

**ANDERSON FUZER MESQUITA**

**ESTUDO TERMODINÂMICO DA PARTIÇÃO DE LACTOPROTEÍNAS EM  
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR COPOLÍMEROS  
BLOCOS**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agroquímica, para  
obtenção do título de “Magister  
Scientiae”.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS, BRASIL  
2004**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M582e  
2004

Mesquita, Anderson Fuzer, 1973-

Estudo termodinâmico da partição de lactoproteínas em sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros blocos / Anderson Fuzer Mesquita. – Viçosa : UFV, 2004. xiii, 65f. : il. ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de

Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Físico-química. 2. Separação (Tecnologia). 3. Partição de fases. 4. Diagramas de fase. 5. Espectrofotometria. 6. Copolímeros blocos. 7. Soro de leite - Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 541.3

**ANDERSON FUZER MESQUITA**

**ESTUDO TERMODINÂMICO DA PARTIÇÃO DE LACTOPROTEÍNAS EM  
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR COPOLÍMEROS  
BLOCOS**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agroquímica, para  
obtenção do título de “Magister  
Scientiae”.**

APROVADA:12 de fevereiro de 2004.

---

Prof<sup>a</sup> Jane Sélia dos Reis Coimbra  
(Conselheira)

---

Prof. Luis Antônio Minim  
(Conselheiro)

---

Prof. Efraim Lázaro Reis  
(Conselheiro)

---

Prof. João Pedro Braga

---

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva  
(Orientador)

Dedico esta tese aos meus pais, Adalton e Mirtes, que iniciaram esta caminhada comigo e a Merice que aceitou o desafio de continuar caminhando ao meu lado na missão de ser um eterno aprendiz.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que em sua misericórdia não olha as vezes que caímos, mas sim, às vezes que nos levantamos. Obrigado Senhor, pelo dom da vida.

Aos meus pais, pela dedicação e apoio nas horas difíceis.

A minha amada Merice, pelo apoio na decisão de parar e recomeçar uma nova vida. Sem você nada disso teria acontecido. Muito obrigado. Te amo.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva, pelo sim a minha orientação. Pela compreensão e apoio nos momentos de adaptação. Por ser muito mais que um professor, ser amigo e irmão em todos os momentos. Amigo a gente guarda, mesmo que haja falhas, pois quando Deus constrói os laços o amor jamais se apaga. Conte sempre comigo.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida aos filhos que a casa retornam.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro.

Aos professores Luís Antônio Minim e Jane Sélia dos Reis Coimbra, pelo acolhimento, confiança e total liberdade no decorrer deste trabalho. Que não seja o fim, mas o início de muitos trabalhos.

Aos professores César e Efraim, pela disponibilidade e paciência ao sanar as dúvidas, que insistentemente, nos acompanham.

Ao professor João Pedro, pela participação na banca e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos amigos Edwin, Rafael, Isabelle demais colegas do LPS pela boa convivência, disposição em ajudar e pelo encorajamento nas horas difíceis.

A Kelany, pela acolhida e ajuda em todos os momentos. Pela grande paciência ao escutar minhas dúvidas e oportunidade de iniciarmos uma amizade permanente.

Aos amigos do laboratório de Físico-Química: Roney, Fernanda, Marcus, Kelly e Jorge, obrigado por tudo.

Aos amigos Pedro e Renata, do laboratório de Orgânica, pelas conversas descontraídas a respeito da pós-graduação.

Ao Luciano, pelas agradáveis conversas a respeito do meio acadêmico, pela amizade e pelos conselhos que foram de grande valor.

A Carol pelo companheirismo nos momentos difíceis, pelas dicas nas análises e por compartilhar cada momento desta caminhada. Você foi um presente fraternal que Deus me ofereceu. Obrigado por ter aceitado ser amiga em todos os momentos.

Ao Marcelo, pela confiança nos momentos difíceis, pelo coração sempre disposto a ajudar e pelas dicas preciosas no tocante a vida. É sempre bom conhecer pessoas novas, principalmente quando nos dão a chance de sermos autênticos.

Ao Alfredo, pela alegria que me concedeu ao estreitar, através da convivência, nossos laços de família. É sempre bom olharmos para frente e percebermos que os “nossos” continuam a caminhar ao nosso lado. Ame e faça o que quiseres, mas não esqueça, ame ...

Ao Marcelo Carvalho pela amizade e ajuda em relação aos problemas computacionais. É sempre bom ter pessoas como você ao lado, pois desta forma conseguimos olhar o mundo de uma maneira diferente e nova a cada instante.

À Marisa, ao Márcio e a Onezina, funcionários do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração e paciência.

A todos que direta ou indiretamente participaram desta tese e não me lembrei de mencionar. Obrigado.

# ÍNDICE

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| <b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>   | <b>VII</b>                           |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>   | <b>VIII</b>                          |
| <b>RESUMO .....</b>  | <b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b> |
| <b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL .....</b>  | <b>1</b>                             |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>23</b>                            |
| <b>CAPÍTULO 2: PHASE EQUILIBRIUM OF BLOCK COPOLYMER +<br/>POTASSIUM PHOSPHATE + WATER SYSTEMS AT VARIOUS<br/>TEMPERATURE .....</b> | <b>28</b>                            |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>28</b>                            |
| <b>2.1 INTRODUCTION.....</b>   | <b>29</b>                            |
| <b>2.2 MATERIALS AND METHODS .....</b>   | <b>30</b>                            |
| 2.2.1.Chemicals .....  | 30                                   |
| 2.2.2.Aqueous Two-Phase Systems .....  | 30                                   |
| 2.2.3.Phase Diagram Determination .....  | 31                                   |
| <b>2.3 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>  | <b>32</b>                            |
| <b>2.4 CONCLUSION.....</b>   | <b>42</b>                            |
| <b>2.5 LITERATURE CITED .....</b>  | <b>44</b>                            |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>CAPÍTULO 3: BOVINE SERUM ALBUMIN AND <math>\beta</math>-LACTOGLOBULIN PARTITIONING IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM CONTAINING SELF-AGREGATION BLOCK COPOLYMER .....</b> | <b>48</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>48</b> |
| <b>3.1 INTRODUCTION.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>3.2 EXPERIMENTAL .....</b>  | <b>53</b> |
| 3.2.1 Materials.....   | 53        |
| 3.2.2 Protein Partitioning.....  | 53        |
| <b>3.3 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>  | <b>54</b> |
| 3.3.1 Partition coefficients of $\beta$ -Lg and BSA in L35-phosphate and F68-phosphate systems .....   | 54        |
| 3.3.2 Effect of tie-line length and hydrophobic/hydrophilic balance on partitioning.....   | 59        |
| 3.3.3 The effect of temperature on partitioning .....  | 61        |
| <b>3.4 CONCLUSION .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>3.5 REFERENCES .....</b>  | <b>66</b> |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| 1 Exemplos de SABs sendo empregados na partição de proteínas .....   | 4  |
| 2 Phase compositions (%mass) for L35 + phosphate potassium/potassium hydroxide + water systems, at pH 12, and various temperatures ..        | 32 |
| 3 Phase compositions (%mass) for block copolymer + potassium phosphate + water systems, at pH 7, and different temperatures .....            | 33 |
| 4 STL values for L35 – phosphate systems at 10 °C, 25 °C, and 40 °C.....   | 36 |
| 5 STL values for F68 – phosphate systems at 10 °C, 25 °C, and 40 °C .....  | 38 |
| 6 Phase compositions, TLL, and partition coefficients (K) in L35, F68, salt and water for both proteins in three different temperatures..... | 56 |

## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| 1 Diagramas de fase expresso em coordenadas triangulares. ....   | 5  |
| 2 Diagramas de fase expresso em coordenadas retangulares. ....   | 6  |
| 3 Diagramas de fases de um sistema formado pelo polímero 1, polímero 2 e água .....  | 7  |
| 4 Representação de diferentes estruturas de copolímeros: (a) copolímero randômico, (b) copolímero dibloco, (c) copolímero tribloco, (d) copolímero “graft”, (e) copolímero estrela. .... | 18 |
| 5 Temperature effect on the phase diagrams for the L35 + potassium phosphate + water system at pH 7, (●) 10 °C and (▲) 40 °C.....  | 34 |
| 6 Temperature effect on the phase diagrams for the L35 + potassium phosphate + water system at pH 7 (■), 25 °C and (▲) 40 °C.....  | 35 |
| 7 Phase diagrams for both copolymer molar mass, L35 1900 (▲) F68 8400 (■), at 10 °C and pH 7. ....   | 39 |
| 8 Phase diagrams for both copolymer molar mass, L35 1900 (▲) F68 8400 (■), at 25 °C and pH 7. ....   | 39 |
| 9 Phase diagrams for both copolymer molar mass, L35 1900 (▲) F68 8400 (■), at 40 °C and pH 7. ....   | 40 |
| 10 Phase diagrams for copolymer + salt + water at 10 °C, pH 7 and pH 12. ...   | 41 |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 11 | Phase diagrams for copolymer + salt + water at 25 °C, pH 7 and pH 12. ...   | 41 |
| 12 | Phase diagrams for copolymer + salt + water at 40 °C, pH 7 and pH 12. ...   | 41 |
| 13 | Concentrations of $\beta$ -Lg in the two phases of aqueous L35-phosphate and F68-phosphate, pH 7, under varied total concentration of the protein in the system. ....         | 55 |
| 14 | Effect of TLL on the partition coefficients in L35-phosphate and F68-phosphate systems, pH 7, 25 °C. $\beta$ -Lg (■) L35, BSA (●) L35, $\beta$ -Lg (▲) F68, BSA (∇) F68 ..... | 60 |
| 15 | Effect of TLL on partition coefficients of the $\beta$ -lactoglobulin in the L35-phosphate system (pH 7) in different temperature.....  | 62 |
| 16 | Effect of TLL on partition coefficients of the $\beta$ -lactoglobulin in the F68-phosphate system (pH 7) in different temperature.....  | 63 |
| 17 | Effect of TLL on partition coefficients of the bovine serum albumine (BSA) in the F68-phosphate and L35-phosphate system (pH 7) in different temperatures. ....               | 64 |

## RESUMO

MESQUITA, Anderson Fuzer, M.S, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Estudo termodinâmico da partição de lactoproteínas em sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros blocos.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Conselheiros: Luis Antônio Minim, Jane Sélia dos Reis Coimbra e Efraim Lázaro Reis.

Neste trabalho, foram estudados os dados de equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por L35 + fosfato de potássio e F68 + fosfato e potássio. Foram estudados os efeitos da variação de temperatura (10 °C, 25 °C e 40 °C) e da massa molar dos copolímeros sobre os dados de equilíbrio. A influência da variação de temperatura é mais intensa sobre a inclinação da tie-line (linha de amarração) do que sobre a posição da binodal e este efeito é maior para L35 do que para F68. A influência da massa molar sobre o comportamento dos diagramas de fase para os copolímeros F68 e L35 foi compensado pelos efeitos associados à hidrofobicidade das macromoléculas. A influência da mudança de pH (7 e 12) sobre o equilíbrio de fases dos sistemas L35 + fosfato de potássio + água e L35 + fosfato de potássio/hidróxido de potássio também foi estudado. Aumentando-se o pH, a curva binodal deslocou-se para concentrações de fosfato e copolímero mais altas correspondentes a uma diminuição na região bifásica de coexistência. A

partição de proteínas do soro de queijo tais como albumina de soro bovino (BSA) e  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) foi feita em sistemas aquosos bifásicos (SABs) consistindo de copolímeros blocos L35 e F68 formados por micelas. Esses copolímeros são membros da família PEO-PPO-PEO, onde PEO é poli(óxido de etileno) e PPO é poli(óxido de propileno). Dois diferentes sistemas aquosos bifásicos (SABs) foram usados: um preparado com L35-fosfato-água e o outro formado por F68-fosfato-água, ambos em pH 7. Os experimentos foram feitos a 10, 25 e 40 °C. As influências da natureza dos copolímeros triblocos, massa molar, temperatura e do comprimento da linha de amarração sobre a partição foram investigadas. Ambas proteínas particionaram para a fase de fosfato, mais hidrofílica e um fraco efeito da temperatura sobre os valores de coeficiente de partição foi observado. Os dados observados experimentalmente foram analisados usando um modelo simples derivado da teoria de Flory-Huggins por Johansson et al. Os resultados de particionamento foram discutidos em termos de contribuições entrópicas e entálpicas. A força entrópica predominou no comportamento de particionamento dessas proteínas, de maneira semelhante ao que ocorre em sistemas PEO – fosfato.

## ABSTRACT

MESQUITA, Anderson Fuzer, M.S, Universidade Federal de Viçosa, February 2004. **Studying thermodynamics of partition of lactoproteins in two-phase aqueous systems formed by block copolymers.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Committee Members: Luis Antônio Minim, Jane Sélia dos Reis Coimbra and Efraim Lázaro Reis.

This work reports on a phase equilibrium study of aqueous two-phase systems composed by L35 + potassium phosphate, and F68 + potassium phosphate. The effects of changes in temperature (10 °C, 25 °C, and 40 °C) and copolymer molar mass on data equilibrium were studied. The influence of temperature variation on the tie-line slope is more intense than that on the binodal position, and it is higher for L35 than for F68. The influence of molar mass on the behavior of the phase diagrams of both copolymers was compensated by effects associated to macromolecule hydrophobicity. It was also studied the influence of changes in salt pH (7 and 12) on the phase equilibrium of systems L35 + potassium, phosphate + water, and L35 + potassium phosphate/potassium hydroxide + water. As pH increased, the binodal curve shifted to higher copolymer and phosphate concentrations with the decrease in the two-phase coexistence region. Protein partitioning from cheese whey such as bovine serum albumin (BSA) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg)

was made in aqueous two-phase systems (ATPS) consisting of micelle-forming block copolymers L35 and F68. These copolymers are members of the PEO-PPO-PEO family, where PEO is poly(ethylene oxide) and PPO is poly(propylene oxide). Two different ATPS were used, one prepared with L35-phosphate-water and another formed by F68-phosphate-water, both at pH 7. The experiments were performed at 10, 25, and 40°C. The influences of the triblock copolymer nature, molar mass, temperature, and tie-line length on partitioning were investigated. Partitioning of both proteins towards the more hydrophilic phosphate phase and a weak temperature effect on partition coefficient values were observed. The data experimentally recorded were analyzed using a simple model derived from the Flory-Huggins theory by Johansson et al. The results are discussed in term of entropic and enthalpic contributions to partitioning. The entropic force predominated in the partitioning behavior of these proteins, similarly to what occurs in PEO – phosphate systems.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO GERAL

Adicionando em um béquer, já contendo benzeno puro, pequenas quantidades de tolueno, observa-se que independente da quantidade adicionada, a mistura permanecerá monofásica, desde que a pressão e a temperatura sejam mantidas constantes. A temperatura estará num intervalo, cujos valores extremos são bem diferentes da temperatura de fusão e da temperatura de ebulição dos dois componentes misturados. Neste caso os dois líquidos são completamente miscíveis. Entretanto, ao misturar água e octano, por exemplo, observa-se a formação de duas regiões (distintas) macroscópicas líquidas em contato; uma delas, a da água, contém pequenas quantidades de octano, enquanto a outra, a do octano, contém pequena quantidade de água dissolvida. Quanto a estes líquidos, pode-se dizer que são pouco miscíveis, já que um sistema totalmente imiscível não existe.

Muitos pares de espécies químicas quando misturados, em uma certa faixa de composição e temperatura, a fim de formar uma única fase líquida, podem não satisfazer o critério de estabilidade. Conseqüentemente, nesta faixa de composição, a simples adição de um dos componentes pode levar à formação de duas fases líquidas com composições diferentes. Se as fases estão em equilíbrio termodinâmico, o fenômeno constitui um exemplo de equilíbrio líquido-líquido (ELL) importante em muitas operações industriais como a extração de compostos de interesse **(1)**. A separação de substâncias por partição é um método clássico e, talvez, um dos mais difundidos em

química, seja em escala industrial ou laboratorial. Como exemplo, cita-se a separação de combustíveis nucleares, como uma ferramenta analítica **(2)**.

Processos de transição de fase, que promovem a formação de duas fases líquidas em equilíbrio, são observados com frequência em sistemas contendo polímeros e ocorrem sob diversas condições termodinâmicas. Esses processos de transição de fase podem ser observados em soluções aquosas ou não-aquosas, formadas por dois componentes dentro de uma faixa de temperatura e concentração, ou em misturas ternárias de um polímero e dois solventes distintos e, até mesmo, em mistura de dois ou mais polímeros sem a presença de qualquer solvente **(3)**. Um exemplo de sistema polimérico, em que ocorre separação de fases, é o sistema aquoso bifásico (SAB).

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são formados quando se misturam soluções aquosas de polímero e sal inorgânico (eletrólito). Poderia ser, ainda, a mistura de soluções aquosas de dois polímeros quimicamente diferentes, gerando espontaneamente duas fases aquosas, em que uma das fases está enriquecida em um dos componentes. Na maioria dos SABs, as fases são formadas majoritariamente por água, favorecendo a estabilidade termodinâmica das biomoléculas particionadas no mesmo **(4-6)**. Estes sistemas enquadram-se nesta categoria de equilíbrio líquido-líquido e tem sido vastamente utilizados na extração de biomateriais, pois, constituem uma técnica muito poderosa na separação e análise de partículas biológicas, tais como células, membranas, proteínas, organelas celulares, vírus, ácidos nucléicos e outras biomoléculas **(7-8)**. Apesar dos recentes estudos para aplicação dos sistemas aquosos bifásicos em diversas áreas, eles foram descobertos há mais de cem anos.

O primeiro trabalho encontrado na literatura foi desenvolvido pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1896. Nesse trabalho, o autor relata que misturas de soluções aquosas de gelatina e agar (ou amido) formavam sistemas aquosos bifásicos, com a fase superior rica em gelatina e a inferior rica em agar (ou amido) **(9-10)**. Ostwald e Hertel estudaram esses sistemas e verificaram que amidos de diferentes fontes produziam diferentes diagramas de fases **(11-12)**. Em 1946, Dobry e Boyer-Kawenoki descreveram um estudo sistemático sobre a miscibilidade de um grande número de pares de diferentes polímeros dissolvidos em solventes orgânicos e em água. Esses pesquisadores

descobriram que dos 35 pares de polímeros estudados apenas quatro não produziram o fenômeno de formação de duas fases. Concluiu-se que a incompatibilidade entre os polímeros manifestou-se como uma situação comum e a compatibilidade uma exceção **(3,13,14)**.

Em 1956, Albertsson observou que ao misturar dois polímeros e água ou polímero, sal e água, obtinha-se a formação de duas fases. Percebeu que, além da separação de fases, ocorria a partição/purificação de materiais biológicos, desde proteínas, vírus, ácidos nucleicos até outras biopartículas. Isto trouxe um benefício muito grande, pois, eliminou dois problemas referentes à aplicação de sistemas água-solvente orgânico para purificação de biopolímeros: a desnaturação e/ou efeitos de precipitação e a partição extrema de proteínas para uma das fases. Além disso, como o volume de ambas as fases contém uma grande quantidade de água, os sistemas aquosos bifásicos oferecem um meio suave para células, organelas celulares e proteínas biologicamente ativas. Por suave, entende-se (i) um meio com baixa tensão interfacial, que favoreça a migração das biomoléculas entre as fases e minimize o risco de danificação da estrutura de proteínas e células;(ii) alto conteúdo de água em ambas as fases;(iii) pequena diferença de hidrofobicidade entre as fases capazes de uma separação muito específica de misturas de biomoléculas. **(2,13,15)**.

Durante todo o seu desenvolvimento, inclusive atualmente, a pesquisa na área de sistemas aquosos bifásicos segue três tendências. A primeira visa à aplicação de SABs já conhecidos termodinamicamente à purificação/extração de novos solutos, sendo, desta forma, uma excelente ferramenta, não somente para biosseparações, mas também para separações de moléculas menores, íons metálicos e compostos orgânicos **(16,17)**. Os íons metálicos presentes em solução aquosa eram extraídos, utilizando-se solventes orgânicos imiscíveis com a água, através de reagentes extractantes apropriados. Entretanto, solventes orgânicos empregados na extração de metais são tóxicos, inflamáveis e voláteis, sendo bastante agressivos ao meio ambiente. Em contrapartida, os SABs formados por poli (óxido de etileno) (PEO), sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  e água podem ser considerados mais amistosos ambientalmente, pois um dos seus componentes, o PEO, não é tóxico, inflamável ou volátil **(18)**. Outro exemplo é a aplicação de SABs a separação de

proteínas do soro do queijo. A composição do soro do queijo é, aproximadamente, 93% de água, 5% de lactose, 0,9% de proteínas, 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas **(19)**. Dentre 0,9% de proteínas contidas no soro do queijo, as que aparecem em maior quantidade são a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) e constituem cerca de 50% e 20%, respectivamente, das proteínas do soro do leite **(20)**. Devido a vasta aplicabilidade das proteínas do soro do queijo, torna-se importante o desenvolvimento de processos de separação e purificação, em larga escala, destas proteínas, e que também sejam viáveis economicamente. Logo, a busca por processos eficientes e econômicos para o processamento de biomoléculas é uma necessidade. As técnicas empregadas em biosseparações devem assegurar que a atividade biológica das moléculas não seja afetada e assegurar, ao mesmo tempo, elevada pureza e rendimento. Uma das técnicas de purificação, que preenchem estes requisitos, é a partição de biomoléculas por extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos **(21)**. Muitos trabalhos nesta linha tem sido feitos, utilizando SABs formados por polímero-polímero e/ou polímero-sal **(22-25)**. A Tabela 1.1 apresenta alguns exemplos.

Tabela 1.1. Exemplos de SABs sendo empregados na partição de proteínas.

| <b>SAB</b>                         | <b>Proteínas</b>                           | <b>Referência</b> |
|------------------------------------|--|-------------------|
| PEO + fosfato                      | $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg                 | (22)              |
| PEO + maltodextrina                | $\alpha$ -La , $\beta$ -Lg, BSA            | (25)              |
| Dex + goma guar                    | $\beta$ -Lg, BSA, caseína                  | (41)              |
| EO50PO50 + HM-EOPO                 | Lisozima, BSA                              | (51)              |
| PEO + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | $\alpha$ -La e $\beta$ -Lg                 | (66)              |
| PEO + fosfato + uréia              | $\beta$ -galactosidase, lisozima, catalase | (65)              |

A segunda tendência observada na pesquisa em SABs procura descobrir as forças motrizes que determinam o comportamento de sistemas bifásicos. Conforme indicado anteriormente, os SABs são empregados na extração de biopartículas, metais pesados e outros solutos de interesse. Entretanto, o mecanismo que governa a formação e a partição de solutos nesses sistemas é ainda desconhecido, donde resulta que a obtenção de um SAB otimizado para extração de um determinado soluto esteja, ainda, restrita a

uma abordagem de tentativa e erro. Há muitas dificuldades à obtenção de um modelo geral. Uma delas é a grande quantidade e diferença entre os possíveis componentes capazes de gerar os SABs. Para superar estas dificuldades, é importante pesquisar dados relacionados à energia livre do sistema. A busca de dados referentes a diagramas de fases e coeficientes de partição de um determinado soluto é útil a obtenção de informações referentes à minimização da energia livre de Gibbs envolvida no processo de formação dos SABs e da partição de solutos. Com isto, caminha-se em direção à diminuição das dificuldades quanto à compreensão dos fatores que governam a formação e partição nos SABs **(3)**.

Através do diagrama de fase, representam-se as composições dos sistemas em que ocorre, ou não, a separação de fases, isto é, em qual composição global o sistema encontra-se bifásico ou monofásico. As Figuras 1.1 e 1.2 mostram dois tipos de diagramas. O primeiro expresso em coordenadas triangulares e o segundo em coordenadas cartesianas (retangulares). Os três vértices do triângulo equilátero representam, respectivamente, os componentes 1, 2 e 3 (água) puros. Os lados do triângulo representam sistemas binários, constituídos pelo componente 1 + água, componente 1 + componente 2, componente 2 + água. Os pontos internos do triângulo representam misturas dos três componentes. A porcentagem de cada componente, em uma mistura, é lida ao longo da linha perpendicular no lado oposto do ápice correspondente.

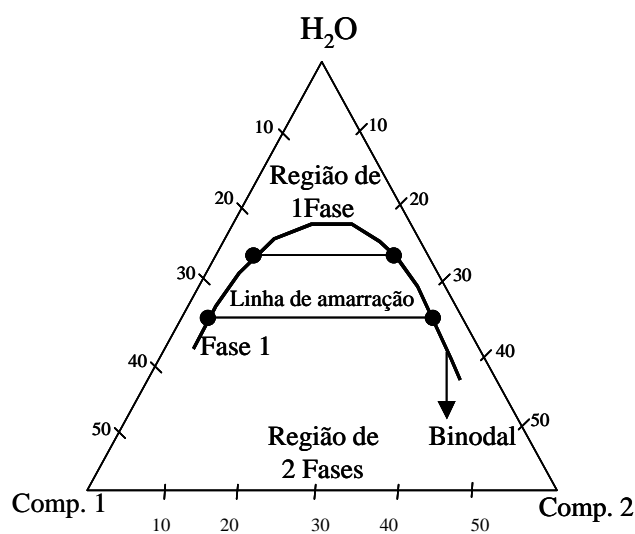


Figura 1.1. Diagrama de fase expresso em coordenadas triangulares.

Em coordenadas cartesianas, o diagrama de fases será expresso como representado na Figura 2.1 abaixo.

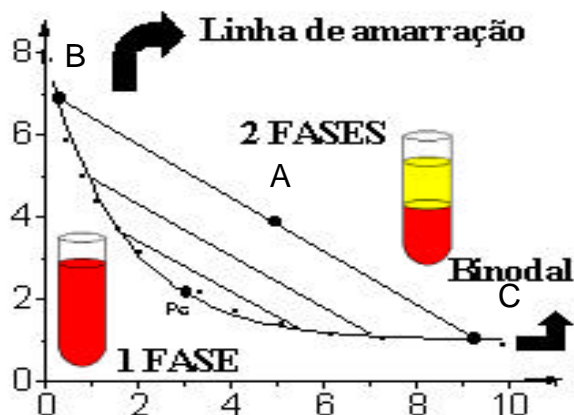


Figura 1.2. Diagrama de fases expresso em coordenadas cartesianas (retangulares).

Para os sistemas aquosos bifásicos onde a região de interesse concentra-se na parte do diagrama com elevado teor de água, a forma de eixos cartesianos, que expressa apenas duas concentrações do sistema, é a mais utilizada (26). O eixo das ordenadas é, comumente, utilizado na composição do componente 2, que é enriquecido na fase superior, enquanto o eixo das abscissas é utilizado para a composição do componente 1, que predomina na fase inferior. As concentrações podem ser expressas em porcentagem e a diferença entre os diagramas de fase da Figuras 1.1 e 1.2 é que, no último, a concentração do solvente está implícita. A curva que separa a região monofásica da bifásica é chamada binodal e representa a concentração mínima dos três componentes do sistema necessária para que ocorra a separação de fases, ou seja, todas as misturas que tem composições representadas por pontos acima e à direita da binodal dão origem a separação de fases, enquanto que as misturas representadas pelos pontos abaixo e à esquerda da binodal não originam separação de fases (2,27). Suponha que o ponto A, na Figura 1.2, representa a composição global do sistema (porcentagem do componente 1, do componente 2 e da água, que dará origem as duas fases). As composições da fase superior e inferior serão representadas pelos pontos B e C, respectivamente. Elas indicam a porcentagem de cada componente na fase superior e inferior, respectivamente. A linha que une os

pontos B e C, representando a composição das fases coexistentes, é chamada linha de amarração (tie line).

Na Figura 1.3, observa-se que qualquer composição global, representada pelos pontos sobre a mesma linha de amarração, originará sistemas bifásicos com propriedades intensivas iguais a cada ponto, mas propriedades extensivas diferentes, independentes dos pontos. Sendo a composição expressa em porcentagem (m/m), a razão em massa da fase inferior/fase superior é igual à razão entre as linhas  $A_sA$  e  $AA_i$ . Considerando sucessivas linhas de amarração (paralelas entre si) de forma que elas diminuam, em comprimento, até que os dois pontos  $A_s$  e  $A_i$  coincidam, chegaremos ao ponto crítico.  $P_c$  representa o ponto crítico (também chamado *plait point*) e a composição representada pelo ponto  $P_c$  é chamada composição crítica. Neste ponto, as composições e os volumes das duas fases teoricamente tornam-se iguais. Logo, uma mudança muito pequena na composição global, de baixo para cima em relação ao ponto  $P_c$  significa uma mudança do sistema de monofásico para bifásico com o volume das duas fases formadas muito próximos à igualdade. Pode-se dizer que as proprieda-

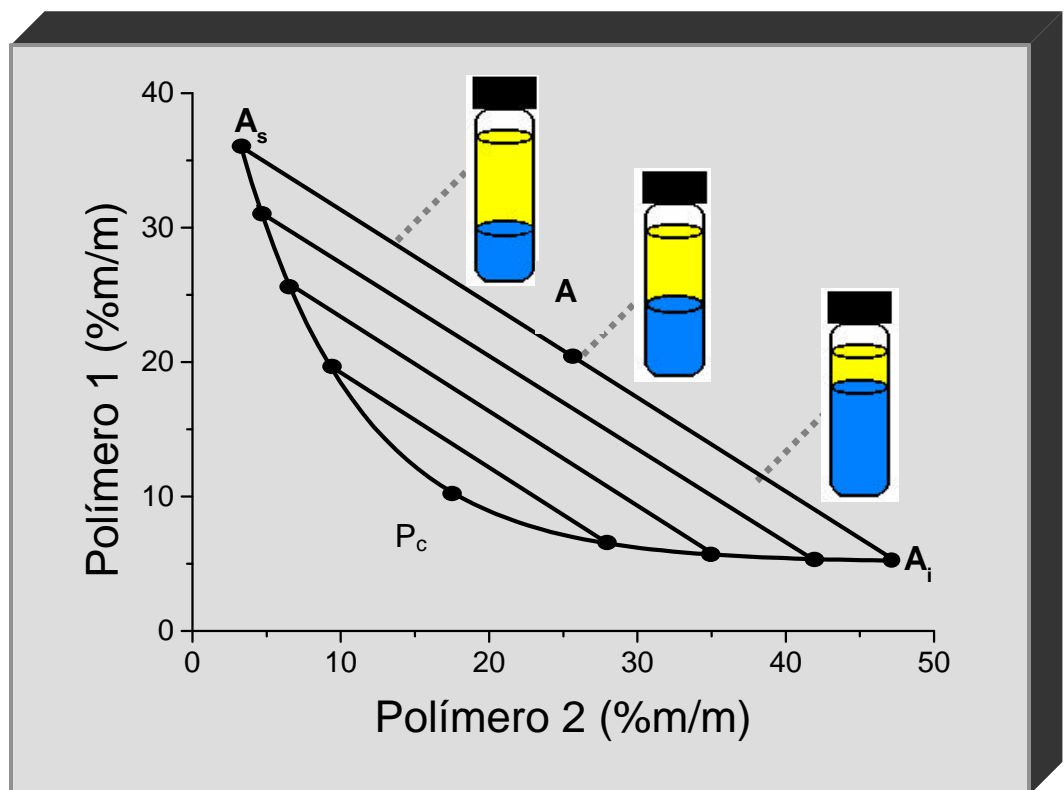


Figura 1.3. Diagrama de fases de um sistema formado pelo polímero 1, polímero 2 e água.

des termodinâmicas intensivas e extensivas das fases em equilíbrio, no ponto crítico, são iguais.

Diferentes métodos são utilizados para construir uma diagrama de fase. O mais utilizado pela comunidade científica de SABs é a análise química das fases. Neste caso, a binodal pode ser construída, pela determinação da composição das fases superior e inferior de uma série de sistemas em que as concentrações globais dos polímeros são variadas. Em conseqüência obteve-se os pontos  $A_s$  e  $A_i$  da Figura 1.3 e a linha de amarração é aquela que une estes dois pontos.

Outro método, menos exato, é a titulação turbidimétrica, também denominada determinação do ponto-de-nuvem. Neste método partiu-se de uma solução concentrada de polímero e adicionou-se em gotas uma solução estoque do segundo polímero (ou sal). Após a adição de cada gota a solução é misturada completamente. O aparecimento de turbidez (ponto-de-nuvem) indica que o sistema entrou em área bifásica. Conhecendo-se as concentrações iniciais das soluções de polímero e as quantidades de solução de polímero (ou sal) adicionadas, o primeiro ponto sobre a binodal pode ser determinado. Uma quantidade de água é adicionada para tornar o sistema homogêneo. Em seguida, mais solução de polímero (ou sal) é adicionada, em quantidade de microlitros, até que a turbidez seja novamente obtida. Desta maneira uma série de composições perto da binodal é obtida. Ao obter o gráfico da concentração do polímero 1 contra o polímero 2 (ou sal) para essas composições, uma linha como essa da Figura 1.3 é obtida **(2,13,27)**.

Além de ser a melhor forma de se construir um diagrama de fase, a análise química dos componentes formadores do sistema em cada fase possibilita o cálculo de importante parâmetro termodinâmico denominado comprimento da linha de amarração (CLA). O CLA, usualmente referido como TLL (tie line length), é um valor empírico e pode ser calculado através das concentrações dos componentes P e Q nas suas respectivas fases, superior (S) e inferior (I), pela equação:

$$CLA = \left\{ [C(P)_s - C(P)_i]^2 + [C(Q)_s - C(Q)_i]^2 \right\}^{0.5} \quad (1)$$

O comprimento da linha de amarração tem as mesmas unidades das concentrações dos polímeros (sal), isto é, porcentagem em massa **(13)**. É

interessante observar que tanto o componente P quanto Q, podem ser designados como sendo o sal num SAB formado por polímero, sal e água. O CLA é um parâmetro utilizado para medir a diferença das propriedades intensivas, pois é construído em função das concentrações dos componentes. À medida que aumenta o CLA, sendo mantidas constantes temperatura e pressão, maior será a diferença de energia livre de Gibbs, por exemplo, portanto maior será a diferença, entre as fases, das propriedades termodinâmicas sob o ponto de vista entálpico e entrópico.

Ainda nesta linha — que tem como objetivo suprir as dificuldades na obtenção de dados relacionados à variação da energia livre do sistema — não se pode deixar de explanar a respeito do coeficiente de partição. Termodinamicamente, o coeficiente de partição é definido como a razão da atividade do soluto na fase superior pela atividade do soluto na fase inferior.

$$K = \frac{a^S}{a^I} = \frac{g^S \cdot C^S}{g^I \cdot C^I} \quad (2)$$

Sabe-se que a atividade ( $a$ ) é, na verdade, a concentração corrigida, sendo o fator de correção denominado coeficiente de atividade ( $\gamma$ ). O coeficiente de atividade, em magnitude, descreve o grau de não idealidade, que é determinado pelas interações entre as moléculas. Quando as interações entre as moléculas tornam-se diferentes, devido ao tamanho, geometria e energia de interações intermoleculares, os valores dos coeficientes de atividade desviam-se, cada vez mais, do valor unitário, isto é, da idealidade. Portanto, pode-se dizer que, para soluções muito diluídas, o coeficiente de atividade aproxima-se de um e, conseqüentemente, a atividade é aproximadamente a concentração do soluto **(13)**. Então para regimes de diluição infinita podemos definir o coeficiente de partição segundo a relação abaixo

$$K = \frac{C^t}{C^b} \quad (3)$$

onde  $C^t$  e  $C^b$  são as concentrações do soluto nas fases superior ( $t$ ) e inferior ( $b$ ), respectivamente. Quando adiciona-se uma biopartícula num SAB, de

acordo com as propriedades físico-químicas deste soluto, e das fases formadoras dos SABs, ocorrerá migração preferencial para uma das fases. Em sistemas macromoleculares, esta migração preferencial pode ser expressa, quando formulada corretamente, pela teoria de Flory-Huggins. Esta teoria oferece uma expressão analítica simples para o coeficiente de partição  $K$  de um soluto não iônico, infinitamente diluído. Neste modelo, as contribuições entálpicas e entrópicas são explicitadas, permitindo, assim, a interpretação direta da força motriz dominante para o particionamento de um soluto em um dado sistema bifásico. Após algumas deduções assume-se que o coeficiente de partição ( $K$ ) pode ser dado pela relação:

$$\ln K = \frac{M_s}{r} \left( \frac{n^t}{V^t} - \frac{n^b}{V^b} \right) \quad (4)$$

onde  $n^t$  e  $n^b$  são o número total de moléculas na fase superior e inferior, respectivamente. A massa molar do soluto particionado é dada por  $M_s$ ;  $r$  é o número de sítios da rede, por unidade de volume;  $V^t$  e  $V^b$  são os volumes da fase superior e inferior, respectivamente. Esta simples relação indica que na ausência de efeitos entálpicos, ocorrerá um particionamento desigual do soluto se existir uma diferença de moléculas por unidade de volume entre a fase superior e inferior. Sob tais condições, um soluto particionará para fase onde houver maior número de moléculas por unidade de volume (densidade). Isto segue do fato que o aumento da entropia de mistura é proporcional ao logaritmo natural do número de maneiras distintas em que as moléculas podem ser arranjadas numa mistura. Em essência, a fase com maior densidade poderá acomodar o soluto numa maior quantidade de maneiras, aumentando assim a tendência do soluto em particionar para aquela fase.

Considerando que as contribuições entrópicas para o particionamento são negligenciáveis, isto é, um sistema bifásico em que as densidades das fases são idênticas, o particionamento da proteína dependerá, somente, da diferença de entalpia molar parcial entre a fase superior e inferior. Após algumas deduções assume-se que o coeficiente de partição ( $K$ ) pode ser dado pela relação:

$$\ln K = -\frac{M_s}{RT} [(w_{ts} - E_t) - (w_{bs} - E_b)] \quad (5)$$

A contribuição entálpica para o particionamento do soluto possui dois termos. O primeiro ( $w_{ts}$ ) é a diferença de energia devido a todas as interações entálpicas binárias diferentes entre o soluto particionado e os componentes que permanecem em cada fase. O segundo termo ( $E_t$ ) é a diferença de energia de cada fase devido as diferentes interações entálpicas entre todos os componentes da fase diferentes do soluto. A massa molar do soluto é dada por  $M_s$ .  $R$  e  $T$  são, constante universal dos gases e temperatura termodinâmica, respectivamente. Os valores negativos, de  $w$  e  $E$ , representam um processo energeticamente favorável, enquanto os valores positivos representam processos energeticamente desfavoráveis. Por exemplo, se uma proteína tem uma forte atração por um componente que é enriquecido na fase superior, então  $w_s$  será mais negativo, pois, desta forma ele levará a valores mais positivos de  $\ln K$ . A dependência de  $K$  em relação as auto-energias das fases superior e inferior originam-se por que o particionamento de um soluto numa fase requer a quebra de interações entre os componentes da fase para criar uma cavidade em que o soluto possa se encaixar. Se essas interações são atrativas, então a quebra delas é energeticamente desfavorável. Entretanto, se as interações forem repulsivas, a formação da cavidade é favorável. Em essência, a auto-energia de uma fase é a energia de interação entre duas redes de sítios médios da fase. Logo, a equação (5) prediz que a proteína particionará em favor da fase com valor mais alto (mais positiva) de auto energia  $E$  **(28)**.

Segundo a definição da equação (3), a biopartícula particionará preferencialmente para fase superior se  $K > 1$  e para fase inferior se  $K < 1$  **(27)**. Esta migração favorável ocorre por que existem interações do soluto com os componentes do sistema (dois polímeros e água ou polímero, sal e água) **(29)**. Em outras palavras, o coeficiente de partição nos oferece informações a respeito das forças intermoleculares que regem um determinado sistema, pois, ao obtê-lo teremos acesso à energia livre de transferência e, conseqüentemente, as suas contribuições entálpicas e entrópicas.

Energia livre de transferência é a energia envolvida quando se transfere um mol de soluto de uma fase para outra nas condições-padrão (em relação ao

estado de referência). A equação que relaciona a energia livre de transferência com o coeficiente de partição é a equação (6).

$$\Delta G = \Delta_t G + RT \ln K \quad (6)$$

Como trata-se de um processo de transferência em equilíbrio termodinâmico, logo,  $\Delta G = 0$ . Daí

$$\Delta_t G = -RT \ln K = -RT \ln (C^t/C^b) \quad (7)$$

Com esta equação também pode-se estabelecer a relação da energia livre de transferência com a partição de um soluto de uma fase para outra. Se  $K > 1$ , por exemplo, sabe-se que o soluto está preferencialmente particionado para fase superior, logo,  $\Delta_t G < 0$ . Se  $K < 1$  o soluto está preferencialmente particionado para fase inferior, logo,  $\Delta_t G > 0$ .

Para analisar quais fatores — entálpicos, entrópicos ou os dois simultaneamente — estão governando a partição do soluto deve-se estabelecer uma equação que relaciona todas essas variáveis:

$$\Delta_t G = \Delta_t H - T \Delta_t S \quad (8)$$

desmembrando esta equação, pode-se expressá-la como:

$$G^t - G^b = (H^t - H^b) - T(S^t - S^b) \quad (9)$$

Após a separação de fase, seria esperado um tempo necessário para obtenção do equilíbrio termodinâmico. Pode-se recolher a fase superior e/ou inferior e fazer a leitura num calorímetro. De posse dos dois valores,  $H^t$  e  $H^b$ , pode-se calcular o  $\Delta_t H$ . Com  $\Delta_t H$  e  $\Delta_t G$ , calcula-se o  $\Delta_t S$  pela relação (6). É possível, assim, dimensionar qual contribuição, entálpica ou entrópica está sendo determinante para que o soluto vá preferencialmente para fase superior e inferior.

O coeficiente de partição é dependente de vários fatores, que atuam aproximadamente independentes. Logo,  $K$  pode ser escrito como

$$\ln K = \ln K_{polímero} + \ln K_{sal} + \ln K_{ligantes} + \ln K_{outros} \quad (10)$$

onde,  $K_{polímero}$ ,  $K_{sal}$ ,  $K_{ligantes}$  e  $K_{outros}$  são as contribuições para o particionamento da proteína devido aos polímeros formadores de fase, aos sais, a afinidade dos ligantes e a outros fatores do sistema (8). Existem outras

relações que podem expressar o coeficiente de partição. Segundo Diamond e Hsu o coeficiente de partição pode ser definido pela expressão

$$K = K_{\text{ambiental}} + K_{\text{estrutural}} \quad (11)$$

onde  $K_{\text{ambiental}}$  e  $K_{\text{estrutural}}$  representam as contribuições dos fatores ambientais e de ordem estrutural. Dentre os fatores ambientais pode-se considerar propriedades dos sistemas aquosos bifásicos, como o tipo e concentração dos polímeros, pH, temperatura e ligantes específicos **(30)**.

A razão pela qual um determinado soluto se distribui entre as fases depende de uma série de fatores **(8)**. São eles:

(a) Tamanho do biomaterial. Pequenas moléculas, tais como aminoácidos, geralmente se distribuem igualmente entre as fases **(40)**. Partículas maiores, como as proteínas, tendem a particionar mais desigualmente do que as partículas menores. Partículas extremamente grandes, como as células, distribuem-se entre a interface e uma das fases, ou são reunidas inteiramente na interface **(8)**.

(b) Tipo de polímero formador de fase. Diferentes polímeros solúveis em água podem ser usados para gerar sistemas bifásicos.**(40-42)** Atualmente muitos trabalhos têm sido feitos com diferentes combinações de polímeros que produzem sistemas bifásicos. A escolha do polímero, ou dos polímeros, determinará a composição das fases e a natureza das interações polímero–proteína.

(c) Massa molar dos polímeros. A massa molar do polímero formador das fases influencia o particionamento do biomaterial pela alteração do diagrama de fase e pela mudança no número de interações polímero–proteína. Em geral, o aumento da massa molar do polímero que enriquece uma das fases causará a migração do biocomposto para outra fase. Entretanto, esse efeito diminui com o aumento da cadeia do polímero **(69)**.

(d) Concentração dos polímeros: Visualizando o diagrama de fase da Figura 1.3, pode-se analisar melhor o efeito da concentração do polímero formador da fase sobre a partição de biomoléculas. No ponto crítico  $P_c$ , o coeficiente de partição das biomoléculas é igual a 1. Quando a diferença de concentração dos polímeros aumenta provoca o deslocamento da curva binodal e do ponto

crítico, além de alterar a composição das fases. Como resultado, substâncias solúveis tais como as proteínas particionam mais em direção a uma das fases e freqüentemente o coeficiente de partição é modificado. A relação quantitativa entre o coeficiente de partição do soluto e a diferença entre as concentrações nas duas fases foi obtida por Diamond e Hsu da teoria de Flory-Huggins de termodinâmica de polímeros e confirmada, experimentalmente, para peptídeos e algumas proteínas. Na equação (12),  $K$  é o coeficiente de partição do peptídeo ou da proteína;  $\Delta C_i$  é a diferença entre as concentrações nas duas fases do polímero formador de fase; e  $k_{ij}$  é uma constante, que depende do peptídeo/proteína e do sistema aquoso bifásico empregado **(13,27)**.

$$\ln K = k_{ij} \Delta C_i \quad (12)$$

(e) Potencial hidrogeniônico (pH). Existem dois fatores físico-químicos principais que governam a influência do pH sobre a partição da proteína: (i) mudança das propriedades no meio aquoso de cada fase decorrente da mudança de pH e/ou da mudança na composição do tampão;(ii) mudanças na estrutura e carga da proteína. A influência do pH sobre o coeficiente de partição é usualmente tratada em termos de diferença de potencial elétrico aparente entre as duas fases **(27)**. Portanto, a variação do coeficiente de partição da proteína num sistema específico e em determinado intervalo de pH é influenciada pela composição iônica. Alterando o pH, ocorrerá variação na carga líquida da proteína, sendo positiva em baixos valores de pH, negativa em valores altos de pH e passando pelo ponto isoelétrico, onde a carga é nula **(13)**. Alterando o pH, provocam-se mudanças na estrutura conformacional da proteína, causando uma mudança no comportamento de partição da proteína. Em valores extremos de pH, pode ocorrer a desnaturação da proteína e as mesmas desnaturadas geralmente particionam, diferentemente, daquelas nativas porque a proteína desnaturada tem uma área superficial maior que a proteína nativa, bem como sua superfície exposta é mais hidrofóbica **(8)**.

Schmidt et al. constataram que o coeficiente de partição da  $\alpha$ -amilase aumentou de 0,7 para 20 com a elevação do pH de 5,3 para 9,5. Um aumento do coeficiente de partição com elevação do pH de 6 a 8 foi observado na partição da BSA no SAB formado por PEG/cashew-nut tree gum **(42)**.

(f) Temperatura. Os efeitos da temperatura sobre o particionamento são, geralmente, indiretos. A temperatura pode alterar a forma da curva binodal do diagrama de fases, influenciando, assim, a partição da proteína, bem como a mudança da estrutura da biomolécula, através de sua desnaturação, influenciando na sua distribuição **(8)**. Existe uma tendência geral para que valores de K de proteínas, no sistema PEG–Dex, elevem-se com o aumento da temperatura para valores maiores que 1. Isto pode ser devido a mudanças na composição das fases (desde que a diferença na composição entre as duas fases seja diminuída) e na solvatação relativa das proteínas **(13)**.

As propriedades físico-químicas das fases também variam com as composições dos polímeros ou do polímero e sal que formam o SAB. Para decidir sobre quais propriedades são importantes para o particionamento em sistemas aquosos bifásicos, é necessário entender os mecanismos de particionamento. Diferentes aproximações teóricas sobre esses mecanismos e também de separação de fase, têm sido revisadas e alguns trabalhos têm sido publicados nesta área **(31-34)**. Para o planejamento, operação e otimização de processos de extração em SABs, a disponibilidade de modelos úteis à previsão sobre o equilíbrio de fases nesses sistemas é de grande importância, pois, eles providenciam a base para prever o comportamento de fases em casos em que os dados experimentais não estão disponíveis. Existem dois modelos principais que tratam de comportamento de fase dos SABs: o modelo de rede (lattice) e o modelo de expansão do virial osmótico. O modelo de rede, incorporando o conceito de energia de interação na forma de pares, pode dar uma representação mais satisfatória para os SABs do tipo polímero-polímero. O modelo de Flory-Huggins e o modelo UNIQUAC (**UN**iversal **QU**asi-chemical **A**ctivity **C**oefficient) foram usados para correlacionar dados de uma vasta variedade de SABs formados por polímero-polímero **(35-36)**. O comportamento de fase do sistema PEO-dextrana-água foi descrito incorporando o efeito de polidispersão do polímero sobre o comportamento do sistema **(37)**.

Todo processo de extração líquido-líquido requer conhecimento do comportamento termodinâmico do sistema para o projeto de engenharia e otimização do processo. Embora a descrição termodinâmica do comportamento de fase do sistema polímero-polímero-água tenha sido estudada até certo ponto, pouca atenção foi dada a modelagem termodinâmica de sistemas

aquosos do tipo polímero-sal. Kabiri-Badr e Cabezas desenvolveram um modelo da mecânica estatística que considera o potencial químico dos componentes para prever o comportamento de misturas de polímero-sal-água multifásicas, sendo que este modelo inclui o efeito de massa molar do polímero sobre o comportamento de fase do sistema **(38)**.

Como se observa, muito esforço tem sido feito no intuito de entender as razões que levam um sistema à separação de fases — sendo a maior parte dele tratando com modelagem teórica sobre o comportamento da fase e particionamento de soluto — mas um esforço experimental muito pequeno tem sido devotado no intuito de contribuir com modelos teóricos mais efetivos e realísticos. Em se tratando de pesquisa na área de sistemas aquosos bifásicos, a maioria das investigações segue os princípios de físico-química de polímeros, mais especificamente da estrutura da teoria de Flory-Huggins. Sendo os estudos centrados sobre a energia livre de Gibbs, pouca atenção é dada quanto às contribuições de entalpia e entropia **(39)**. Nesta mesma linha, um conjunto de equações analíticas simples, derivadas da teoria de Flory-Huggins, estão sendo utilizadas para identificar as forças motrizes dominantes no processo de separação de fases e partição de solutos, tais como proteínas, na presença e ausência de eletrólitos adicionados em toda uma classe geral de sistemas aquosos bifásicos **(28)**.

Uma terceira tendência de pesquisa em SABs busca novos componentes para formação desses sistemas. A solução aquosa formada de PEO e dextrana é o sistema de polímero mais estudado **(40)**, sendo um dos SABs — juntamente com PEO-fosfatos e dextrana- $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -NaCl a  $0^\circ\text{C}$  — utilizados em escala industrial. Basicamente, existem dois tipos de SABs: polímero-polímero, por exemplo, PEO + dextrana + água e polímero-sal, por exemplo, PEO + fosfato de potássio + água. Na busca por novos componentes formadores de SABs, muitos trabalhos tem sido feitos com objetivo de conseguir polímeros a um custo mais baixo como, por exemplo, os esforços no sentido de substituir a dextrana fracionada por um polímero mais barato, ou um polissacarídeo, **(41-42)**, amido **(43)**, maltodextrina **(44)**, dentre outros. Isto reduziria consideravelmente o custo do processo. Não se tem feito muita questão de eliminar o PEO, pois ele está disponível a um baixo custo e forma sistemas bifásicos com outros polímeros neutros. Ultimamente, muito se tem

trabalhado no estudo de sistemas bifásicos, que tenham como um dos componentes da fase um polímero “inteligente”, que seja prontamente recuperado da solução, quando ocorre separação de fases devido a uma mudança moderada nas condições do meio, como temperatura e pH **(45)**.

Como a separação dos polímeros formadores de fases das biomoléculas, depois da extração primária, constitui uma importante etapa do processo em escala industrial e laboratorial, métodos como a ultrafiltração, eletroforese e cromatografia têm sido empregados para separar biomoléculas de solução de polímeros. O problema encontrado é que os métodos, acima citados, são caros e demandam muito tempo de execução, de forma que, essa separação por eles executada não é satisfatória. A disponibilidade de um SAB formado por um polímero, que pudesse ser facilmente removido e reciclado sem os custos de ultrafiltração e cromatografia, tornaria o processo mais eficiente **(46)**. Neste sentido, algumas técnicas de purificação recentes empregando SABs sugerem o uso de polímeros termosseparáveis, tais como os copolímeros formados por unidades de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO), pois, estes reduzem o custo da recuperação de polímeros **(47)**. Nos últimos anos o uso de polímeros termosseparáveis como técnica de particionamento tem sido investigado **(48-56)**. Polímeros termosseparáveis são aqueles cuja solubilidade é diminuída em temperaturas elevadas. Esses polímeros separam em fases acima de certa temperatura, denominada temperatura do ponto-de-nuvem (cloud-point temperature). Nesta temperatura a solução torna-se turva devido à formação de microfases ricas em polímero, de forma que o ponto de nuvem depende da concentração do mesmo. O PEO é um polímero termosseparável, mas seu ponto de nuvem é muito alto (acima de 100 °C) para separação de biomaterial. O menor valor de ponto de nuvem é referido como a temperatura crítica inferior de solução (TCIS), também conhecida como “*lower critical solution temperature*” (LCST). Os copolímeros randômicos de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) têm pontos de nuvem mais baixos do que os polímeros de PEO de mesma massa molar. O uso de copolímeros ao invés de PEO, em sistemas aquosos bifásicos, tem dois efeitos positivos: (a) os copolímeros podem ser recuperados após a separação térmica das fases; e (b) as proteínas podem ser recuperadas, numa fase aquosa **(57-59)**. Como o presente trabalho diz respeito à utilização de SABs

formados por copolímeros triblocos, na partição de lactoproteínas, é importante que se faça uma breve descrição a respeito das características dos copolímeros blocos.

Os copolímeros blocos são, geralmente, definidos como macromoléculas com arranjo linear e/ou radial de dois ou mais diferentes blocos de variada composição de monômeros **(60)**. Em outras palavras, os copolímeros são macromoléculas sintetizadas pela polimerização simultânea de mais de um tipo de monômero, que ocorrem como blocos de vários comprimentos na molécula do copolímero, sendo esses diferentes blocos dentro do copolímero normalmente incompatíveis **(61)**. Dependendo do processo de polimerização, esses copolímeros podem apresentar uma variedade de estruturas moleculares, conforme apresentado na Figura 1.4 **(62)**.

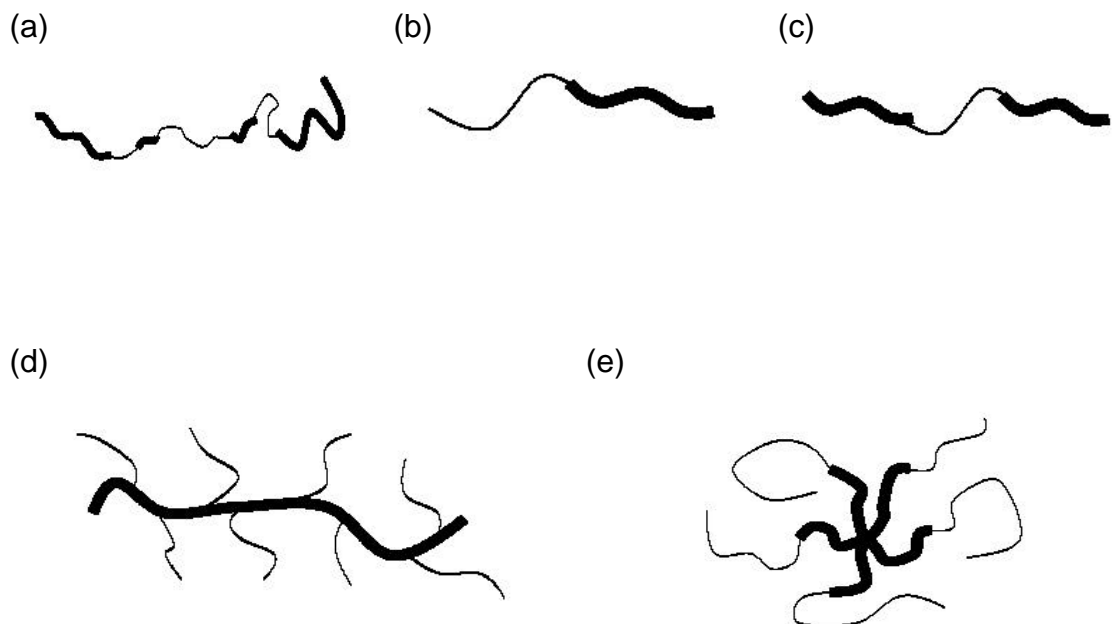


Figura 1.4. Representação de diferentes estruturas de copolímeros: (a) copolímero randômico, (b) copolímero dibloco, (c) copolímero tribloco, (d) copolímero “graft”, (e) copolímero estrela. Parte hidrofóbica **—** e parte hidrofílica **—**

Os copolímeros ocorrem, amplamente, na natureza e na indústria. As proteínas são copolímeros com, aproximadamente, vinte diferentes tipos de aminoácidos em ordem irregular, mas com a mesma seqüência em toda cadeia. Copolímeros sintéticos são produzidos para melhorar certas

propriedades ou, até mesmo, como único meio de atingir essas propriedades **(63)**. Como exemplo, cita-se os copolímeros triblocos solúveis em água compostos de blocos — hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO) e hidrofóbicos de poli(óxido de propileno) — unidos na seqüência PEO-PPO-PEO, que são comercializados com os nomes de Pluronic ou Poloxamers. Dependendo da especificidade requerida para a aplicação, a natureza anfifílica desses copolímeros blocos pode ser variada pelo controle do comprimento dos blocos PEO e/ou PPO. Em outras palavras, a variação na composição do copolímero (razão PPO/PEO) e massa molar (comprimento dos blocos de PEO e PPO) nos leva à produção de moléculas, que possuem uma ampla aplicação como surfactantes e ótimas propriedades, que reúnem exigências específicas em várias áreas de importância tecnológica. Nas últimas duas décadas, os copolímeros blocos (Pluronic) têm encontrado numerosas aplicações na indústria química, farmacêutica e ambiental como agentes antiespumantes, emulsificantes, detergentes, lubrificantes e estabilizantes de dispersão coloidal, formulação de cosméticos e tintas, além de outras aplicações especializadas na área farmacêutica (solubilização e liberação controlada de drogas), em bioprocessamento (proteção de microorganismos contra danos mecânicos) e nas separações (solubilização de compostos orgânicos em soluções aquosas) **(61)**. Mais recentemente, devido suas propriedades não tóxicas e sua natureza superficial ativa, os copolímeros blocos também encontraram aplicação na área de biomateriais, liberação de drogas e na produção de remédios cardiovasculares **(64)**.

Os copolímeros estão disponíveis numa extensão de massas molares que abrange de 1000 a 15000 g/mol e razões de composição de PPO/PEO entre 10 e 80% em massa de PEO [A grade de copolímeros apresentada em **(61)** oferece uma visão clara desta classificação]. Os fabricantes usam diferentes códigos. A notação para os copolímeros blocos Pluronic (BASF) inicia com as letras L (líquido), P (pasta) e F (flocos). Os primeiros um ou dois números são indicativos da massa molar do bloco de poli(óxido de propileno) (PPO) e o último número indica o conteúdo de unidades do bloco de poli(óxido de etileno) (PEO) [o último dígito multiplicado por 10 = porcentagem de PEO]. Por exemplo, Pluronic P104 e P108 tem a mesma ordem de massa molar de PPO (em torno de 3000 g/mol), mas o P104 tem 40% de PEO e o F108 tem

80% de PEO. O ponto de nuvem (cloud point) estende-se de aproximadamente 10 °C para copolímeros com baixo conteúdo de PEO para valores acima de 100 °C para copolímeros com alto conteúdo de PEO. O conteúdo de PEO também influencia a taxa de dissolução: esta taxa diminui quando a proporção relativa de blocos de PEO aumenta. A taxa de dissolução também diminui quando a massa molar dos copolímeros aumenta para grupos de copolímeros com a mesma razão de composição de PPO/PEO. A tentativa de correlacionar as propriedades de emulsificação com a razão PPO/PEO e a massa molar de PPO não alcançou grande êxito. Copolímeros com blocos de PPO de alta massa molar são, geralmente, melhores emulsificantes do que aqueles com massa molar mais baixa **(61,62)**.

O PEO é o grupo polar mais comum encontrado em micelas de copolímeros blocos em meio aquoso, juntamente com variedade de outros grupos apolares, dentre eles podemos citar o poli(óxido de propileno) PPO. O poli(óxido de etileno) (PEO) é altamente solúvel em água e sua forte hidratação é devido a um ajuste muito favorável dos monômeros da óxido de etileno dentro da estrutura da água. Uma característica importante das soluções de PEO é que a hidratação das unidades de EO é fortemente dependente da temperatura. Como consequência, a solubilidade do PEO em água (e também dos copolímeros) pode ser ajustada pela variação de temperatura, providenciando uma maneira alternativa (além da variação na concentração) para variar sua auto-agregação **(62)**.

A temperatura é um importante parâmetro quando se utilizam os copolímeros blocos como um dos polímeros formadores de fases. Um aumento da temperatura causa um aumento na hidrofobicidade de diferentes blocos que promovem a auto-agregação da cadeia de polímeros em estruturas micelares consistindo de um centro dominado de unidades PPO e cercado por cadeias de PEO hidratadas. A temperatura à qual os primeiros “unimers” tornam-se auto-agregados é denominada temperatura micelar crítica (TMC). A mesma auto-agregação ocorrerá, se a concentração for aumentada até um certo grau (a temperatura constante), que é denominada concentração micelar crítica (CMC). Pode-se concluir que, alterando a temperatura, ocorre uma redistribuição de água de uma fase para outra e isto pode nos possibilitar um meio para separarmos diferentes biomoléculas devido à sua diferença de hidrofobicidade.

O aumento no interesse pelos copolímeros blocos originam-se principalmente de suas propriedades únicas de solução e associativas como consequência de sua estrutura molecular. Em particular, suas características de superfície ativa e auto-associativa leva a sistemas micelares, que estão diretamente ligados aos diferentes blocos que formam sua arquitetura molecular. Qualquer molécula assume uma conformação em solução, que é dirigida pelo balanço entre as forças de interação dos segmentos do polímero entre si e com as moléculas do solvente. Este balanço é, genericamente, referido a qualidade do solvente. O tamanho da macromolécula também determina um importante papel na definição de sua conformação de solução, devido a sua contribuição de entropia configuracional, que geralmente é calculada pela análise de rede. Para um copolímero bloco, este balanço torna-se ainda mais complexo, pois, inclui a contribuição de interação de dois blocos sendo construídos. Quando os copolímeros bloco do tipo A-B ou A-B-A são dissolvidos em um líquido de forma que tenham interações envolvendo um solvente que é termodinamicamente bom para um dos blocos, mas precipitante para outros — esta situação representa o que se denomina um solvente seletivo, sendo seletivo para um dos blocos cuja solvatação é mais intensa —, a cadeia de copolímeros pode associar-se, reversivelmente, para formar agregados micelares que são parecidos, na maioria dos aspectos àqueles obtidos com surfactantes de baixa massa molar **(60-62,67)**. Em geral, a micelização dos copolímeros blocos, como no caso de surfactantes clássicos, obedece ao modelo de associação fechada (closed association model), que assume um equilíbrio entre copolímeros molecularmente dispersos (unimers) e agregados multimoleculares (micelas). Alguns trabalhos têm sido feitos no intuito de estudar o efeito da arquitetura molecular sobre a formação das micelas e das forças motrizes do processo de micelização de alguns Pluronicos. Isto é feito através de medidas de solubilização “dye” de copolímeros na extensão de massas molares (2900–14600 g/mol) e a diferentes razões de PPO/PEO **(68)**. Finalmente, faz-se necessário uma breve descrição das proteínas que foram particionadas nos sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros blocos, fosfato de potássio (mono e dibásico) e água, em pH 7 e diferentes temperaturas (10, 25, 40 °C).

A beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) é a proteína do soro do queijo mais abundante, estando presente em concentrações de 2 a 4 g L<sup>-1</sup>, o que representa cerca de 50% das proteínas totais do soro. Ela consiste de 162 resíduos de aminoácidos e uma massa molar de 18300 g/mol. Pode ser encontrada nas formas A e B. A seqüência de aminoácidos das formas A e B diferem em dois locais: Asp (64) e Val (118) são substituídas por resíduos de Gly e Ala, respectivamente. A  $\beta$ -Lg é sensível à temperatura e ao pH, desnaturando reversivelmente em temperaturas abaixo de 65 °C, com extensa mudança conformacional. Entre pH 5,2–7,5 existe como dímero, enquanto entre 3,5–5,2, polimeriza-se como um octômero e abaixo de 3,5, ou acima de 7,5, dissocia-se nos monômeros correspondentes **(20)**.

A albumina de soro bovino (BSA) está presente no leite de vaca em cerca de 0,1 a 0,4 g L<sup>-1</sup>. Ela consiste de 582 resíduos de aminoácidos e tem massa molar de 69000 g/mol. BSA é solúvel em até 35% a 3 °C em água destilada, mas sofre extensiva precipitação na faixa de temperatura de 40 a 45°C. Esta reduzida solubilidade, em temperaturas elevadas, está em confronto com seu desdobramento parcial, observado entre 42 e 50 °C. A molécula de BSA sofre desnaturação ácida em pH 4, que é atribuída à repulsão mútua de resíduos de aminoácidos positivamente carregados ao longo cadeia polipeptídica. A molécula de BSA é mais compacta na região C-terminal do que na região N-terminal. Esses diferentes domínios são diferentes em hidrofobicidade e carga líquida **(20)**.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) SMITH, J.M., VAN NESS, H.C., ABBOT, M.M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química. Rio de Janeiro.** Livros Técnicos e Científicos Editora. 5ª edição. 2000.
- (2) ALBERTSSON, P-A. **Partitioning of cell particles and macromolecules.** 2<sup>nd</sup> ed. Ed. John Wiley, New York, 1986.
- (3) SILVA, L.H.M. **Uso da calorimetria em estudos físico-químicos de processos responsáveis pela formação de sistemas líquidos bifásicos contendo poli(óxido de etileno).** Tese de doutorado, Campinas, SP, 2001.
- (4) HAGHTALAB, A., MOKHTARANI, B., MAURER, G. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.48, p. 1170-1177, 2003.
- (5) KEPKA, C., RHODIN, J., LEMMENS, R., TJERNELD, F., GUSTAVSSON, P.-E. **Journal Chromatography A**, v 1024, p.95-104, 2004.
- (6) REH, G., NERLI, B., PICÓ, G. **Journal Chromatography B**, v 780, p.389-396, 2002.
- (7) TUBIO, G., NERLI, B., PICÓ, G. **Journal Chromatography B**, v 799, p.293-301, 2004.
- (8) BASKIR, J.N; HATTON, T. A; SUTE, U. W. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 541-558, 1989.
- (9) BEIJERINK, M. W. **Zbl. Bakt.** 2, v. 627, p. 698, 1896.
- (10) BEIJERINK, M. W. **Kolloid-Z.** v. 7, p.16, 1910.
- (11) OSTWALD, W., HERTEL, R. H. **Kolloid-Z.** 2. v. 47, p. 258, 1929.
- (12) OSTWALD, W., HERTEL, R. H. **Kolloid-Z.** 2. v. 47, p. 357, 1929.
- (13) WALTER, H.; BROOKS, D.; FISHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses and applications to biotechnology.** United Kingdom Edition. London: Academic Press Inc. Ltda.,1985.
- (14) DOBRY, A., BOYER-KAWENOKI, F. **Journal of Polymer Science**, v. 2, p. 90-100. 1947.
- (15) KULA, M-R. **Bioseparation**, v.1, p.181-189, 1990.
- (16) ROGERS, R.D, WILLAUER, H.D., GRIFFIN, S.T., HUDDLESTON, J.G. **Journal Chromatography B**, v 711, p.255-263, 1998.
- (17) ROGERS, R.D., GRIFFIN, S.T. **Journal Chromatography B**, v.711, p.277-283, 1998.

- (18) SHIBUKAWA, M., NAKAYAMA, N., HAYASHI, T., SHIBUYA, D., ENDO, Y., KAWAMURA, S. **Analytica Chimica Acta**, v.427, p.293-300, 2001.
- (19) BEM-HASSAN, R. M., GHALY, A. E. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.47, p. 89-105, 1994.
- (20) MOOR, C. V., HA, Y. W. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- (21) ZUÑIGA, A. D. G., **Sistemas aquosos polietilenoglicol-sal: separação de a-lactoalbumina e b-lactoglobulina do soro do queijo e hidrodinâmica em um extrator Graesser**. Tese de mestrado, Viçosa, MG, 2000.
- (22) CHEN, J.P. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.73, n.2, p.140-147, 1992.
- (23) COIMBRA, J.R., THÖMMES, J., KULA, M.-R. **Journal of Chromatography A**, v.668, p.85-94, 1994.
- (24) ALVES, J.G.L.F., CHUMPITAZ, L.D.A., SILVA, L.H.M., FRANCO, T. T., MEIRELLES, A. J. A. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.235-239, 2000.
- (25) SILVA, L.H.M., MEIRELLES, A. J. A. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p.279-282, 2000.
- (26) SILVA, L.H.M., **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: polímero/polímero e polímero/sal**. Tese de doutorado, Campinas, SP, 2000.
- (27) ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning. Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**. Marcel Dekker Inc, New York, 1995.
- (28) JOHANSSON, H.-O., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F., HAYNES, C. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.3-17, 1998.
- (29) ZASLAVSKY, B. Y. **Analytical Chemistry**, v.64, n.15, 765-773, 1992.
- (30) DIAMOND, A. D., HSU, J. T. **Biotechnology and Bioengineering**, n.34, p.1000-1014, 1989.
- (31) GROßMANN, C., MAURER, G. **Fluid Phase Equilibria**, v.106, p.17-25, 1995.
- (32) KABIRI-BADR, M., CABEZAS, H. Jr. **Fluid Phase Equilibria**, v.115, p. 39-48, 1996.
- (33) GROßMANN, C., TINTINGER, R., ZHU, J., MAURER, G. **Fluid Phase Equilibria**, v.137, p.209-228, 1997.
- (34) CABEZAS, H. Jr., **Journal of Chromatography B**, v.680, p.3-30, 1996.

- (35) LI, M., ZHU, Z.-Q., WU, Y.-T., LIN, D.-Q. **Chemical Engineering Science**, v.53, n.15, p.2755-2767, 1998.
- (36) GUSTAFSSON, A., WENNERSTRÖM, H., TJERNELD, F. **Polymer**, v.27, p.1768-1770, 1986.
- (37) KANG, C. H., SANDLER, S.I. **Fluid Phase Equilibria**, v.38, p.245-272, 1987.
- (38) KABIRI-BADR, M., CABEZAS, H. Jr. **Fluid Phase Equilibria**, v.115, p.39-58, 1996.
- (39) SILVA, L.H.M., LOH, W. **Journal Physical Chemistry B**, v.104, p.10069-10073, 2000.
- (40) SVENSSON, M., JOABSSON, F., LINSE, P., TJERNELD, F. **Journal Chromatography A**, v.761, p.91-101, 1997.
- (41) SIMONET, F., GARNIER, C., DOUBLIER, J.-L. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.591-600, 2000.
- (42) SARUBBO, L.A., OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L.F., DUARTE, H.S., CARNEIRO-LEÃO, A.M.A., LIMA-FILHO, J.L., CAMPOS-TAKAKI, G.M., TAMBOURGI, E.B. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.79-84, 2000.
- (43) LI, M., ZHU, Z. Q., MEI, L.H. Liquid-liquid equilibria for hydroxypropil starch + poly(ethylene glycol) + water at 25°C. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.41, p.500-503, 1996.
- (44) SILVA, L.H.M., MEIRELLES, A. J. A. **Carbohydrate Polymers**, v.46, p.267-274, 2001.
- (45) HATTI-KAUL, R. **Molecular Biotechnology**, v.19, p.269-277, 2001.
- (46) LI, M., WANG, Y.-X., ZHU, Z.-Q. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.43, p.93-96, 1998.
- (47) FILHO, E.S.M., COIMBRA, J.S.R., MINIM, L.A., da SILVA, L.H.M., MEIRELLES, A.J.A. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.47, p.1346-1350, 2002.
- (48) JÖNSSON, M., JOHANSSON, H.-O. **Journal of Chromatography A**, v.983, p.133-144, 2003.
- (49) COLLÉN, A., PERSSON, J., LINDER, M., NAKARI-SETÄLÄ, T., PENTILLÄ, M., TJERNELD, F., SIVARS, U. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1569, p.139-150, 2002.
- (50) PERSSON, J., KAUL, A., TJERNELD, F. **Journal of Chromatography A**, v.743, p.115-126, 2000.

- (51) PERSSON, J., JOHANSSON, H.-O., TJERNELD, F. **Journal of Chromatography A**, v.864, p.31-48, 1999.
- (52) SVENSSON, M., BERGGREN, K., VEIDE, A., TJERNELD, F. **Journal of Chromatography A**, v.839, p.71-83, 1999.
- (53) PERSSON, J., NYSTRÖM, L., AGELAND, H., TJERNELD, F. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.97-109, 1998.
- (54) BERGGREN, K., JOHANSSON, H.-O., TJERNELD, F. **Journal of Chromatography A**, v.718, p.67-79, 1995.
- (55) ALRED, P.A., KOZLOWSKI, A., HARRIS, M., TJERNELD, F. **Journal of Chromatography A**, v.659, p.289-298, 1994.
- (56) GALAEV, I.Y., MATTIASSON, B. **Enzyme Microb. Technol.** v. 15, p.354-366, 1993.
- (57) CAMPESE, G.M., RODRIGUES, E.M.G., TAMBOURGI, E.B., PESSOA Jr, A. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.20, n.3, 2003.
- (58) PERSSON, J., JOHANSSON, H.-O., GALAEV, I., MATTIASSON, B., TJERNELD, F. **Bioseparation** 9, p.105-116, 2000.
- (59) JOHANSSON, H.-O., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F. **Macromolecules**, v.26, p.4478-4483, 1993.
- (60) RIESS, G. Micellization of block copolymers. **Progress in Polymer Science**, v.28, p.1107-1170, 2003.
- (61) ALEXANDRIDIS, P., HATTON, T.A. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.96, p.1-46, 1995.
- (62) LOH, W. **Block copolymer micelles**. Encyclopedia of Colloid and Surface Science. A. Hubbard (Ed.).Marcel Dekker, 2001.
- (63) ELIAS, H.-G. **Macromolecules**. Plenum Press, New York, 1984.
- (64) AHMED, F., ALEXANDRIDIS, P., NEELAMEGHAM, S. **Langmuir**. v 17, n.2, p.537-546, 2001
- (65) SILVA, L.H.M., MEIRELLES, A. J. A. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.46, p.251-255, 2001.
- (66) RODRIGUES, L. R.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. **Biotechnology Letters**, v.23, p. 1893-1897, 2001.
- (67) FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. Ed. Cornell University Press. Ithaca and London, 6<sup>th</sup>, 1953.

(68) ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J. F.; HATTON, T. A. **Macromolecules**, v. 27, p. 2414-2425, 1994.

(69) FARRUGGIA, B., NERLI, B., PICÓ, G. **Journal of Chromatography B**, v.798, p.25-33, 2003.

## **CAPÍTULO 2**

### **PHASE EQUILIBRIUM OF BLOCK COPOLYMER + POTASSIUM PHOSPHATE + WATER SYSTEMS AT VARIOUS TEMPERATURES.**

#### **ABSTRACT**

This work presents data on phase equilibrium of aqueous two-phase systems composed by L35 + potassium phosphate and F68 + potassium phosphate. It was studied the effect of changes in temperature (10 °C, 25 °C, and 40 °C) and copolymer molar mass on the equilibrium data. The influence of temperature variation is more intense on the tie line slope than in the binodal position and this effect was higher for L35 than F68. The molar mass influence upon the behavior of the phase diagrams for both copolymers was compensated by the effects associated to the hydrophobicity of the macromolecules. It was also studied the influence of changes in salt pH (7 and 12) on the phase equilibrium of the systems L35 + potassium phosphate + water and L35 + potassium phosphate/potassium hydroxide + water systems. As pH was increased, the binodal curve shifted to higher copolymer and phosphate concentrations that corresponds to a decrease in the region of two-phase coexistence.

## 2.1.INTRODUCTION

Aqueous two-phase systems (ATPS) has been used thoroughly for separation and purification of macromolecules and cell particles.<sup>1-3</sup> The ATPS are able to promote the partitioning of one macromolecule between two phases of a system formed by mixtures of either two polymers or one polymer and salt. The first case get as main example the system poly(ethylene glycol) (PEG) + dextran + water. In the second case the main example is PEG + potassium phosphate + water systems. In spite of the second case to present some advantages such as low cost, low viscosity, and a short time for phase splitting compared to polymer – polymer – water the two systems present difficulty in separate target biomolecules from the polymer solutions.<sup>4-6</sup> Lately, a lot of work has been made using ATPS with thermoseparating polymers. These polymers are readily recovered from solution as it undergoes phase separation by a moderate change in temperature. If the polymer can be removed easily and recycled without the use of expensive methods as ultrafiltration and chromatography they constitute one low cost systems for biomolecules separations.<sup>6-8</sup> PEG is a thermoseparating polymers, but its cloud point, i.e, the temperature at which phase separation stars, is too high (above 100 °C) for separation of biomolecules.<sup>9,10</sup> The EOPO block copolymer is also a thermoseparating polymer and have lower cloud points. They have been used in two-stage separation systems allowing quantitative recovery of the protein and polymer after thermoseparating step.<sup>9</sup>

These block copolymers has been used to form ATPS with the objective of decrease costs of process, to offer a easy alternative to remove and recycle polymers, and to partitioning hydrophobic amino acids and others biomolecules of hydrophilic and hydrophobic nature.<sup>11-13</sup> Work as the separation of proteins using block copolymers was accomplished with the purpose of investigate how the hydrophobicity of the thermoseparating polymer affects the partitioning, and how the effects could be correlated to the surface hydrophobicity of the proteins.<sup>14</sup> These works exploited the applicability of ATPS formed for block copolymers motivating the determination of phase diagram that can be used in design and modeling of separation process.<sup>5</sup>

In this work was investigate the behavior of new ATPS formed for EOPO (50% EO) (L35) + salt + water and EOPO (80% EO) (F68) + salt + water. We present diagram phase at 10, 25 and 40 °C, in pH 7 for the EOPO (50% EO) L35 + salt + water and EOPO (80% EO) F68 + salt + water, using block copolymer of molar mass 1900 and 8400 g/mol, respectively. The diagram phase, in pH 12, were only built at 10, 25 and 40°C for EOPO (50% EO) (L35) + salt + water system. The salts used are mixture  $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$  and  $K_2HPO_4 + KOH$ . Besides building(compose) the diagrams we will evaluate the influence of different molar mass of the macromolecules, of the temperature and of hydrophilic/hydrophobic balance in the formation of that systems.

## 2.2.MATERIALS AND METHODS

**2.2.1. Chemicals.** The reagents used were:EO50PO50 (L35, 1900 g/mol) and EO80PO20 (F68, 8400 g/mol), purchased from Aldrich (USA). The analytical grade potassium phosphate mono ( $K_2HPO_4$ ) and dibasic ( $KH_2PO_4$ ), as well as KOH, were purchased from Vetec (São Paulo, Brazil). For the potassium phosphate stock solutions, the Henderson–Hasselbach equation was used to determine the ratio, in mass, of mono and dibasic salts necessary to reach the pH equal to 7 and dibasic potassium phosphate and potassium hydroxide to obtain a pH equal to 12. Distilled and deionized water (millipore, USA) was used in all experiments.

**2.2.2. Aqueous Two-Phase Systems.** The biphasic systems were prepared by adding appropriate masses of the phase-forming substances such as L35 (50% EO) + potassium phosphate (pH 7) + water and F68 (80% EO) + potassium phosphate (pH 7) + water. The systems were weighted with a precision of  $\pm 0.0001$  g into test tube to obtain the mixture points. The biphasic systems L35 +  $K_2HPO_4/KOH$  (pH 12) + water were prepared by weighing appropriate quantities of the phase-forming substances in analytical balance, at 25 and 40°C. The biphasic system, at 10°C, were prepared from stock solutions of L35 85 % and of  $K_2HPO_4/KOH$  75 % mass. Quantities of these solutions and water were weighted into a test tube to give the desired initial overall compositions. This

procedure was adopted due to the difficulty to dissolve the pure reagents in distilled and/or deionized water. The total mass was of 30 g. The systems, at pH 7, were vigorously mixed to become turbid and then put in rest until the formation of two clear and transparent phases. After that, the tubes were placed in a water bath at  $(10 \pm 0.05) ^\circ\text{C}$ ,  $(25 \pm 0.05) ^\circ\text{C}$  or  $(40 \pm 0.05) ^\circ\text{C}$  for 24 h, waiting for proper phase equilibration and separation, as indicated by the absence of turbidity in both top and bottom phases.<sup>15</sup> At pH 12, L35 +  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KOH}$  + water were mixed vigorously and then centrifuged at  $2900 \times g$  for 40 min aiming to accelerate the phase separation. Then the tubes were placed in a water bath at  $(10 \pm 0.05) ^\circ\text{C}$ ,  $(25 \pm 0.05) ^\circ\text{C}$  or  $(40 \pm 0.05) ^\circ\text{C}$  for 24 h to reach the equilibrium state characterized by a well-defined interface and a clean and transparent bottom and top phases.<sup>16,17</sup> After then, samples of the top and bottom phases were collected, with the aid of syringes and needles. The top phase was carefully sampled first, with care being taken to leave a layer of solution at least 0.5 cm thick above the interface. Samples of the bottom phase were withdrawn using a syringe with a long needle. A tiny bubble of air was retained on the needle tip and expelled once in the bottom phase to prevent contamination from top phase phase, with special attention given for not disturbing the equilibrium systems in the subsequent analysis.

**2.2.3. Phase Diagram Determination.** The concentration of salt was determined using simultaneously two methods: (i) at pH 7, phosphate was determined by spectrophotometry (Cary 50, Varian), as described by Silva and Queiroz<sup>18</sup> and Fiske and Subbarow<sup>19</sup> The standard deviation of the salt mass in our experiments was  $\pm 0.08\%$ , (ii) at pH 12, was quantified by flame photometry, as described by Zafarani–Moattar et al.<sup>20,21</sup> The standard deviation of the salt mass was  $\pm 0.12\%$ . The concentration of block copolymers (L35 and F68) in both phases was determined by refractive index measurements at 298.15 K using a refractometer (Abbe, Analytikjena).<sup>22,23</sup> The temperature was controlled using water bath (Thermo Haake C10–B3 with an uncertainty of  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ). The standard deviation of the block copolymer mass was  $\pm 0.03\%$ . The concentration of water was determined by freeze–drying (Speed Vacuum Concentration HETO, model VR–1) for 24 h.<sup>24</sup> The standard deviation of the water mass was  $\pm 0.06\%$ . All measures were conducted in triplicate.

## 2.3.RESULTS AND DISCUSSION

The phase compositions for the systems studied are given in Tables 1 and 2. All concentrations are expressed in mass percent. For each copolymer/salt combination four tie lines were determined. The tie lines were determined by linear regression of each corresponding set of overall, bottom phase, and top phase concentrations.

Table 1. Phase Compositions (% mass) for L35 + phosphate potassium/potassium hydroxide + water systems, at pH 12, and various temperatures

| System    | Overall composition |         |         | Upper phase |        |         | Lower phase |         |         |
|-----------|---------------------|---------|---------|-------------|--------|---------|-------------|---------|---------|
|           | polymer             | salt    | water   | polymer     | salt   | water   | Polymer     | salt    | water   |
| L35(10°C) | 28.6876             | 25.1436 | 46.1688 | 56.9856     | 0.5484 | 42.4660 | 5.9636      | 42.9069 | 51.1295 |
|           | 34.0226             | 28.6240 | 37.3533 | 66.0069     | 0.1340 | 33.8591 | 3.6518      | 55.9767 | 40.3715 |
|           | 38.9503             | 32.6033 | 28.4464 | 70.5995     | 0.2702 | 29.1303 | 2.8571      | 65.0904 | 32.0525 |
|           | 42.6542             | 36.7642 | 20.5816 | 79.3018     | 0.3447 | 20.3535 | 1.8810      | 78.5111 | 19.6079 |
| L35(25°C) | 24.0402             | 16.3356 | 59.6241 | 63.2202     | 0.2380 | 36.5418 | 4.4302      | 24.4403 | 71.1295 |
|           | 28.8116             | 20.2779 | 50,9105 | 71.1523     | 0.2579 | 28,5898 | 4.1660      | 32.7821 | 63.0519 |
|           | 34.1444             | 22.8608 | 42,9948 | 80.0999     | 0.0885 | 19,8116 | 2.3865      | 38.5343 | 57.0792 |
|           | 38.9708             | 25.9411 | 35.0882 | 85.8597     | 0.0298 | 14.1105 | 0.8751      | 46.7005 | 52.4244 |
| L35(40°C) | 28.8925             | 14.0307 | 57.0768 | 68.6201     | 0.3485 | 31.0314 | 2.5243      | 23.2527 | 74.2230 |
|           | 32.0484             | 16.9155 | 51.0361 | 72.6859     | 0.2457 | 27.0684 | 1.0969      | 29.9319 | 68,9712 |
|           | 37.3801             | 18.794  | 43.8259 | 78.599      | 0.1725 | 21.2285 | 2.5528      | 35.5263 | 61.9209 |
|           | 42.6507             | 20.9195 | 36.4297 | 86.7204     | 0.0423 | 13.2373 | 1.3061      | 40.2263 | 58.4676 |

The effect of temperature(10° C and 40° C) on the phase diagram of the L35 + potassium phosphate + water system is illustrated in Figure 1.

Table 2. Phase compositions (% mass) for block copolymer + potassium phosphate + water systems, at pH 7 and different temperatures

| System    | Overall composition |         |         | Upper Phase |        |         | Lower phase |         |         |
|-----------|---------------------|---------|---------|-------------|--------|---------|-------------|---------|---------|
|           | polymer             | salt    | water   | polymer     | salt   | water   | polymer     | salt    | water   |
| L35(10°C) | 13.1107             | 9.9865  | 76.9028 | 30.4132     | 0.4600 | 69.9439 | 5.0432      | 12.7942 | 82.2582 |
|           | 18.3608             | 14.0023 | 67.6369 | 40.1026     | 0.0107 | 60.2259 | 4.3526      | 21.5135 | 74.1822 |
|           | 22.9983             | 16.9922 | 60.0095 | 52.1383     | 0.0096 | 46.2581 | 4.5458      | 28.9326 | 65.9619 |
|           | 28.2200             | 20.9992 | 50.7808 | 64.2381     | 0.0097 | 35.8225 | 4.7663      | 35.4646 | 59.9415 |
| L35(25°C) | 12.7843             | 8.8251  | 78.3906 | 34.9713     | 0.0246 | 65.5218 | 2.5986      | 11.7656 | 85.2515 |
|           | 17.1523             | 11.9805 | 70.8672 | 48.5415     | 0.0160 | 51.4542 | 2.7386      | 15.6633 | 78.7314 |
|           | 20.0737             | 14.9217 | 65.0046 | 56.6481     | 0.0109 | 43.3824 | 2.7089      | 21.9847 | 74.5978 |
|           | 24.0126             | 16.9580 | 59.0294 | 62.9958     | 0.0136 | 36.3473 | 3.0368      | 24.1015 | 72.6801 |
| L35(40°C) | 21.0709             | 4.9905  | 73.9386 | 32.2495     | 0.1703 | 68.2108 | 3.1203      | 8.8611  | 88.2812 |
|           | 30.1547             | 6.9876  | 62.8577 | 53.0970     | 0.0079 | 46.9302 | 1.6362      | 15.3479 | 83.0099 |
|           | 38.0281             | 8.7697  | 53.2022 | 63.8166     | 0.0146 | 36.4549 | 2.1009      | 20.4689 | 77.3549 |
|           | 47.0575             | 10.9852 | 41.9573 | 72.7700     | 0.0198 | 27.4544 | 2.7051      | 29.6143 | 67.4347 |
| F68(10°C) | 14.2518             | 7.9800  | 77.7382 | 22.7754     | 1.7661 | 75.2538 | 1.6385      | 12.8629 | 85.5899 |
|           | 17.0207             | 9.9785  | 73.0008 | 32.6865     | 0.7189 | 66.5923 | 2.5664      | 16.9785 | 80.5161 |
|           | 20.1225             | 10.9878 | 68.8897 | 37.8171     | 0.8006 | 61.7508 | 3.0379      | 18.6082 | 77.2114 |
|           | 21.8919             | 12.7866 | 65.3215 | 41.7614     | 1.0562 | 57.1795 | 4.0960      | 21.6008 | 74.3068 |
| F68(25°C) | 14.0232             | 6.9979  | 78.9792 | 28.4791     | 0.2852 | 72.7217 | 3.5260      | 9.1983  | 87.5623 |
|           | 17.0209             | 7.9904  | 74.9887 | 34.0769     | 0.1735 | 65.9687 | 2.3259      | 12.5099 | 85.5430 |
|           | 18.9899             | 8.9798  | 72.0303 | 37.3035     | 0.4854 | 62.0852 | 2.5964      | 15.2859 | 82.2801 |
|           | 22.0718             | 10.9949 | 66.9333 | 41.0256     | 1.5693 | 57.2821 | 2.5409      | 18.9876 | 78.1407 |
| F68(40°C) | 12.9950             | 5.9984  | 81.0066 | 25.1124     | 0.5386 | 74.5274 | 3.0583      | 8.3985  | 88.0350 |
|           | 15.9896             | 7.9926  | 76.0178 | 35.5305     | 0.0403 | 63.7534 | 2.1129      | 11.9896 | 86.0649 |
|           | 18.9955             | 8.9896  | 72.0149 | 39.0412     | 0.0557 | 61.4568 | 1.9157      | 13.4362 | 83.9496 |
|           | 20.9324             | 9.9669  | 69.1007 | 42.8257     | 0.0474 | 57.5491 | 2.3712      | 16.3934 | 81.0663 |

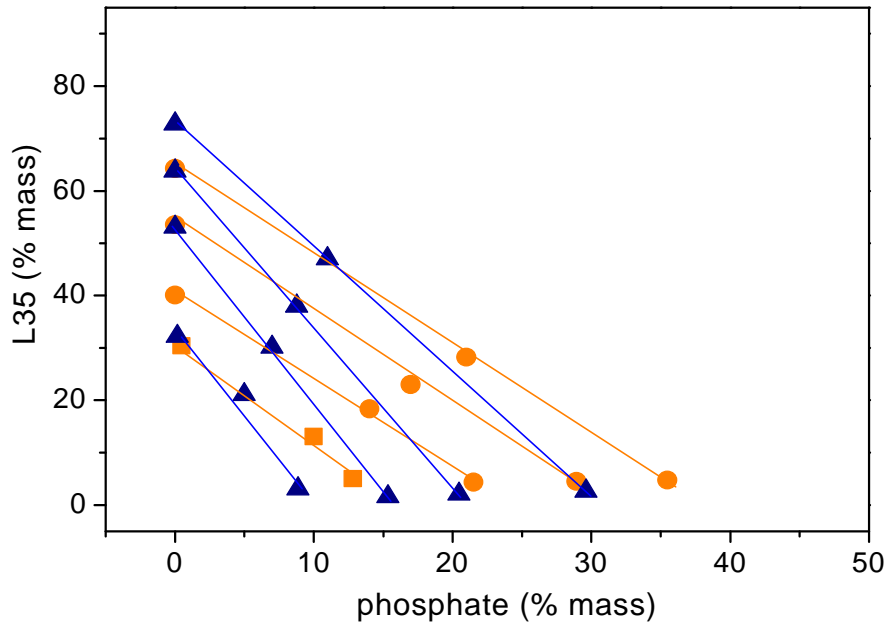


Figure 1. Temperature effect on the phase diagrams for the L35 + potassium phosphate + water system at pH 7, (●) 10 °C and (▲) 40 °C.

An alteration in the biphasic area is not observed when the temperature was varied from 10 °C to 40 °C. However, at 10 °C in the inferior part of the curve, the points shift to higher L35 concentration reducing the two-phase area, although the difference is very small. The increase of the temperature of 10 for 40 °C cause leads to a considerable change in the tie line slope (STL), that is less pronounced when the temperature use from 25 to 40 °C (Figure 2).

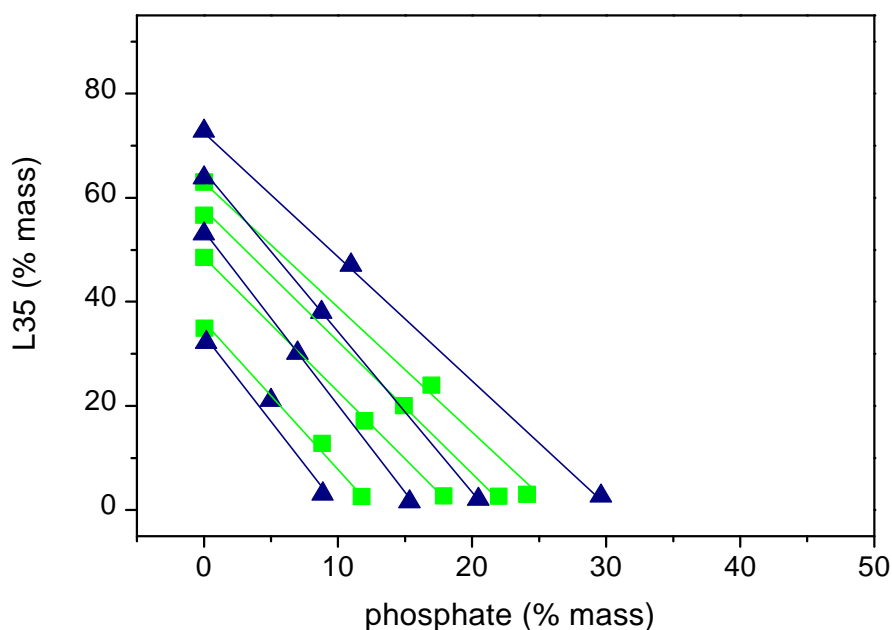


Figure 2. Temperature effect on the phase diagrams for the L35 + potassium phosphate + water system at pH 7, (■) 25 °C and (▲) 40 °C.

The tie line slope (STL) is defined as the ratio  $STL = (\Delta\text{polymer}/\Delta\text{salt})$  in which the concentrations difference of a given polymer ( $\Delta\text{polymer}$ ) and a salt ( $\Delta\text{salt}$ ) in the two coexisting phases. The STL values reported for PEO-salt are usually constant for systems in the same thermodynamic conditions, in other words, the tie lines are parallel.<sup>2</sup> But in, Table 3 the STL values for L35-phosphate systems are not constant, contradicting, as previously emphasized, for traditional ATPS. The tie line slope (STL) practically doesn't change, at 25 and 40°C. However, at 10° C a small variation STL is observed. A small variation in STL, at different temperatures, was also observed for by F68 - Dextrana T500 systems.<sup>25</sup>

Table 3. STL values for L35 – phosphate systems at 10° C, 25° C, and 40 °C

| tie line | L35    |        |        |
|----------|--------|--------|--------|
|          | 10°C   | 25°C   | 40°C   |
| 1        | 2.0569 | 2.7572 | 3.3517 |
| 2        | 1.6626 | 2.1012 | 3.3547 |
| 3        | 1.6455 | 2.3637 | 3.0172 |
| 4        | 1.6774 | 2.4892 | 2.3675 |

The Figures 3 and 4 represent phase diagrams of F68–phosphate (pH 7) systems at 10, 25 and 40° C.

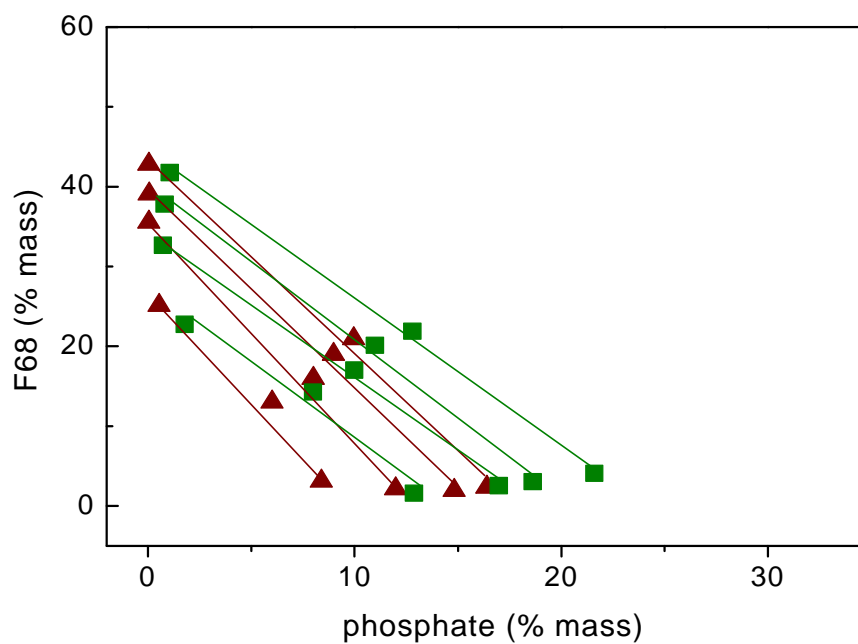


Figure 3. Temperature effect on the phase diagrams for the F68 + potassium phosphate + water system at pH 7, (■) 10 °C and (▲) 40 °C.

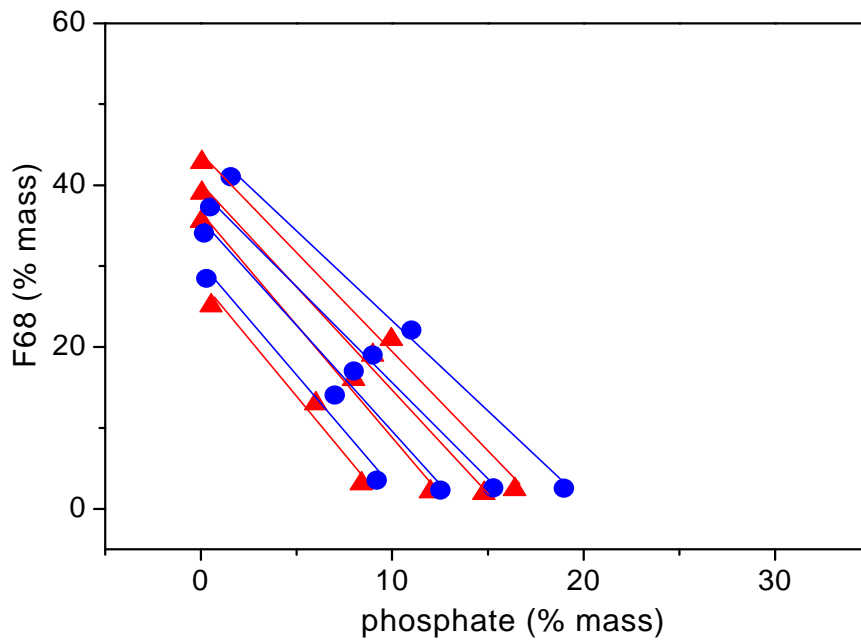


Figure 4. Temperature effect on the phase diagrams for the F68 + potassium phosphate + water system at pH 7, (●) 25 °C and (▲) 40 °C.

For this systems a small influence of temperature variation on phase diagram was observed. Therefore, when the temperature increased the change observed in the volume and in the composition of the phases are very small. Table 4 presents values of STL for F68 – phosphate systems. The temperature rise increases STL values, as observed at Table 3 for L35 – phosphate system and also for PEO-phosphate system.<sup>2,26</sup>

Table 4. STL values for F68 – phosphate systems at 10° C, 25° C, and 40 °C

| tie line | F68    |        |        |
|----------|--------|--------|--------|
|          | 10°C   | 25°C   | 40°C   |
| 1        | 1.9048 | 2.7996 | 2.8059 |
| 2        | 1.8525 | 2.5738 | 2.7966 |
| 3        | 1.9531 | 2.3450 | 2.7746 |
| 4        | 1.8333 | 2.2094 | 2.4749 |

A behavior observed as for PEO-Dextran as well as for PEO-salt indicating that as the polymer molar mass increase, the binodal curve shifts to lower copolymer and phosphate concentrations to promote the separation of phases.<sup>2,22,26</sup> According to the model of Flory-Huggins, as larger the macromolecule, consequently larger will be mass molar, minor will be the variation in the mixture entropy. This entropy of mixture is related to the number of different space distributions, that the macromolecule presents in solution. In this sense, the copolymer F68 (8400 g/mol) should induce the separation of phases more easily than L35 (1900 g/mol). Such behaviour, however, it was not observed in the present work. Figures 5, 6, and 7 represent the phase diagrams at the three temperatures studied. It is observed the overlap of the phase diagrams, independently of the temperature and mass molar. This absence of mass molar influence can be attributed to a compensation due to the hydrophobicity effect. In size terms, as observed previously, the system formed by F68 would present a larger two-phase area. However, being considered the hydrophobic influence, L35 would be the largest inductor of the separation of phases.

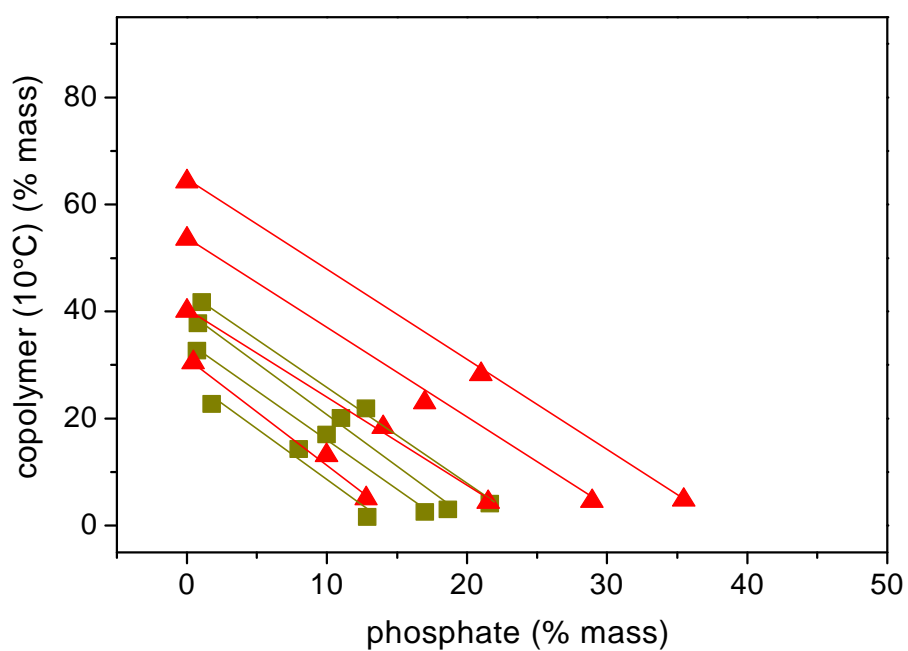


Figure 5. Phase diagrams for both copolymer molar mass, L35 1900 (▲) F68 8400 (■), at 10° C and pH 7.

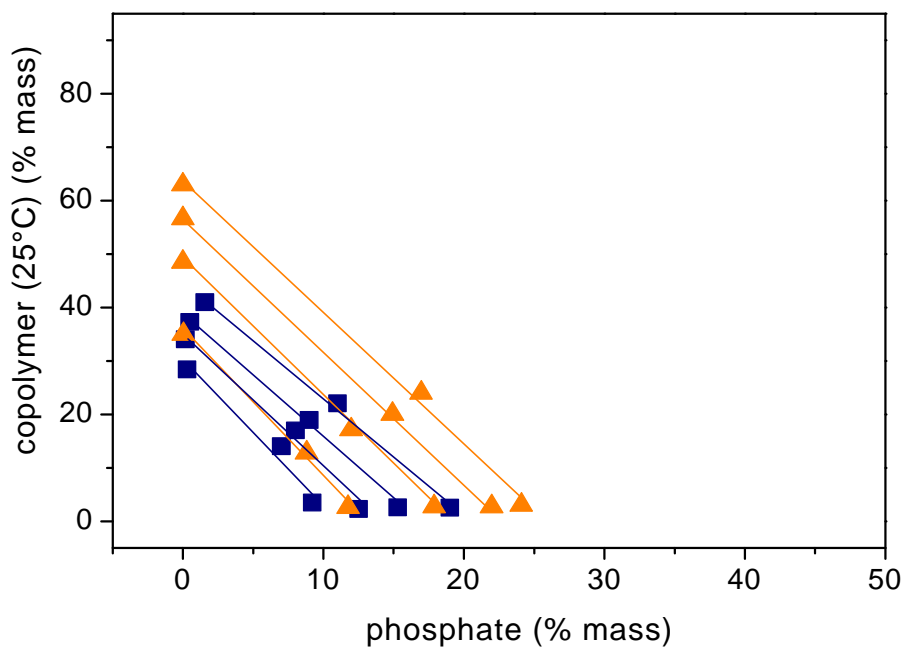


Figure 6. Phase diagrams for both copolymer molar mass: L35 1900 (▲) F68 8400 (■), at 25° C and pH 7

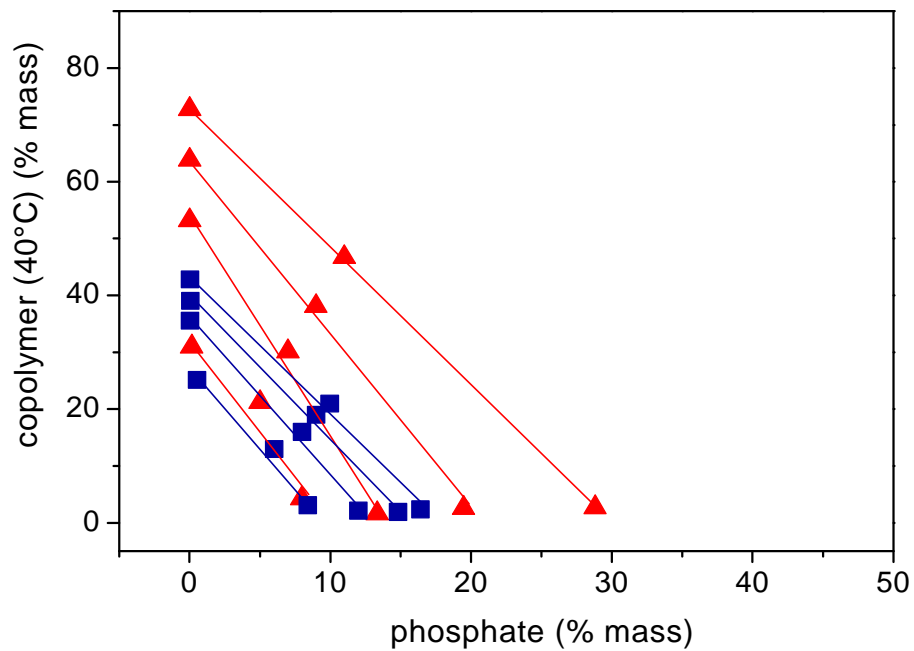


Figure 7. Phase diagrams for both copolymer molar mass, L35 1900 (▲) F68 8400 (■), at 40° C and pH 7

The phases diagrams in Figure 8, 9, and 10 shown the pH effects on phase separation at constant temperature (10, 25, and 40°C). As system becomes more basic, the binodal is shift for high copolymer and salt concentrations, thus decreasing the phase separation region. This behaviour is probably due to the presence of many OH ions to reach pH 12. The buffer used was a  $K_2HPO_4/KOH$  solution to reach pH 12 the ion phosphate was substituted for hydroxide. In the literature<sup>27</sup> is evident that the higher the valency of the anion, the lower the concentration required to form two-phase systems. In other words, as smaller the valency smaller will be the efficiency in inducing the phase separation. Thus, smaller will be the two-phase area.

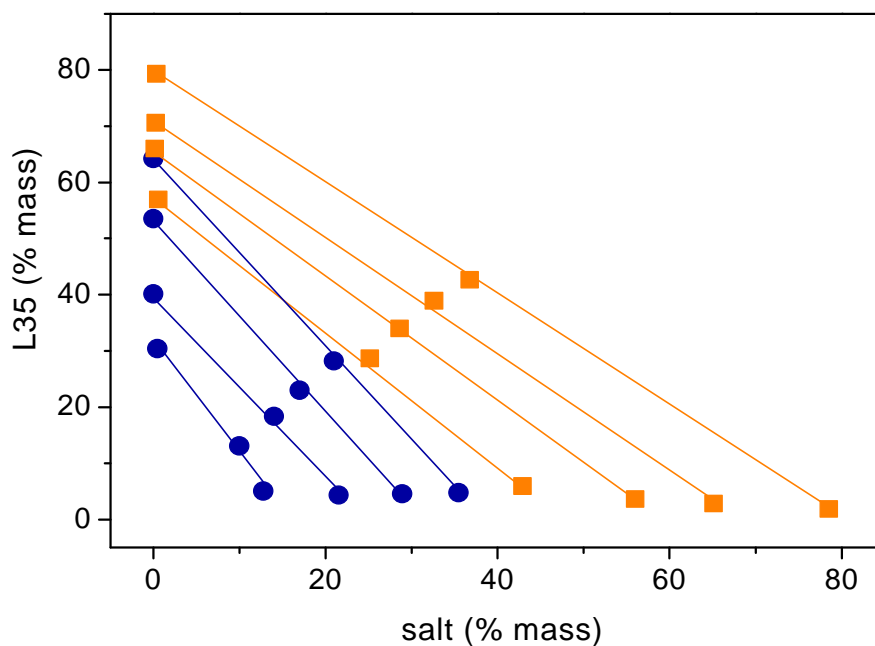


Figure 8. Phase diagrams for the copolymer + salt + water at 10° C, (●) pH 7 and (■) pH 12.

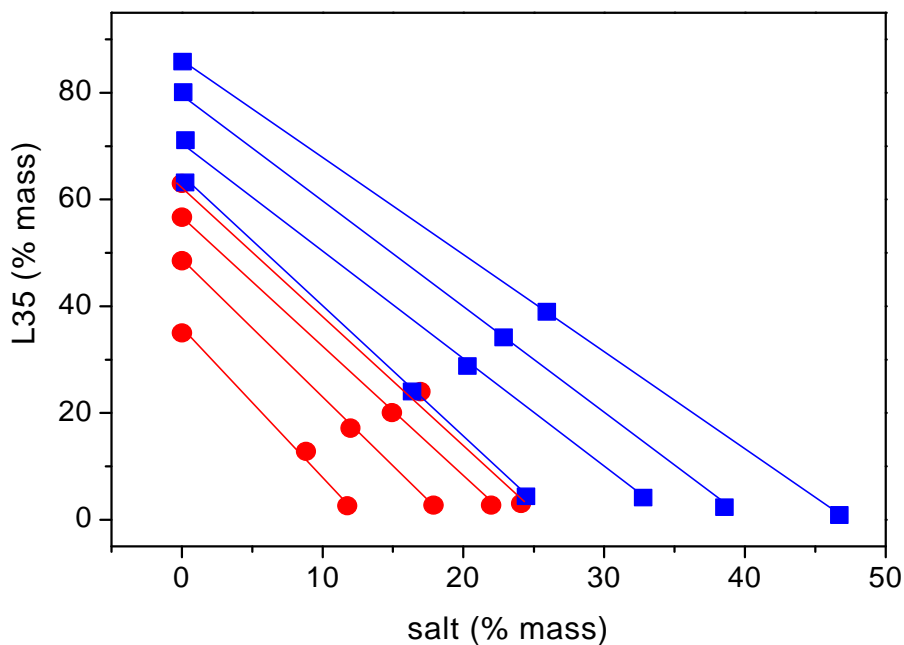


Figure 9. Phase diagrams for the copolymer + salt + water at 25° C, pH 7 (●) and pH 12 (■).

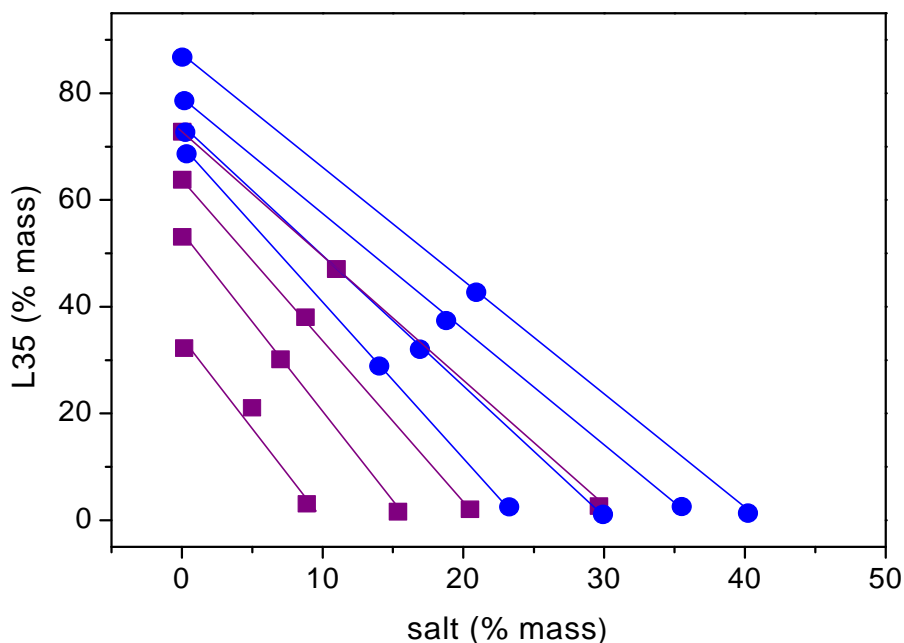


Figure 10. Phase diagrams for the copolymer + salt + water at 40 °C, (■) pH 7 and (●) pH 12.

## 2.4.CONCLUSION

The phase diagrams of L35 + potassium phosphate + water, F68 + potassium phosphate + water, and L35 + potassium phosphate/potassium hydroxide + water systems were determined. The present work studied the effects of copolymer molar mass, temperature, and pH on the equilibrium phase behaviour of block copolymer + salt systems.

These systems present top phases with low water content than for ATPS constituted by PEO. The smallest capacity of these copolymers hold water was attributed to molecular processes of aggregation in solution, forming micelles and/or gels.

The temperature effect on the equilibrium data was not significant. It should be emphasizing the entropic nature of the driving force that govern the phase separation. The copolymer ATPS present similar characteristics to PEO

ATPS, making possible, the substitution of PEO for copolymers to biomolecule separation.

Another aspect that favors such substitution is the possibility of a posterior separation of the solute from copolymer rich phase using a small temperature variation. Thus, is shown that the copolymer is an viable alternative to be used as one of the phase-forming species in ATPS.

It is important to observe the difference of phase diagrams behaviour when the pH increase of 7 to 12 using a buffer solution of potassium phosphate and potassium hydroxide when compared with buffer solutions without hydroxide ion. In other works, in the absence of anion hydroxide, it was observed an opposite behaviour.

These characteristics make block copolymers ATPS a promising, versatile, and attractive system in the field of bioseparation.

## 2.5. LITERATURE CITED

- (1) ALBERTSSON, P. A. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*; Ed. John Wiley, 2<sup>nd</sup> Ed., New York, 1971.
- (2) ZASLAVSKY, B.Y. *Aqueous Two-Phase Partitioning, Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*; Marcel Dekker: New York, 1995.
- (3) ALVES, J. G. L. F.; CHUMPITAZ, L. D. A.; SILVA, L. H. M.; FRANCO, T. T.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of Whey Proteins, Bovine Serum Albumin and Porcine Insuline in Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chromatogr. B.* **2000**, 743, 235-262.
- (4) BROOKS, D.E.; SHARP, K.A; FISHER, D. Theoretical Aspects of Partitioning. In *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology*; Walter, H., Brooks, D.E., Fisher, D., Eds.; Academic Press: London, 1985; pp-11-84.
- (5) LI, M.; WANG, Y.-X.; ZHU, Z.-Q. Liquid – Liquid Equilibria for Random Copolymer of Ethylene Oxide + Propylene Oxide + Salt + Water. *J. Chem. Eng. Data.* **1998**, 43, 93–96.
- (6) SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning. *J. Chem. Eng. Data.* **2001**, 46, 251–255.
- (7) HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems. A general overview. *Molecular Biotechnology.* **2001**, 19, 269–277.
- (8) PERSSON, J.; KAUL, A.; TJERNELD, F. Polymer Recycling in Aqueous Two-Phase Extractions Using Thermoseparating Ethylene Oxide–Propylene Oxide Copolymers. *J. Chromatogr B.* **2000**, 743, 115–126.
- (9) PERSSON, J.; JOHANSSON, H.-O.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B.; TJERNELD, F. Aqueous Polymer Two-Phase Systems Formed by New Thermoseparating Polymers. *Bioseparation.* **2000**, 9, 105–116.
- (10) CAMPESE, G. M.; RODRIGUES, E. M. G.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA Jr, A. Determination of Cloud–Point Temperatures for Different Copolymers. *Braz. J. Chem. Eng.* **2003**, 20(3).

- (11) ALRED, P. A.; KOSLOWSKI, A.; HARRIS, J. M.; TJERNELD, F. Application of Temperature-Induced Phase Partitioning at Ambient Temperature for Enzyme Purification. *J. Chromatogr A*. **1994**, 659, 289–298.
- (12) SVENSSON, M.; JOABSSON, F.; LINSE, P.; TJERNELD, F. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. *J. Chromatogr A*. **1997**, 761, 91–101.
- (13) SVENSSON, M.; BERGGREN, K.; VEIDE, A.; TJERNELD, F. Aqueous Two-Phase Systems Containing Self-Associating Block Copolymers. Partitioning of Hydrophilic and Hydrophobic Biomolecules. *J. Chromatogr A*. **1999**, 839, 71–83.
- (14) BERGGREN, K.; JOHANSSON, H.-O.; TJERNELD, F. Effects of Salts and Surface Hydrophobicity of Proteins on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems Containing Thermoseparating Ethylene Oxide-Propylene Oxide Copolymers. *J. Chromatogr A*. **1995**, 718, 67–79.
- (15) VOROS, N.; PROUST, P.; FREDENSLUND, A. Liquid-Liquid Phase Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Salts and Polyethyleneglycol. *Fluid Phase Equilib*. **1993**, 90, 333–353.
- (16) LI, M.; ZHU, Z.-Q.; MEI, L. M. Liquid-Liquid Equilibria for Hydroxypropyl Starch + Poly(ethyleneglycol) + Water at 25°C. *J. Chem. Eng. Data*. **1996**, 41, 500–503.
- (17) FILHO, E. S. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. Liquid-Liquid Equilibrium for Ternary Systems Containing a Sugar + a Synthetic Polymer + Water. *J. Chem. Eng. Data*. **2002**, 47, 1346–1350.
- (18) SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de Alimentos. Métodos Químicos e Biológicos*. Ed. Universidade Federal de Viçosa, 3<sup>a</sup> Ed., Viçosa, 2002.
- (19) FISKE, C. A.; SUBBAROW, I. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Bio. Chem.* **1925**, 66, 375–399.

- (20) ZAFARANI–MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R. Liquid–Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Polyethylene Glycol and Sodium Dihydrogen Phosphate or Disodium Hydrogen Phosphate. Experiment and Correlation. *Fluid Phase Equilib.* **2001**, *181*, 95–112.
- (21) ZAFARANI–MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R. Measurement and Correlation of Liquid–Liquid Equilibria of the Aqueous Two–Phase System Polyvinylpyrrolidone–Sodium Dihydrogen Phosphate. *Fluid Phase Equilib.* **2002**, *203*, 177–191.
- (22) ZAFARANI–MOATTAR, M. T.; GASEMI, J. Liquid–Liquid Equilibria of Aqueous Two–Phase Systems Containing Polyethylene Glycol and Ammonium Dihydrogen Phosphate or Diammonium Hydrogen Phosphate Experiment and Correlation. *Fluid Phase Equilib.* **2002**, *198*, 281–291.
- (23) PEREIRA, M.; WU, Y.–T.; MADEIRA, P.; VENÂNCIO, A.; MACEDO, E.; TEIXEIRA, J. Liquid–Liquid Equilibrium Phase Diagrams of New Aqueous Two–Phase Systems: Ucon 50–HB5100 + Ammonium Sulfate + Water, Ucon 50–HB5100 + Poly(vinyl alcohol) + Water, Ucon 50–HB5100 + Hydroxypropyl Starch + Water, and Poly(ethylene glycol) 8000 + Poly(vinyl alcohol) + Water. *J. Chem. Eng. Data.* **2004**, *49*, 43–47.
- (24) JÖNSSON, M.; JOHANSSON, H. –O. Protein Partitioning in Thermoseparating Systems of a Charged Hydrophobically Modified Ethylene Oxide Polymer. *J. Chromatogr A.* **2003**, *983*, 133–144.
- (25) SVENSSON, M.; LINSE, P.; TJERNELD, F. Phase Behaviour in Aqueous Two–Phase Systems Containing Micelle–Forming Block Copolymer. *Macromolecules.* **1995**, *28*, 3597–3603.
- (26) SILVA, L. H. M.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, J. A. Equilibrium Phase Behaviour of Poly(ethylene glycol) + Potassium Phosphate + Water Two–Phase Systems at Various pH and Temperatures. *J. Chem. Eng. Data.* **1997**, *42*, 398–401.
- (27) ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; GODDARD, E. D. Aqueous Biphasic Formation in Polyethylene Oxide–Inorganic Salt Systems. *Langmuir.* **1987**, *3*, 25–31.

## **CAPÍTULO 3**

### **BOVINE SERUM ALBUMIN AND $\beta$ -LACTOGLOBULIN PARTITIONING IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM CONTAINING SELF-AGREGATION BLOCK COPOLYMER.**

#### **ABSTRACT**

The partitioning of proteins from cheese whey such as bovine serum albumin (BSA) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) were partitioning in aqueous two-phase systems (ATPS) consisting of micelle forming block copolymers L35 and F68. These copolymers are members of a PEO-PPO-PEO family, where PEO is poly (ethylene oxide) and PPO is poly(propylene oxide). Two different ATPS were used. One prepared with L35-phosphate-water and other formed by F68-phosphate-water, all of them in pH 7. The experiments were performed at 10, 25 and 40°C. The influence of the triblock copolymers nature, molar mass, temperature and tie-line length on the partitioning were investigated. Both proteins partitioning towards the more hydrophilic phosphate phase and a weak temperature effect on the partition coefficient values was observed. The data observed experimentally were analyzed using a simple model, derived by Johansson et al, from the Flory-Huggins theory. The results are discussed in term of entropic and enthalpic contributions to the partitioning. The entropic

force was dominant in the partitioning behavior of these proteins, in a similar way of PEO – phosphate systems.

### 3.1. INTRODUCTION

The partition on aqueous two-phase systems (ATPS) have shown a technique of great potential for molecules separation, including biological materials, such as proteins, cells, cell particles [1-3]. Different aqueous two-phase systems formed by polymer/polymer, salt/polymer and surfactant/polymer presents the water as majority component in both phases make it possible to separate and to purify substances of biological origin under gentle conditions in way to preserve their main characteristics [1,4-5]. The applicability of ATPS has been increasing scientific activity in the sense of to establish foundations and to identify the most appropriate systems for separation of different biomolecules [6]. The ATPS formed for poly(ethylene oxide) (PEO) and dextran (a bacterial polysaccharide built up of  $\alpha$ -1,6 linked glucose units) is the most studied polymer system [5]. In spite of being attractive, the high cost of the dextran limits their use to separation and purification of bioparticles in great scale. So, there is a for need of new and inexpensive systems. In this sense, recent years the use of the maltodextrin (MD) with PEO in aqueous two-phase provided an alternative of low cost [7]. For the large-scale isolation of enzymes the inexpensive PEO-salt systems are too been used [8]. The choice for new components in ATPS has been made by economical reasons and search for a less costly and efficient technological application. [9]. The maintenance of the physical structure of the target bioparticle, that is, the risk of damaging the structure of proteins and cells should be minimized.

ATPS composed by PEO-maltodextrin (MD), PEO-phosphate, PEO-citrate and PEO-sulphate were investigated in the partitioning of whey proteins such as  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La), bovine serum albumin (BSA) and other bioparticles [10-12]. Many polymer-salt systems were used due to the larger relative difference in hidrophobicity between phases as well as lower viscosity and requesting of smaller time for phase separation [13-14].

One problem found in ATPS is the difficulty to separate the target biomolecule of interest from the polymer solution. Since that step is important in both, in industrial scale or in laboratory processes, expensive and time-consuming methods, such as ultrafiltration, electrophoresis, and chromatography, have been employed to separate bioproducts from polymer solutions. If the polymer could be easily removed and recycled, the ATPS cost will be reduced [15]. The use of thermoseparating polymers can be noted in the last 12 years in the partitioning technique [16-18]. Persson et al studied the recovery and recycling of EOPO copolymer taking into account the discussion of the practical aspects of the thermoseparation such as the time and temperature is required for separation. It was also analyzed the influence of different types of added components such as salts, proteins and a second polymer on the thermoseparation. The change in this variable resulting in a great recovery of the copolymers, i.e, more than 90% of the copolymer could be recovered in the thermoseparation [19]. Besides the use of thermoseparating systems is important to notice the utilization of these systems in the bioparticles partition. As example can be mentioned the partitioning of BSA and lysozyme in the thermoseparated two-phase systems composed by cationic polymer at different pH and salt and concentration of sodium dodecyl sulfate (SDS) [20]. Another example is the partitioning of the series proteins and one membrane-bound peptide in aqueous two-phase systems of micelle forming block copolymers from the family of Pluronic block copolymers as one polymer component and dextran T500 as the other component [21].

The interest in the use of copolymer block as one of the components in the formation of new ATPS has been increasing, due to their great capacity of biomolecules partitioning. Aqueous two phase systems containing Pluronic P105 and dextran was used by Svensson et al [4,21]. Skuse et al also used a block copolymer (P105) and a cellulose polymer (hydroxypropyl cellulose), in saline buffer to partition cell, protein and bacterium. The authors made some physical characterizations such as measure of the phase diagram, interfacial tension, phase separation times and viscosities [22].

Copolymers are synthesized by the simultaneous polymerization of more than one type of monomer. The result of such synthesis is called a block copolymer if the individual monomers occur as blocks of various lengths in the

copolymer molecule. The different types of blocks within the copolymer are usually incompatible with one another [23]. In another way we can say that block copolymer are generally defined as macromolecules with linear and/or radial arrangement of two or more different blocks of varying monomer composition [24]. The block copolymer has been receiving growing attention in the last years. The reason for this is the importance of these systems in a wide range of applications. These systems at high polymer concentration and intermediate temperatures form “gels” that are used in different pharmaceutical applications. These polymers can adsorb both extensively and strongly, and at the same time provide a good steric stabilization to colloidal dispersions due to their amphiphilic nature. For that reason, they are widely used as stabilizers [25].

The partition in ATPS formed by copolymers is influenced strongly by the hydrophilic/hydrophobic balance and temperature therefore an abbreviated description of block copolymers is motivated. The Pluronic molecule water-soluble is composed of three polymer blocks of poly(ethylene oxide) (PEO) and poly(propylene oxide) (PPO), often denoted PEO-PPO-PEO or  $(EO)_{m1}(PO)_n(EO)_{m2}$ , where  $m1$ ,  $n$  and  $m2$  are its degree of polymerization. The middle (PPO) block is more hydrophobic than the final blocks of PEO, due to the methyl group in the PO unit, that is, polymers with different PEO and PPO blocks lengths it was shown self-aggregate in the form of micelles with a core dominated by PPO blocks and a corona of hydrated PEO chains. Variation of the copolymer composition, i.e, the ratio PPO/PEO and different PEO and PPO block lengths (molar mass) during the synthesis allows the production of molecules with optimum physical properties and surfactant functions because there is a freedom in the molecular design. As a result, PEO-PPO-PEO block copolymers gather specific qualities that are applied in several areas of technological significance such as an important class of surfactants and industrial applications in detergency, dispersion stabilization, foaming, emulsification, lubrication, formulation of cosmetics, inks, demulsifiers, viscosity modifiers, etc. and also in many industrial and pharmaceutical preparations enter other applications [5,23-26].

The temperature is an important parameter when blocks copolymers are used in ATPS because the EO hydration is strongly dependent of temperature.

A consequence of this behaviour is that PEO solubility in aqueous solutions and, therefore, of its block copolymers, can be changed by temperature alterations, providing an alternative to varying its self-assembling. In a general way, these copolymers aggregation is favored by increases in both temperature and concentration. Relative to the first aggregation step, from unimers to micelles, the concentration in which the micelles begins to form is called critical micelle concentration (CMC) and the temperature for the first unimers self-aggregation is referred as the critical micelle temperature (CMT) [23,26-28]. Therefore the blocks copolymers form micelles and one of their main properties is the dependence of the temperature for gel formation and micellization. Critical micellization temperatures have been determined for a range of Pluronic polymers [26,29].

The use of micelle-forming polymers in aqueous polymer two-phase systems has great potential, therefore, in this work, we have investigated the partitioning power of similar Pluronic (L35 and F68) – salt – water systems. The target proteins were bovine serum albumin (BSA) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) from cheese whey. It was analyzed the influence of molar mass, hydrophilic/hydrophobic balance, tie-line length and temperature on the partitioning of these proteins in ATPS formed by block copolymers (L35/F68), salt and water. The literature relates drastic changes in the partitioning of substances due to temperature variations in two-phase systems containing Pluronic polymers. In consequently, much effort has been driven to understanding the mechanisms that govern such behavior [25,29].

## 3.2. EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Materials

Triblocks copolymers purchased from Aldrich (USA) were used in the experiments. According to manufacturer the molar mass of Pluronic L35 is 1900 g/mol and F68 is 8400 g/mol, which would correspond to composition  $(\text{PEO})_{11}(\text{PPO})_{16}(\text{PEO})_{11}$  for L35 and  $(\text{PEO})_{80}(\text{PPO})_{30}(\text{PEO})_{80}$  for F68. The inorganic salts used were mono and dibasic potassium phosphate (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). The proteins bovine serum albumine (BSA) and  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) from bovine milk, electrophoresis grade, were purchased from Sigma (USA). Water deionized and degasified (Millipore, USA) was used in all experimental preparations.

### 3.2.2. Protein partitioning

Partition experiments of proteins were conducted in 50 cm<sup>3</sup> graduated centrifuge tubes. The tie-lines were obtained using aqueous stock solutions of triblocks copolymer (L35 and F68) and phosphate in pH 7. The buffer solution was obtained by addition of mono and dibasic potassium phosphates in a ratio of 2.062 (m/m). The stock solutions of (i) 80% (m/m) L35 and 25% (m/m) salt and (ii) 40% (m/m) F68 and 30% (m/m) salt were used for the partitioning of  $\beta$ -Lg at 10, 25 and 40 °C. Stock solutions of 40% (m/m) F68 or L35 and 30% (m/m) potassium phosphate were used for the partitioning of the BSA, at 10 and 25 °C. All systems presented a final mass of 20 g and nearly 100 mg (accurately weighed) of the selected protein. The proteins were dissolved in the salt stock solution. The complete separation of the phases was reached by centrifugation at 2900 g for 40 min at room temperature. After centrifugation the tubes were placed into thermostatic bath at 10, 25 and 40  $\pm$  0.1 °C for 24 h to reach the equilibrium. Aliquots of approximately 5 to 10 cm<sup>3</sup> were withdrawn using syringes. The top phase was removed first, with care being taken to leave a layer of material at least 0.5 cm above the interface. The bottom phase was removed using a syringe with a long needle. A tiny bubble of air was retained in the needle tip and expelled once in the bottom phase to prevent contamination

from top phase material. An analytical curve for each protein was built and was linear within the range of protein concentration measured. The concentrations of proteins (top and bottom) were determined by spectrophotometry [30,31]. A sample of each phase was mixed with deionized water and its absorbance read at 280 nm using a spectrophotometer (Cary 50 Probe, Varian). In all cases the concentrations were analyzed in triplicate. The standard deviation for the protein concentration was  $\pm 0.0017$  mg/g. The partition coefficient (K) was calculated as  $K_{\text{protein}} = C_T/C_B$ , where  $C_T$  and  $C_B$  are the protein concentration in mg/g of the top and bottom phases, respectively. For the partition coefficients the standard deviation was  $\pm 0.0001$ . Each top and bottom phase sample was compared against an identical one, but with the top and bottom phase free from protein. In general, four different moisture points were utilized to determine the protein partition.

### **3.3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.3.1. Partition coefficients of $\beta$ -Lg and BSA in L35-Phosphate and F68-Phosphate systems**

In terms of a thermodynamic formulation, the experimentally accessible protein partition coefficient is related to the free energy changes associated with all interactions between proteins and the different components responsible to formation of aqueous two-phase systems. In order to minimize the contribution of protein-protein interaction to free energy changes and the protein partition coefficient, experimental measurements were performed in very dilutions solutions of protein. Although proteins we could assume a not significantly interaction between proteins and other components, it is important to recognize that proteins can associate under special conditions, particularly near their isoelectric point. A specific method was employed to verify a possible self-aggregation of the protein. In this method four different amounts of protein, varied from 1 to 2.5 order of magnitude range, are introduced into four separately prepared systems of the same composition. A typical data obtained, for both proteins, according to this method are represented in Figure1.

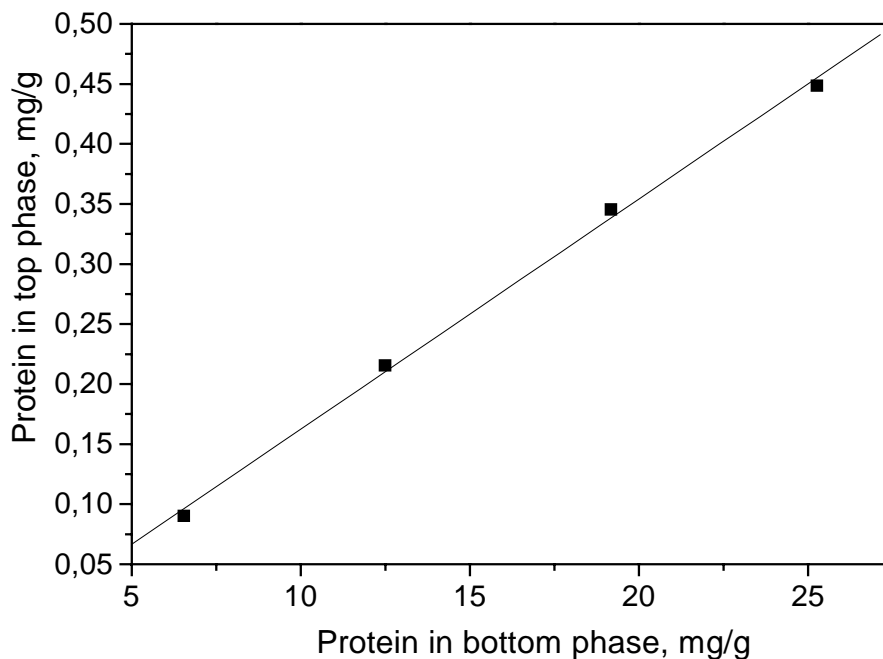


Figure 1. Concentrations of  $\beta$ -Lg in the two phases of aqueous L35-phosphate and F68-phosphate, pH 7, under varied total concentration of the protein in the system.

The partition coefficient value was determined as slope of the linear function by a standard linear regression analysis. Since  $K$  was constant for both proteins this result indicated immediately no existence of some kind of proteins interactions affecting the solute partition behavior.

Table 1 reports the phase compositions, tie-line length and  $K$  values of both proteins in three different temperatures, excepting for BSA at 40 °C for both copolymers aqueous two-phase systems. All values of partition coefficients of  $\beta$ -Lg and BSA in all ATPS composed of copolymer triblocks L35 and F68 are less than 1 showing that both proteins could be seen to prefer the bottom phase, and demonstrating a strong segregation in relation to the top phase. Extreme partitioning behavior of these proteins was observed by others authors using ATPS formed by other components [7,32] and in all cases its concentrate in the phosphate enriched phase.

Table 1 Phase compositions, tie line length (TLL), and partition coefficients (K) in L35, F68, salt and water for both proteins in three different temperatures

| System | Temp.(°C) | Top phase |        | Button phase |         | TLL     | K           |                |
|--------|-----------|-----------|--------|--------------|---------|---------|-------------|----------------|
|        |           | Polymer   | salt   | polymer      | salt    |         | $\beta$ -Lg | BSA            |
| L35    | 10        | 30.4132   | 0.4600 | 5.0432       | 12.7942 | 28.2093 | 0.0245      | 0.1044         |
|        |           | 40.1026   | 0.0107 | 4.3526       | 21.5135 | 41.7185 | 0.0155      | 0.0139         |
|        |           | 52.1383   | 0.0096 | 4.5458       | 28.9326 | 55.6918 | 0.0199      | 0.0395         |
|        |           | 64.2381   | 0.0097 | 4.7663       | 35.4646 | 69.2383 | 0.0756      | 1.0128         |
|        | 25        | 34.9713   | 0.0246 | 2.5986       | 11.7656 | 34.4361 | 0.0642      | 0.0335         |
|        |           | 48.5415   | 0.0160 | 2.7386       | 15.6633 | 4.4019  | 0.0261      | 0.0862         |
|        |           | 56.6481   | 0.0109 | 2.7089       | 21.9847 | 58.2433 | 0.0541      | 0.0299         |
|        |           | 62.9958   | 0.0136 | 3.0368       | 24.1015 | 64.6166 | 0.0490      | 0.0537         |
|        | 40        | 32.2495   | 0.1703 | 3.1203       | 8.8611  | 30.3980 | 0.0172      | — <sup>a</sup> |
|        |           | 53.0970   | 0.0079 | 1.6362       | 15.3479 | 53.6985 | 0.0122      | — <sup>a</sup> |
|        |           | 63.8166   | 0.0146 | 2.1009       | 20.4689 | 65.0169 | 0.0220      | — <sup>a</sup> |
|        |           | 72.7700   | 0.0198 | 2.7051       | 29.6143 | 76.6436 | 0.0281      | — <sup>a</sup> |
| F68    | 10        | 22.7754   | 1.7661 | 1.6385       | 12.8629 | 23.8727 | 0.0212      | 0.0150         |
|        |           | 32.6865   | 0.7189 | 2.5664       | 16.9785 | 34.2285 | 0.1168      | 0.0209         |
|        |           | 37.8171   | 0.8006 | 3.0379       | 18.6082 | 39.0730 | 0.0543      | 0.0086         |
|        |           | 41.7614   | 1.0562 | 4.0960       | 21.6008 | 42.9041 | 0.0453      | 0.0309         |
|        | 25        | 28.4791   | 0.2852 | 3.5260       | 9.1983  | 26.4971 | 0.0080      | 0.0101         |
|        |           | 34.0769   | 0.1735 | 2.3259       | 12.5099 | 34.0633 | 0.0203      | 0.0083         |
|        |           | 37.3035   | 0.4854 | 2.5964       | 15.2859 | 37.7311 | 0.1578      | 0.0385         |
|        |           | 41.0256   | 1.5693 | 2.5409       | 18.9876 | 42.2429 | 0.1850      | 0.0442         |
|        | 40        | 25.1124   | 0.5386 | 3.0583       | 8.3985  | 23.4128 | 0.0131      | — <sup>a</sup> |
|        |           | 35.5305   | 0.0403 | 2.1129       | 11.9896 | 35.4897 | 0.0160      | — <sup>a</sup> |
|        |           | 39.0412   | 0.0557 | 1.9157       | 13.4362 | 39.4631 | 0.3054      | — <sup>a</sup> |
|        |           | 42.8257   | 0.0474 | 2.3712       | 16.3934 | 43.6320 | 0.2709      | — <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> Protein undergo denaturation.

Johansson et al [33] have proposed a set of simple analytical equations, derived from the Flory-Huggins theory, to identify the dominant driving forces for solute partitioning. Many of the concepts used in the derivation of their model follow from the pioneers works of Brooks [34]. The model is based on a simple mean-field theory and is derived in a manner which allows a rapid qualitative interpretation of the dominant energetic, explicitly written in terms of enthalpic and entropic contributions, driving phase separation and partitioning, as well as the dependence of these energetic on phase composition and structure.

The solute infinite-dilution assumption (i.e., our experimental conditions,) was used in Haynes model to derive analytical expressions for the entropic and enthalpic, contributions to the partition coefficient, equation 1 and equation 2 respectively.

$$\ln K_p = \frac{M_p}{\rho} \left( \frac{n^t}{V^t} - \frac{n^b}{V^b} \right) \quad (1)$$

$$\ln K_p = -\frac{M_p}{RT} \left[ \sum_{i=1}^3 (\Phi_i^t - \Phi_i^b) w_{ip} - \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^t \Phi_j^t - \Phi_i^b \Phi_j^b) w_{ij} \right] \quad (2)$$

Where,  $K_p$  represents the protein partitioning coefficient,  $M_p$  is the protein molar mass,  $\rho$  is x number density of the ATPS,  $n^\beta$  is total number of molecules present in the  $\beta$  phase,  $\Phi_i^\alpha$  is the volume fraction of each component "i" in the  $\alpha$  phase,  $V^\beta$  is the volume of  $\beta$  phase, and  $w_{ij}$  is the effective pair-wise interchange energy.

As we can see in equation 1, the entropic effect on the partition coefficient results from the difference between the top and the bottom phases in the number of molecules per unit volume, and it is hope to be significantly larger for L35-phosphate and F68-phosphate ATPS because in both systems, the copolymer is effectively (see Table.1) localized in one phase, causing the number density of the phase to be considerably lower than the opposing salt-rich phase. Naturally, this difference between each phase occurs because the phase number density is dominated by the number of water molecules present, which is lower in the copolymer-rich phase. Then, there are strong contributions of the entropic effect to the partition coefficient of BSA and  $\beta$ -Lg proteins. Due to

high molar mass, it is hope that the K values of the BSA protein be more dependent of entropic aspect of the system. However the experimental results, both K values are very similar, appear to contrary this point of view, indicating the existence of an enthalpic contribution.

For the enthalpic effect on the solute partitioning two terms are considered, equation 2. One of them,  $\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^t - \Phi_i^b) w_{ip}$ , is the contributions to all binary unlike enthalpic interactions between the protein and the remaining components in each phase. In a copolymer-phosphate two-phase systems, the analyze of the results based on this first enthalpic term, states that the partition of both proteins into phosphate rich-phase occur because the protein-phosphate interaction is higher than the protein-copolymers pair wise parameter. Since the pH used in the experiments were above the isoelectric points of the proteins (which are 5.2 for  $\beta$ -Lg and 4.6 for BSA) their ionizable groups were negatively charged, inducing a strong ionic interaction with salt ions.

The second term,  $\sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^t \Phi_j^t - \Phi_i^b \Phi_j^b) w_{ij}$ , gives the difference, between the bottom and top phase, in relation to the density of the total enthalpy of formation. The dependence of K, on the self-energies of the each phase arises because insertion of a protein solute into a phase requires breaking interactions between components of the phase to create a cavity into which the protein fits. In the copolymers-phosphate aqueous two phase system, a large difference in self-energies is created by the strong attraction of the salt to water. However, this enthalpic effect appear does not sufficiently compensates the high number density of the salt-rich phase and consequently the entropic effect.

### 3.3.2. Effect of tie-line length and hydrophobic/hydrophilic balance on partitioning

The difference of concentration of the phase-forming component between each phase was exploited to verify their influence on the partition of proteins. In terms of a molecular point of view, partition behavior of globular proteins in ATPS is due to two main factors. The first is the energy difference to all binary unlike free energy interactions between the protein and the remaining components in each phase. A protein interacts with the surrounding molecules within a phase via various bonds, such as hydrogen, ionic and hydrophobic interactions, together with other weak forces. The net effect of these interactions is different in the two phases and therefore the protein will be partitioned into the phase where the energy is more favorable. The second is the difference in energy of each phase due to unlike interactions between all phase components other than the protein. This factor is responsible for the inequalities between each phase relative to intensive thermodynamics properties such as densities, molar enthalpies, etc. Both factors may be usefully related by an empiric thermodynamic parameter called tie-line length (TLL), since at constant pressure and temperature, the composition is the main influence in the free energy of the phases. The tie-line length of each system can be calculated from its top and bottom phase compositions, according to the following equation

$$TLL = \left[ (C_p^t - C_p^b)^2 + (C_s^t - C_s^b)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

where,  $C_p^t$  and  $C_p^b$  are the copolymer concentrations (%m/m) in the top and bottom phase, respectively, and  $C_s^t$  and  $C_s^b$  is the salt concentration (% m/m) in the top and bottom phase, respectively.

Partition coefficients of  $\beta$ -Lg and BSA in ATPS composed of copolymer triblocks L35 and F68 as a function of tie-line length, at 25 °C, are shown in Figure 1.

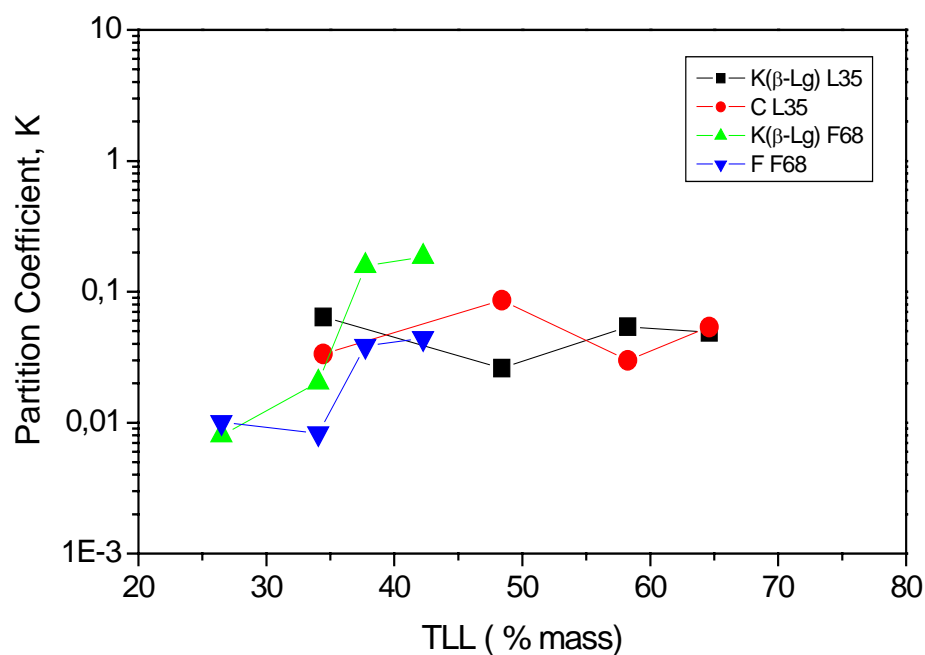


Figure 2. Effect of TLL on the partition coefficients in L35-phosphate and F68-phosphate systems, pH =7, 25°C.  $\beta$ -Lg (■)L35, BSA (●)L35,  $\beta$ -Lg (▲)F68, BSA (▼)F68.

For the partitioning experiment of  $\beta$ -Lg and BSA in ATPS systems formed with the copolymer L35 the value of partition coefficient shows a very weak dependency with respect to the tie-line length. By the other hands, the K values for both proteins in F68 ATPS systems present a significant dependence on TLL and show that partition coefficients for  $\beta$ -Lg and BSA increase as TLL increases, but with a small effect as compared with others aqueous two-phase systems. A trend observed in the literature is that partitioning also becomes more extreme with increasing tie-line length. Our results shows a nonlinear dependence on the tie-length and in accordance with the equations 1 and 2 this suggests that the  $\ln K_p$  is determined by a number of compensating effects. A increase in TLL promote a increase in copolymers concentration on the top phase causing a block copolymer self-association into micelar-like aggregates consisting of a core dominated by PO units, surrounded by a corona of EO chains [24]. This process has a strong effect on the phase diagram due to the significant redistribution of water between the phases [35].

Some literature works [36-38] suggested the dependency of a protein partition in PEO–Salt ATPS systems with the hydrophobicity of the protein; proteins with more apolar amino acid residues will present higher affinity for the top PEO phase, which is more hydrophobic than the bottom salt phase. However, the change of PEO by PEO-PPO-PEO copolymer tend to increase the hydrophobicity of the top phase in the following order, L35>F68, and no important change in K values were observed in comparison with ATPS formed by PEO–phosphate–H<sub>2</sub>O. Partition behavior shown by these proteins in L35–potassium phosphate and F68–potassium phosphate ATPS, therefore, can be not interpreted solely based on protein and phase hydrophobicity.

### **3.3.3. The effect of temperature on partitioning**

The influence of temperature on protein partitioning is due a great number of complex factors such as changes in the phase compositions and in the relative solvation of proteins. In L35–phosphate and F68–phosphate systems no significantly change in phase diagrams were observed when temperature was changed [35]. However for all systems formed by F68 and L35, the increase of the temperature occasioned the transfer of water molecules from the copolymer phase to salt rich phase, leading to an increase in the Pluronic concentration in the top phase and a decrease in the phosphate concentration in the bottom phase.

The partition coefficients of  $\beta$ -lactoglobulin as a function of TLL in L35–phosphate–water systems (pH=7) at 10, 25 and 40 °C are shown in Figure 3. Increasing the temperature, from 10 to 25 °C, causes the increase in the K values for all TLL. However the rise from 25 to 40 °C promoted the protein transfer from the copolymer rich phase to salt rich-phase. Upon increasing the temperature from 10 to 40 °C in the systems containing Pluronic L35, two main courses of events can influence the outcome of partitioning. In the 10-25 °C temperature range the block copolymers L35 in aqueous solution is dissolved as unimers, where water is a good solvent for both PEO and PPO blocks [24,39]. For the system heating in this interval (10-25°C) in the degree of hydration of the copolymers molecules will decrease releasing some water molecules that were solvating them. This process is driven by increase of the

copolymer rich phase entropy, which decrease the entropy difference between both phases and consequently increase the partition coefficient. At temperatures higher than 25 °C, together with the dehydration effect, the copolymer molecules start to self-associate and a considerable redistribution of water from the Pluronic to phosphate phase leading to an increase in the amount of water in bottom phase, which makes dominant the contribution of the number density of the phase. The last process cause a transfer of protein from the copolymer phase to salt rich phase driven mainly by entropic force.

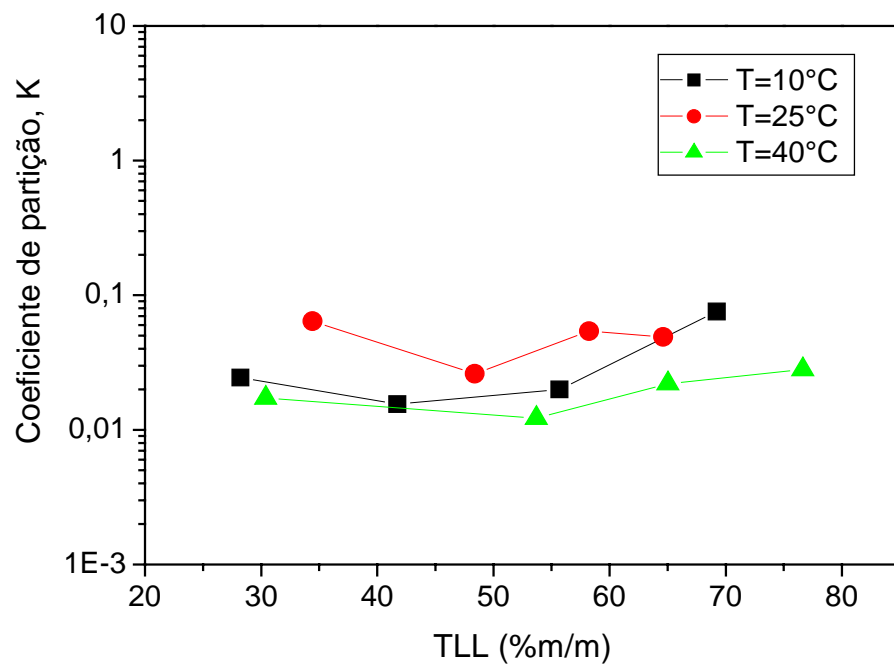


Figure 3. Effect of TLL on partition coefficients of the  $\beta$ -lactoglobulin in the L35-phosphate system (pH = 7) in different temperatures.

Figure 4 shows the temperature effect on the partition coefficient of the  $\beta$ -lactoglobulin at the F68-phosphate-water systems (pH=7). It is lower intense than in L35 two phase systems. Probably this behavior arises either from the F68 small aggregation extension process (as compared with L35 process) or from the high molar mass of F68 that contribute with an intense excluded volume process, independent of the temperature.

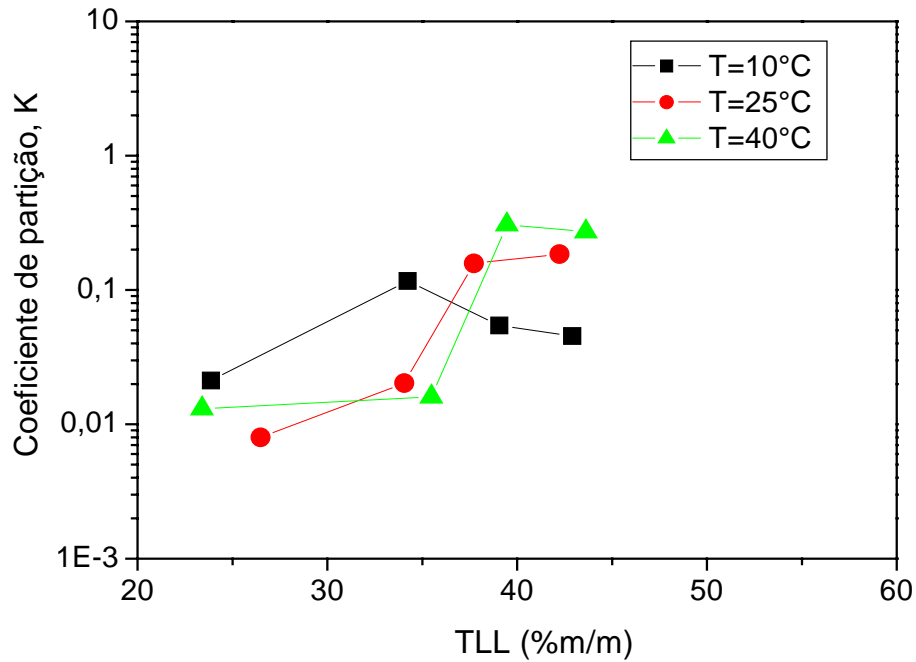


Figure 4. Effect of TLL on partition coefficients of the  $\beta$ -lactoglobulin in the F68-phosphate system (pH = 7) in different temperatures.

### 3.4 CONCLUSION

Partitioning of different proteins of the cheese whey, such as,  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) and bovine serum albumin (BSA) were experimentally analyzed in ATPS formed by L35 and F68. The two proteins preferentially partitioning to phosphate phase at temperatures of 10, 25 and 40 °C. A weak effect of the temperature was observed in the protein partitioning.

The model proposed by Johansson et al [33], derived from the Flory-Huggins theory, was used to do interpretation the partitioning process in terms of enthalpic and entropic contributions. As in PEO-phosphate systems, the partition behavior depends strongly on the entropic contribution and as the molar mass of BSA is high it was waited a greater dependence of BSA partition coefficient on entropic factor. However the experimental results showed the existence of a enthalpic contribution due to: (i) there is a strong ionic interaction of the ionizable groups of the charged protein with salt ions and (ii) the insert of the protein in the systems results in a large difference in self-energies created by the strong attraction of the salt in relation to water. Despite of this fact the entropic effect is not compensate by enthalpic, so that the entropic force is dominant in the partitioning behavior of these proteins.

The values of the partition coefficients for both proteins in L35 and/or F68 systems present dependence with TLL, i.e, the increase of partition coefficient on the TLL an increase of TLL, but with a small effect when compared with others type of ATPS.

The temperature effect on the partition coefficient of  $\beta$ -lactoglobulin at the F68-phosphate-water systems is lower than in L35 two-phase systems.

ATPS formed by L35-phosphate at 25 °C present values of partition coefficient similar or smaller than those formed by PEO-phosphate in the same temperature, being of this form an alternative road the separation of the proteins of the cheese whey.

### 3.5. REFERENCES

- [1] P.-A. Albertsson, Partition of Cells Particles and Macromolecules, Wiley, New York, 1986.
- [2] G. Reh, B. Nerli, G. Picó, J. Chromatogr. B, 780 (2002) 389-396.
- [3] M.I. del-Val, C. Otero, Enzyme Microb Technol, 33 (2003) 118-126.
- [4] M. Svensson, K. Berggren, A. Veide, F. Tjerneld, J. Chromatogr. A, 839 (1999) 71-83.
- [5] M. Svensson, F. Joabsson, P. Linse, F. Tjerneld, J. Chromatogr. A, 761 (1997) 91-101.
- [6] Y. Guan, T. Lilley, T. Treffry, Macromolecules 26 (1993) 3971-3979.
- [7] L.H.M. da Silva, A.J.A. Meirelles, Carbohydrate Polymers 42 (2000) 279.
- [8] Y.-T. Wu, M. Pereira, A. Venâncio, J. Teixeira, J. Chromatogr. A, 929 (2001) 23-29.
- [9] L.A. Sarubbo, L.A. Oliveira, A.L.F. Porto, H.S. Duarte, A.M.A. Carneiro-Leão, J.L. Lima-Filho, G.M. Campos-Takaki, E.B. Tambourgui, J. Chromatogr. B, 743 (2000) 79.
- [10] J.G.L.F. Alves, L.D.A. Chumpitaz, L.H.M. da Silva, T.T. Franco, A.J.A. Meirelles, J. Chromatogr. B 743 (2000) 235.
- [11] J.R. Coimbra, J. Thömes, M.-R. Kula, J. Chromatogr. A, 668 (1994) 85-94.
- [12] J.S.R. Coimbra, F. Mojola, A.J.A. Meirelles, J. Chem. Eng. Japan 31 (1998) 277.
- [13] R. Hatti-Kaul, Molecular Biotechnol., 19 (2001) 269.
- [14] G. Blázquez, F. Camacho, M. Calero, F.-J. Alarcón, Chem. Eng. Sci
- [15] M. Li, Z.-Q. Zhu, Y.-T. Wu, D.-Q. Lin, Chemical Engineering Science, 53 (1998) 2755-2767.
- [16] P.A. Harris, G. Karlström, F. Tjerneld, Bioseparation, 2 (1991) 237.
- [17] H.-O. Johansson, G. Karlström, F. Tjerneld, Macromolecules, 26 (1993) 4478.
- [18] P.A. Alred, A. Kozłowski, J.M. Harris, F. Tjerneld, J. Chromatogr. A 659 (1994) 289
- [19] J. Persson, A. Kaul, F. Tjerneld, J. Chromatogr. B 743 (2000) 115-126.
- [20] M. Jönsson, H.-O. Johansson, J. Chromatogr. A, 983 (2003) 133-144.

- [21] M. Svensson, K. Berggren, A. Veide, F. Tjerneld, *J. Chromatogr. A*, 839 (1999) 71-83.
- [22] D.R. Skuse, R. Norris-Jones, M. Yalpani and D.E. Brooks, *Enzyme Microbial Technol.*, 14 (1992) 785-790.
- [23] P. Alexandridis and T.A. Hatton, *Colloid. Surf. A*, 96 (1995) 1-46.
- [24] G. Riess, *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1107-1170.
- [25] P. Linse, M. Malmsten, *Macromolecules*, 25 (1992) 5434-5439.
- [26] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, T.A. Hatton, *Macromolecules*, 27 (1994) 2414-2425.
- [27] B. Chu, *Langmuir* 11(2) (1995) 414-421.
- [28] I.R. Schmolka, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 54(3) (1977) 110-116.
- [29] M. Svensson, P. Linse, F. Tjerneld, *Macromolecules*, 28 (1995) 3597-3603.
- [30] L.H.M. da Silva, A.J.A. Meirelles, *Carbohydrate Polymers* 46 (2001) 267-274.
- [31] B. Farruggia, B. Nerli, G. Pico, *J. Chromatogr. B* 798 (2003) 25-33.
- [32] J.-P. Chen, *J. Ferm. Bioeng.* 73 (1992) 140-147.
- [33] H.-O. Johansson, G. Karlström, F. Tjerneld, C. A. Haynes, *J. Chromatogr. B* 711 (1998) 3-17.
- [34] H. Walter, D. Brooks, D. Fisher (Eds.), *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology*, Academic Press, Orlando, 1985.
- [35] K.S. Nascimento, A. Fuzer-Mesquita, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, L.H.M. Silva, unpublished results.
- [36] H.L. Chiang, S.S. Wang, *Biotechnol. Tech* 2 (1988) 283-288.
- [37] E. Anderson, J.E. Bailey, *Biotechnol. Tech* 1 (1987) 207-212.
- [38] B. Schwenzler, G. Kopperschläger, *Biomed. Biochim. Acta* 48 (1989) 33-41.
- [39] C. Kepka, J. Rhodin, R. Lemmens, F. Tjerneld, P.-E. Gustavsson, *J. Chromatogr. B* 1024 (2004) 95-104.