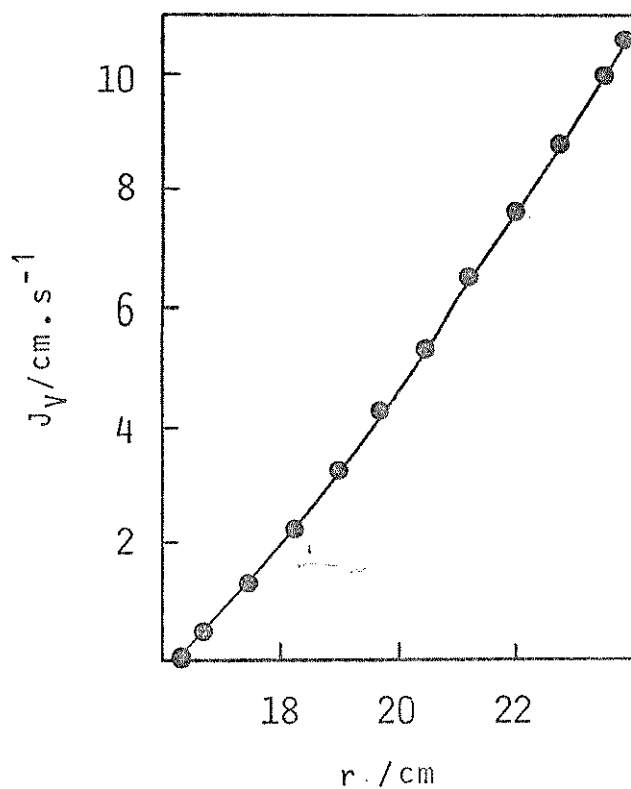


FIGURA 34. Variação do fluxo de solvente  $J_V$  através da membrana em função da distância  $r$  entre o eixo de rotação e um ponto na coluna de solução, no início (tempo zero) de experimentos de ultrafiltração em centrífuga com soluções 0,1% (m/m) de ovalbumina em NaCl 0,1 M, a 1000 rpm.

TABELA 33. Métodos para a determinação de peso molecular de macromoléculas.

Método	Tipo de resultado	Faixa de peso molecular	Tempo requerido	Custo do aparelho	Necessidade de calibração	Limitações usuais
Crioscopia e osmometria de pressão de vapor	$\bar{M}_n$	$< 10^4$	curto	médio	sim	insensibilidade a alto PM e disponibilidade de solvente
Osmometria	$\bar{M}_n$	$2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$	curto-18h	variável	não	membrana
Espalhamento de luz	$\bar{M}_w$	$10^4 - 10^5$	1 h	elevado	não	solvente altamente purificado
Viscosimetria	$\bar{M}_v$	$10^3 - 10^7$	curto	baixo	sim	
Velocidade de sedimentação	$\bar{M}_z$	$10^4 - 10^7$	2 h	muito elevado	não	
Equilíbrio de sedimentação	$\bar{M}_w, \bar{M}_z, \bar{M}_n$	$> 500$	dias-semanas	muito elevado	não	tempo
Cromatografia em gel		$< 10^7$	curto	elevado	sim	solvente, gel, padrões
Osmocentrifugação	$\bar{M}_w, \bar{M}_z$	$> 2 \times 10^4$	dias	baixo	não	membrana



culas e a formação dos gradientes sejam feitas em uma única etapa e dispensando o uso de uma ultracentrífuga.

Com respeito à recuperação de complexos de albumina com poliacrilamida, a osmocentrifugação parece não ter grande superioridade sobre a centrifugação normal, quando se formam agregados relativamente grandes. Este efeito confirma a previsão de que a osmocentrifugação se torna cada vez mais competitiva, em relação à centrifugação normal, quanto menor o tamanho das partículas presentes em solução, conforme a Figura 3c (capítulo 2). Por outro lado, os resultados descritos no capítulo 5 mostram que a complexação de albumina com poliacrilamida catiônica, seguida de centrifugação normal, poderia ser utilizada para o fracionamento de proteínas, em condições de pH onde outros agentes complexantes mais largamente usados (ácido poliacrílico, etc.) são ineficazes.

Por sua vez, a ultrafiltração em centrífuga (capítulo 6) se mostrou bastante eficiente para a concentração e fracionamento de solutos macromoleculares. Em escala de laboratório, o método é particularmente atrativo pela simplicidade do equipamento. Em escalas maiores algumas alterações, tais como a possibilidade de alimentação contínua, tornariam o método mais interessante.

Nos dois métodos descritos neste trabalho - osmocentrifugação e ultrafiltração em centrífuga - a membrana e a sua posição têm um papel primordial, permitindo que ocorram fluxos de massa em sentidos convenientes e que haja um acoplamento adequado entre fluxos que ocorrem em sentidos diferentes. Na osmocentrifugação, a membrana possibilita a ocorrência de fluxos horizontais de solvente, fazendo com que o soluto seja carregado mais rapidamente para o fundo da célula, isto é, acelerando

8. REFERÊNCIAS

- (1) KATCHALSKY, A. & CURRAN, Peter F.. Nonequilibrium thermodynamics in biophysics. Boston, Harvard University Press, 1975. 248 p.
- (2) ONSAGER, L.. Reciprocal relations in irreversible processes. Physical Reviews, 37: 405-426, 1931.
- (3) CLUSIUS, K. & DICKEL, G.. Das Trennrohr. I. Grundlagen eines neues Verfahrens zur Gasentmischung und Isotopentrennung durch Thermodiffusion. II. Trennung der Chlorisotope. Zeitschrift für Physikalische Chemie, B 44: 397-450, 451-473, 1939.
- (4) LIPPMANN, G.. Endosmose entre deux liquides de même composition chimique et de températures différentes. Comptes Rendus, 145: 104-105, 1907.
- (5) AUBERT, M. Thermo-osmose. Annales de Chimie et de Physique, 26: 145-208, 1912.
- (6) DENBIGH, K.G. & RAUMANN, G. Thermoösmosis of gases through a membrane. Nature, 165: 199-200, 1950.
- (7) CAN, Charles W. & SOLLNER, Karl. New experiments on thermoosmosis. Journal of Electrochemical Society, 109: 616-622, 1962.
- (8) TASAKA, Masayasu et alii.. Thermoosmosis of various electrolyte solutions through anion-exchange membranes. Journal of Membrane Science, 17: 149-160, 1984.
- (9) DANIEL, M.S. & KEDEM, O.. Thermoosmosis in semipermeable membranes. Journal of Physical Chemistry, 79: 336-342, 1975.
- (10) GOLDSTEIN, W.E. & VERHOFF, F.H.. An investigation of anomalous osmosis and thermoosmosis. AIChE Journal, 21 (2): 229-238, 1975.
- (11) CHLUBECK, N. et alii.. A study on thermal driven membrane processes in water purification. Proceeding of International Membrane Technology Conference. Australia, 1983, p. 199.

- (12) BELUCCI, Francesco et alii. Thermodialysis of non-ideal aqueous solutions. Journal of Chemical Society - Faraday Transactions II, 75: 247-260, 1979.
- (13) GAETA, Francesco & MITA, Damiano G.. Thermal diffusion across porous partitions. The process of thermodialysis. Journal of Physical Chemistry, 83: 2276-2285, 1979.
- (14) BELLUCCI, F. et alii.. Separation by thermodialysis of acetic acid aqueous solutions. Canadian Journal of Chemical Engineering, 56: 698-704, 1978.
- (15) WORTHY, Ward. Electrical separation tested in phosphate settling ponds. Chemical Engineering News, 62(5): 23-24, 1984.
- (16) PAULI, W.. Constitution of gold sols. Naturwissenschaften, 20: 551-557, 1932.
- (17) BLANK, F. & VALKÓ, E.. The stratification phenomenon in electro dialysis as an electrophoretic occurrence. Biochemische Zeitschrift, 195: 220-227, 1928.
- (18) OVERBEEK, J.T.G.. Phenomenology of lyophobic systems. In: KRUYT, H.R. (editor). Colloid Science. Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1952, p. 58-89, V. 1.
- (19) SHAW, Duncan J.. Introdução à química dos colóides e de superfícies. São Paulo, Editora Edgard Blücher, 1975.
- (20) VOYUTSKY, S.. Colloid Chemistry. Moscow, Mir Publishers, 1978.
- (21) RIBEIRO, J. Costa. The thermodielectric phenomenon. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 17(2), resumos II-IV, V-VII, 1945.
- (22) EVANS, Gareth J.. A new Crystal-growing technique: the reciprocal of the thermodielectric effect. Journal of Chemical Society - Faraday Transactions I, 80: 2343-2348, 1984.
- (23) YACAMAN, M. Jose et alii.. Sublimation of ionic crystals in the presence of an electrical field. Applied Physical Letters, 34: 727-728, 1979.

- (24) KURIEN, K.V. & ITTYACHEN, M.A.. Effect of electric field on the growth of barium molybdate crystals in silica gel. Journal of Material Science, 15: 1724-1729, 1980.
- (25) KIRKWOOD, John G. & BROWN, Raymond A.. Diffusion-convection. A new method for the fractionation of macromolecules. Journal of American Chemical Society, 74: 1056-1058, 1952.
- (26) LANG, Hans. Zur Auswertung osmotischer Messungen: Vorgänge an senkrecht angebrachten Membranen. Kolloid Zeitschrift 128: 7-15, 1952.
- (27) LANG, Hans. Der osmotische Druck im Schwerfeld. Zeitschrift für Naturforschung, 7A: 299-300, 1952.
- (28) PORTER, Alfred W. & HEDGES, J.J.. The law of distribution of particles in colloidal suspensions, with special reference to Perrin's investigations. Transactions of the Faraday Society, 18: 91-101, 1922.
- (29) GALEMBECK, F. et alii. Rapid sedimentation under gravity. Basic theory and experimental demonstrations. Journal of Physical Chemistry, 84: 112-115, 1980.
- (30) GALEMBECK, F. et alii. Transport in osmotically coupled systems. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 51: 173, 1979.
- (31) GALEMBECK, F. et alii. Approach to sedimentation equilibrium. A comparison between osmotically coupled and uncoupled systems, based on free-energy dissipation rates. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 53: 25-28, 1981.
- (32) GALEMBECK, F. et alii.. Osmotic coupling: the key to faster mass transport experiments. In: MITTAL & FENDLER (editores). Solution behaviour of surfactants. Plenum Publishing Co., 1982, V. 2, p. 1465-1475.
- (33) PINHEIRO, Eduardo Antonio. Sedimentação acelerada por acoplamento osmótico: modelo teórico e verificação experimental. Tese de Mestrado. São Paulo, 1982. 71 p.
- (34) ROBILOTTA, Paulo Roberto. Osmodimentação: fabricação de membranas e verificação experimental. São Paulo, 1983. 111 p.

- (35) PIRES, Alfredo Tiburcio Nunes. Osmossedimentação: aplicação analítica e preparativa a soluções macromoleculares. Tese de Doutorado. Campinas, 1984. 128 p.
- (36) PIRES, Alfredo T. Nunes, NUNES, Suzana Pereira & GALEMBECK, Fernando. Osmosedimentation: approach to sedimentation equilibrium under gravity. Journal of Colloid and Interface Science, 98: 489-493, 1984.
- (37) JOEKES, Ines. Equilíbrio de osmosedimentação sob gravidade: polidispersões aquosas de prata. Tese de Doutorado. Campinas, 1983. 154 p.
- (38) JOEKES, Ines & GALEMBECK, Fernando. Osmosedimentation equilibrium under gravity: average molecular weights and second virial coefficient of aqueous silver sols. Journal of Colloid and Interface Science, 00:000-000, 1985.
- (39) NUNES, Suzana Pereira. Membranas assimétricas de acetato de celulose para osmosedimentação e ultrafiltração. Tese de Mestrado. Campinas, 1983. 119 p.
- (40) NUNES, Suzana Pereira & GALEMBECK, Fernando. Preparation and characterization of cellulose acetate membranes for osmosedimentation. Journal of Polymer Science - Polymer Letters Edition, 21, 49-55, 1983.
- (41) NUNES, Suzana Pereira, GALEMBECK, Fernando & BARELLI, Nilso. Cellulose acetate membranes for osmosedimentation: performance and morphological dependence on preparation conditions. Submetido à publicação.
- (42) NUNES, Suzana Pereira, PIRES, Alfredo T. Nunes & GALEMBECK, Fernando. Concentration of dextran and gammaglobulin by osmocentrifugation. Chemica Scripta, 23(5): 233-239, 1984.
- (43) TRATHNIGG, B. & JORDE, C.. Densimetric detection in gel permeation chromatography. VI. An integration densimetric detector. Journal of Chromatography, 241: 147-151, 1982.
- (44) PRICE, C.A.. Centrifugation in density gradients. New York, Academic Press, 1982. Cap. 3 e 5, p. 32-78, 114-149.

- (45) BIKALES, Norbert M. (editor). Characterization of polymers - Encyclopedia Reprints. New York, Wiley-Interscience, 1971. p. 53-90.
- (46) EDSALL, J.T.. The size, shape and hydration of protein molecules. In: NEURATH, Hans & HILL, Robert L. (editores). The Proteins. New York, Academic Press, 1ª ed., 1954. V. 2, parte A, cap. 7, p. 549-726.
- (47) MORAWETZ, Herbert. Macromolecules in solution. New York, Wiley-Interscience, 2ª ed., 1975. p. 20.
- (48) LANSING, William D. & KRAEMER, O.. Molecular weight analysis of mixtures by sedimentation equilibrium in the Svedberg ultracentrifuge. Journal of American Chemical Society, 57: 1369-77, 1935.
- (49) Mc CORMICK, Herbert W. et alii. The effect of molecular-weight distribution on the physical properties of polystyrene. Journal of Polymer Science, 39: 87-100, 1959.
- (50) FLORY, Paul J.. Principles of polymer chemistry. Ithaca, Cornell University Press, 11ª ed., 1981. cap. 7, p. 266-315.
- (51) DAVIDSON, Norman. Statistical mechanics. New York, Mc Graw-Hill Book Company, 1962. p. 315-349.
- (52) HIEMENZ, Paul C.. Principles of colloid and surface chemistry. New York, Marcel Dekker, 1977. p. 125-159.
- (53) FUJITA, Hiroshi. Mathematical theory of sedimentation analysis. New York, Academic Press, 1962.
- (54) HILL, Terrell, L.. Theory of solutions. II. Osmotic pressure virial expansion and light scattering in two component solutions. Journal of Chemical Physics, 30: 93-97, 1959.
- (55) ZIMM, Bruno H.. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. Journal of Chemical Physics, 16: 1093-1099, 1948.
- (56) KWEI, T.K.. Macromolecules in solution. In: BOVEY, F.A. & WINSLOW, F.H. (editores). Macromolecules, an introduction to polymer science. New York, Academic Press, 1979.

cap. 4, p. 273-337.

- (57) ACKERS, G.K. Molecular sieve methods of analysis. In: NEURATH, Hans & HILL, Robert L. (editores). The Proteins. New York, Academic Press, 3<sup>a</sup> ed., 1975. V. 1, cap. 1, p. 1-94.
- (58) KOK, Chong Meng & RUDIN, Alfred. An engineering approach to polymer solution properties. Journal of Macromolecular Science - Macromolecular Chemical Physics, C24(1): 49-68, 1984.
- (59) MULLER, Guy & YONNET, Catherine. Aqueous gel permeation chromatography of high molecular weight water soluble polymers. Makromolekulare Chemie - Rapid Communications, 5: 197-201, 1984.
- (60) ZWEIG, Gunter & WHITAKER, John R.. Paper chromatography and electrophoresis. New York, Academic Press, 1967. V. 1.
- (61) WEBER, Klaus & OSBORN, Mary. Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. In: NEURATH, Hans & HILL, Robert L. (editores). The Proteins. New York, Academic Press, 3<sup>a</sup> ed., 1975. V. 1, cap. 3, p. 180-225.
- (62) SHAPIRO, Arnold L. et alii. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS - polyacrylamide gels. Biochemical and Biophysical Research Communications, 28: 815-820, 1967.
- (63) PERRIN, Jean. L'agitation moléculaire et le mouvement brownien. Comptes Rendus, 146: 967-970, 1908.
- (64) PERRIN, Jean. Mouvement brownien et réalité moléculaire. Annales de Chimie et de Physique, 18: 5-114, 1909.
- (65) SVEDBERG, T. & ESTRUP, K.. The determination of the distribution of the size of the particles in a dispersed system. Z. Chem. Ind. Kolloid, 9: 259-261, 1911. APUD: Chemical Abstract, 6: 1391, 1912.
- (66) DUMANSKI, A. et alii.. Methode zur Bertimmung der Grösse kolloider Teilchen. Kolloid-Zeitschrift, 12: 6-11, 1913.

- (67) SVEDBERG, The. Sedimentacion molecular en la ultracentrifuge. Endeavour, 6: 89-95, 1947.
- (68) SVEDBERG, The & RINDE, H.. The ultracentrifuge, a new instrument for the determination of size and distribution of size of particle in amicroscopic colloids. Journal of American Chemical Society, 46: 2677-2693, 1924.
- (69) PEDERSEN, Kai O.. The Development of Svedberg's ultracentrifuge. Biophysical Chemistry, 5: 3-18, 1976.
- (70) SVEDBERG, The & NICHOLS, J.B.. Determination of size and distribution of size of particle by centrifugal methods. Journal of American Chemical Society, 45: 2910-2917, 1923.
- (71) SVEDBERG, The & PEDERSEN, Kai O.. The ultracentrifuge. Oxford, Clarendon Press, 1940. 479 p.
- (72) ARCHIBALD, W.J.. A demonstration of some new methods of determining molecular weights from the data of the ultracentrifuge. Journal of Physical and Colloidal Chemistry, 51: 1204-14, 1947.
- (73) SCHACHMANN, Howard K.. Ultracentrifugation in biochemistry. New York, Academic Press, 1959. 272 p.
- (74) VAN HOLDE, K.E.. Sedimentation analysis of proteins. In: NEURATH, H. & HILL, R.L. (editores). The Proteins. New York, Academic Press, 3ª ed., 1975. V. 1, cap. 4, p. 225-291.
- (75) WILLIAMS, J.W. et alii.. The theory of sedimentation analysis. Chemical Reviews, 58: 715-806, 1958.
- (76) HOWLETT, Geoffrey J. et alii.. Studies on <sup>125</sup>I-labeled proteins in rat plasma using an air-driven ultracentrifuge: protein-protein interactions and nonideality. Archives of Biochemistry and Biophysics, 215: 309-318, 1982.
- (77) PATEL, Ramesh C. & AMINABHAVI, Tejrāj. Ultracentrifuge as a versatile tool to study preferential interaction on polymers in mixed solvents. Journal of Macromolecular Science - Rev. Macromol. Chem. Phys., C22:



203-224, 1982-83.

- (78) SCHOLTE, T.G.. Molecular weights and molecular weight distribution of polymers by equilibrium ultracentrifugation. Part I. Average molecular weights. Part II. Molecular weight distribution. Journal of Polymer Science - Part A2, 6: 91-127, 1968.
- (79) OSTERHOUDT, H.W. & WILLIAMS, J.W.. Sedimentation equilibria in polydisperse pseudo-ideal solutions and at low centrifugal fields. Journal of Physical Chemistry, 69: 1050-1056, 1965.
- (80) FUJITA, Hiroshi. New Approximation to the sedimentation equilibrium equation for polydisperse nonideal solutions. Journal of Physical Chemistry, 73: 1759-1761, 1969.
- (81) MASON, Max & WEAVER, Warren. Settling of small particles in a fluid. Physical Reviews, 23: 412-426, 1924.
- (82) WEAVER, Warren. Duration of the transient state in the settling of small particles. Physical Reviews, 27: 499-503, 1926.
- (83) VAN HOLDE, K.E. & BALDWIN, R.L. Rapid attainment of sedimentation equilibrium. Journal of Physical Chemistry, 62: 734-741, 1958.
- (84) EIKENBERRY, Eric F.. Sedimentation theory: a more rigorous approach. In: PRICE, C.A.. Centrifugation in density gradients. New York, Academic Press, 1982. p. 79-113.
- (85) LOEB, George I. & SCHERAGA, Harold A.. Hydrodynamic and thermodynamic properties of bovine serum albumin at low pH. Journal of Physical Chemistry, 60: 1633-1644, 1956.
- (86) BOWEN, T.J.. Modern trends in ultracentrifugation. Laboratory Practice, 15: 292-298, 1966.
- (87) RICHARDS, E. Glen & SCHACHMANN, Howard K.. Ultracentrifuge studies with rayleigh interference optics. I. General Applications. Journal of Physical Chemistry, 63: 1578-1591, 1959.

- (88) HEXNER, P.E. et alii. Achievement of sedimentation equilibrium. Proceedings of the National Academy of Science of USA, 47: 1848-1852, 1961.
- (89) PASTERNAK, R.A. et alii. A fast method for reaching equilibrium in the ultracentrifuge. Nature, 179: 92-94, 1957.
- (90) RICHARDS, E.G. et alii. Ultracentrifuge studies with rayleigh interference optics. II. Low speed sedimentation equilibrium of homogeneous systems. Biochemistry, 7: 1054-1076, 1968.
- (91) YPHANTIS, David A.. Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. Biochemistry, 3: 297-317, 1964.
- (92) TELLER, David C.. Characterization of proteins by sedimentation equilibrium in the analytical ultracentrifuge. Methods in Enzymology, 27: 346-441, 1973.
- (93) KEKWICK, Ralph Ambrose & CANNAN, Robert Keith. The hydrogen ion dissociation curve of the crystalline albumin of the hen's egg. Biochemical Journal, 30: 227-234, 1936.
- (94) Gel filtration theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Rahms i Lund, 1979.
- (95) PUTNAM, Frank W.. Structure and function of the plasma proteins. In: NEURATH, Hans & HILL, Robert L. (editores). The Proteins. New York, Academic Press, 2ª ed., 1965. V. 3, p. 153-267.
- (96) FOSTER, Joseph F.. Plasma albumin. In: PUTNAM, Frank W.. The Plasma Proteins. Academic Press, 1ª ed., 1960. p. 179-239.
- (97) DAYHOFF, Margaret O. et alii.. The partial specific volumes in aqueous solution of three proteins. Journal of American Chemical Society, 74: 2515-2517, 1952.
- (98) DRAPER, N.R. & SMITH, H.. Applied Regression Analysis. New York, John Wiley & Sons, 2ª ed., 1981.
- (99) FAHEY, John L.. Heterogeneity of gammaglobulins. Advances in Immunology, 2: 41-109, 1962.

- (100) CAMMACK, K.A.. Molecular weight of rabbit gammaglobulin. Nature, 194: 745-747, 1962.
- (101) PETERS Jr., Theodore. Serum albumin. In: PUTNAM, Frank W. The Plasma Proteins. Academic Press, 2<sup>d</sup> ed., 1975. V. 1, p. 133-181.
- (102) CHARLWOOD, P.A.. New possibilities in the design of ultracentrifugal equilibrium experiments. Biochemical and Biophysical Research Communications, 19: 243-248, 1965.
- (103) SQUIRE, P.G. et alii.. The hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer. Biochemistry, 7: 4261-4271, 1968.
- (104) GUTFREUND, H.. The analysis of osmotic pressure measurements of solutions of bovine serum proteins. Transactions of the Faraday Society, 50: 628-635, 1954.
- (105) LAMM, Ole & POLSON, Alfred. The determination of diffusion constants of proteins by a refractometric method. Biochemical Journal, 30: 528-541, 1936.
- (106) SVEDBERG, The & SJÖGREN, B.. The molecular weights of serum albumin and of serum globulin. Journal of American Chemical Society, 50: 3318-3332, 1928.
- (107) ATTRI, Arun K.. & MINTON, Allen P.. An automated method for determination of the molecular weight of macromolecules via sedimentation equilibrium in a preparative ultracentrifuge. Analytical Biochemistry, 133: 142-152, 1983.
- (108) PHELPS, Robert A. & PUTNAM, Frank W.. Chemical composition and molecular parameters of purified plasma proteins. In: PUTNAM, Frank W.. The Plasma Proteins. Academic Press, 1<sup>st</sup> ed., 1960. Cap. 5, p. 143-175.
- (109) GOTTSCHALK, Alfred & GRAHAM, E.R. Bruce. The basic structure of glycoproteins. In: NEURATH, Hans & HILL, Robert L. (editores). The Proteins. New York, Academic Press, 2<sup>d</sup> ed., 1965. V. 4, p. 113-151.

- (110) LONGSWORTH, L.G. et alii.. An electrophoretic study of the proteins of egg white. Journal of American Chemical Society, 62: 2580-2590, 1940.
- (111) FEVOLD, Harry L.. Egg proteins. Advances in Protein Chemistry, 6: 187-252, 1951.
- (112) KEGELES, Gerson. A new optical method for observing sedimentation equilibrium. Journal of American Chemical Society, 69: 1302-1305, 1947.
- (113) GUTFREUND, H.. Molecular weight of egg albumin. Nature, 153: 406, 1944.
- (114) BULL, Henry B.. Osmotic pressure of egg albumin solutions. Journal of Biological Chemistry, 137: 143-151, 1941.
- (115) HAWER, M. et alii.. Molecular weight of lactoglobulin, ovalbumin, lysozyme and serum albumin by light scattering. Journal of American Chemical Society, 73: 2786-2790, 1951.
- (116) BULL, H.B.. Monolayers of egg albumin on concentrated salt solutions. Journal of American Chemical Society, 67: 4-8, 1945.
- (117) WARNER, Robert C.. Egg proteins. In: NEURATH, Hans & HILL, Robert L. (editores). The Proteins. New York, Academic Press, 1ª ed., 1954. V. 2, p. 435-485.
- (118) PORTER, R.R. Gammaglobulin and antibodies. In: PUTNAM, Frank W.. The Plasma Proteins. Academic Press, 1ª ed., 1960. Cap. 7, p. 241-277.
- (119) CHARLWOOD, P.A.. Alternative procedures for equilibrium determinations in the ultracentrifuge. Journal of Polymer Science - Part C, 16: 1717-1727, 1967.
- (120) PHELPS, Robert A. & CANN, John R.. On the modification of gammaglobulin by acid. Biochemica et Biophysica Acta, 23, 149-154, 1957.
- (121) NUNES, Suzana Pereira & GALEMBECK, Fernando. Osmocentrifugation: a new tool for polymer molecular weight determination. Submetido à publicação.

- (122) MEDDINGS, P. Development of the techniques of preparative ultracentrifugation over twenty-five years with particular reference to density gradient centrifugation. Laboratory Practice 26: 323-325, 1977.
- (123) BRAKKE, Myron K.. Density gradient centrifugation: A new separation technique. Journal of American Chemical Society 73: 1847-1878, 1951.
- (124) EICHENBERGER, W.. Trennung biologischer Partikel durch Zentrifugation im Dichtegradienten. Chimia 23: 85-124, 1969.
- (125) MESELSON, Matthew et alii. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 43: 581-588, 1957.
- (126) BELL, Linda R. & HSU, H.W.. Transport phenomena in zonal centrifuge rotors. IX. Gradient properties of Ficoll and methyl cellulose. Separation Science, 9: 401-410, 1974.
- (127) PERTOFT, Håkan & LAURENT, Toward C. Sedimentation of cells in colloidal silica (Percoll). In: PRETLOW II, Thomas G. & PRETLOW, Theresa P. (editores). Cell separation - Methods and selected applications. New York, Academic Press, 1982. V. 1, cap. 6, p. 115-152.
- (128) MESELSON, Matthew & STAHL, Franklin W.. The replication of deoxyribonucleic acid in Escherichia coli. Proceedings of National Academy of Science U.S.A., 44: 671-682, 1958.
- (129) Products for cell science. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Västra Aros Tryckeri, 1980.
- (130) Ficoll-Paque for "in vitro" isolation of lymphocytes. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Tryckkontakt, 1983.
- (131) LAURENT, Toward C. et alii. Physical chemical characterization of Percoll. Journal of Colloid and Interface Science 76: 124-141, 1980.

- (132) PERTOFT, Håkan et alii. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). Analytical Biochemistry, 88: 271-284, 1978.
- (133) Percoll methodology and applications. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Västra Aros Tryckeri, 1980.
- (134) NUNES, Suzana Pereira e GALEMBECK, Fernando. Percoll and Ficoll self-generated density gradients by low-speed osmocentrifugation. Analytical Biochemistry, 00: 000-000, 1985.
- (135) BUNGENBERG DE JONG, H.G. Wissenschaftliche und technische Sammelreferate. II. Koacervation. Kolloid-Zeitschrift. 80: 221-231, 1937.
- (136) BUNGENBERG DE JONG, H.G. Complex colloid systems. In: KRUYT, H.R. (editor). Colloid Science. Amsterdam, Elsevier Publishing Company, 1949. V. 2, p. 335-432.
- (137) DEUEL, H. et alii.. Flockungsreaktionen zwischen polymeren Säuren und polymeren Basen. Helvetica Chimica Acta 36: 1671-1680, 1953.
- (138) FLUOSS, Raymond M. & SADEK, Hussein. Mutual interaction of polyelectrolytes. Science, 110: 552-554, 1949.
- (139) MICHAELS, Alan S.. Polyelectrolyte Complexes. Industrial and Engineering Chemistry, 57: 32-40, 1965.
- (140) COHN, E.J. et alii.. A system for the separation of the components of human blood: quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma. Journal of American Chemical Society, 72: 465-474, 1950.
- (141) HUBERT, P. et alii. Affinity partitioning of steroid-binding proteins. The use of polyethylene oxide bound estradiol for purifying  $\Delta_{5+4}$  3-oxosteroid isomerase. FEBS Letters, 65: 169-174, 1976.
- (142) HUBERT, Patrick & DELLACHERIE, Edith. Use of water-soluble biospecific polymers for the purification of proteins. Journal of Chromatography, 184: 325-333, 1980.

- (143) ADAMSKI-MEDDA, Dominique et alii.. Biospecific ultrafiltration: a promising purification technique for proteins? Journal of Membrane Science, 9: 337-342, 1981.
- (144) STERNBERG, M. & HERSHBERGER, D.. Separation of proteins with polyacrylic acids. Biochimica et Biophysica Acta, 342: 195-206, 1974.
- (145) STERNBERG, M. et alii. Cheese whey proteins isolated with polyacrylic acid. Journal of Dairy Science, 59: 1042-1050, 1976.
- (146) MORAWETZ, Herbert & HUGHES Jr., Walter L.. The interaction of proteins with synthetic polyelectrolytes. I. Complexing of bovine serum albumin. Journal of Physical Chemistry, 56: 64-69, 1952.
- (147) KURAMOTO, Noriyuki et alii. Complex formation between bovine serum albumin and poly(acrylic acid) as studied by viscometry, circular dichroism, and fluorescence spectroscopy. Makromolekulare Chemie, 185: 1419-1427, 1984.
- (148) KAPOOR, J.N. et alii. Flocculation characteristics of synthetic polyelectrolytes - polyacrylamide. Fertilizer Technology, 16: 229-235, 1979.
- (149) BOLTO, B.A. Some new water purification processes based on polymers. Progress in Polymer Science, 9: 89-114, 1983.
- (150) BRANDRUP, J. & IMMERGUT, E.H. (editores). Polymer handbook. New York, John Wiley & Sons, 2<sup>a</sup> ed., 1975.
- (151) DAVIDSON, Robert L. (editor). Handbook of water-soluble gums and resins. McGraw-Hill Book Company, 1980.
- (152) PLUMMER, David T. An introduction to practical biochemistry. London, McGraw-Hill, 1971. p. 156.
- (153) HAUROWITZ, Felix. Ionenstruktur, Löslichkeit und Flockung der Proteine. Kolloid Zeitschrift, 74: 208-218, 1936.

- (154) TANFORD, Charles. Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXIII. Hydrogen ion equilibria in native and modified human serum albumins. Journal of American Chemical Society, 72: 441-451, 1950.
- (155) LONSDALE, H.K.. The growth of membrane technology. Journal of Membrane Science, 10: 81-181, 1982.
- (156) STRATHMANN, H. Membrane separation process. Journal of Membrane Science, 9: 121-189, 1981.
- (157) COOPER, Antony R. A history of ultrafiltration. In: FURTER, William F. (editor). A Century of Chemical Engineering. Plenum Publishing Corporation, 1982. p. 449-457.
- (158) COOPER, Anthony R.. Ultrafiltration. Chemistry in Britain, 20: 814-818, 1984.
- (159) THIJSEN, H.A.C. Fundamentals of concentration process. In. SPICER, Arnold (editor). Advances in Preconcentration and Dehydration of Foods. London Applied Science Publishers Ltd, 1974. p. 13-44.
- (160) MAUBOIS, J.L. & MOCQUOT, G. Application of membrane ultrafiltration to preparation of various types of cheese. J. Dairy Sci., 58: 1001-1007, 1975.
- (161) MULLER, L.L. Recent applications of membranes in the dairy industry. Proceedings of the International Membrane Technology Conference. Australia, 1983. p. 178-180.
- (162) PORTER, M.C. & NELSON, L. Ultrafiltration in the chemical, food processing, pharmaceutical and medical industries. In: LI, Norman N., editor. Recent Developments in Separation Science. Cleveland. Chemical Rubber, 1975. V. 2, p. 227-267.
- (163) MICHAELS, A.S.. New separation technique for the CPI. Chemical Engineering Progress, 64: 31-43, 1968.
- (164) VILKER, V.L. et alii. Concentration polarization in ultrafiltration. II. Theoretical and experimental study of albumin ultrafiltered in an unstirred cell. AIChE Journal, 27: 637-645, 1981.



- (165) WIJMANS, J.G. et alii. Flux limitation in ultrafiltration: osmotic pressure model and gel layer model. Journal of Membrane Science, 20: 115-124, 1984.
- (166) TRETTIN, Daniel R. & DOSHI, Mahendra R.. Ultrafiltration in an unstirred batch cell. Industrial Engineering Chemistry - Fundamentals, 19: 189-194, 1980.
- (167) REIHANIAN, H. et alii. Mechanism of polarization and fouling of ultrafiltration membranes by proteins. Journal of Membrane Science, 16: 237-258, 1983.
- (168) LEE, Soobok et alii. Concentration polarization, membrane fouling and cleaning in ultrafiltration of soluble oil. Journal of Membrane Science, 19: 23-28, 1984.
- (169) FANE, A.G. et alii. The effect of pH and ionic environment on the ultrafiltration of protein solutions with retentive membranes. Journal of Membrane Science, 16: 195-210, 1983.
- (170) FANE, A.G. et alii. Ultrafiltration of protein solutions through partially permeable membranes - the effect of adsorption and solution environment. Journal of Membrane Science, 16: 211-224, 1983.
- (171) DEJMEK, PETR & HALLSTRÖM, BENGT. Studies of membrane deposits in ultrafiltration. In: SPICER, Arnold (editor). Advances in Preconcentration and Dehydration of Foods. London, Applied Science Publishers LTD, 1974. p. 303-308.
- (172) SPIEGLER, K.S. & MACLEISH, J.H.. Molecular (osmotic and electro-osmotic) backwash of cellulose acetate hyperfiltration membranes. Journal of Membrane Science, 8: 193-219, 1981.
- (173) RADOVICH, J.M. et alii. Coupling electrophoresis with ultrafiltration for improved processing of plasma proteins. Separation Science and Technology, 15: 1491-1498, 1980.
- (174) ANDEEN, Gerry B.. Effects of acceleration on reverse osmosis desalination. Desalination, 36: 265-275, 1981.

- (175) BOERNER, Fred. A centrifugal micro filter for filtering small amounts. American Journal of Clinical Pathology, 12(9): 68-69, 1942.
- (176) BAKER, R.W. & STRATHMANN, H. Ultrafiltration of macromolecular solutions with high-flux membranes. Journal of Applied Polymer Science, 14: 1197-1214, 1970.
- (177) SEIZEN, Roland J. Ultrafiltration studies of lens proteins interaction - a re-evaluation. Exp. Eye Res. 38: 207-210, 1983.
- (178) SEIZEN, Roland J.. Interaction of lens proteins: ultrafiltration is unsuitable to detect self - or mixed-association. Biophysical Chemistry 19: 49-55, 1984.
- (179) Privilégio de invenção.  
BRASIL. PI nº 8404660. Dispositivo de ultrafiltração em centrífuga. 13 set. 1984.