



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ANA ALICE DE FÁTIMA NUNES TORRES

**ESTUDO DA PARTIÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G EM SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS UTILIZANDO PEG/TAMPÃO CITRATO**

FORTALEZA – CE

2013

ANA ALICE DE FÁTIMA NUNES TORRES

**ESTUDO DA PARTIÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G EM SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS UTILIZANDO PEG/TAMPÃO CITRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

Coorientadora: Prof. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar

FORTALEZA – CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

-
- T643e Torres, Ana Alice de Fátima Nunes.
- Estudo da partição de imunoglobulina G em sistemas aquosos bifásicos utilizando PEG/tampão citrato / Ana Alice de Fátima Nunes Torres. – 2013.
69 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior.
Coorientação: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar.
1. Engenharia Química. 2. Equilíbrio líquido líquido. 3. Anticorpos. I. Título.

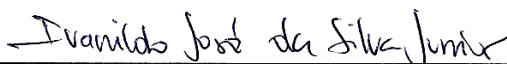
ANA ALICE DE FÁTIMA NUNES TORRES

ESTUDO DA PARTIÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G EM SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS UTILIZANDO PEG/TAMPÃO CITRATO

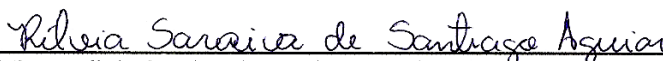
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em 28/02/2013

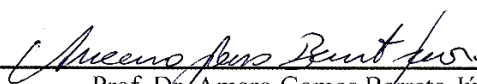
BANCA EXAMINADORA



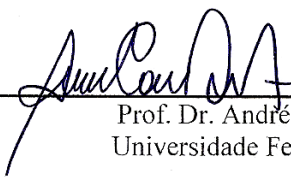
Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)



Prof. Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*A meus pais, Pádua e Fátima,
que me deram a vida, me criaram com todo amor e carinho e me ensinaram a ser uma pessoa de
bem e que busca sempre a justiça;
e a Rodrigo, meu noivo e, em breve, futuro marido,
que sempre me deu apoio nas horas mais difíceis e que se mostra a cada dia uma das minhas
melhores escolhas de vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me encaminhou pelos caminhos que eu deveria trilhar, ainda que eu só percebesse a verdadeira razão algum tempo depois.

A meus pais, Pádua e Fátima, peças fundamentais na minha vida, que sempre me transmitiram os seus melhores valores e contribuíram para a minha formação como ser humano.

À minha tia Arieuda, pelo carinho e dedicação de sempre.

A Rodrigo, pelo amor, paciência, compreensão e companheirismo dedicados a mim de forma completa.

Aos meus sogros, Mariana e João, por terem aberto as portas de sua casa desde sempre e, principalmente, nas horas de maior necessidade, e por sempre terem me tratado com bastante carinho.

Ao meu orientador Ivanildo José, que me recebeu desde a primeira vez na sua sala com bastante simpatia e de forma acolhedora e me propôs esse projeto desafiador que me fez buscar respostas e soluções, me ensinando a ter a tal da pró-atividade. Agradeço também por tirar minhas dúvidas, me dar sugestões, indicar os caminhos pelos quais eu deveria seguir e pela infinita paciência com minha teimosia.

À minha coorientadora Rílvia Saraiva, pelas palavras de apoio nas horas certas e por ter assumido com prontidão as responsabilidades do professor Ivanildo José quando este precisou se ausentar.

Ao professor Hosiberto de Sant'Ana pela ajuda incansável na hora de redigir e corrigir os artigos e pelas dicas e/ou questionamentos pertinentes durante a realização do trabalho de pesquisa.

À professora Suely, por ter me ajudado na geração do planejamento experimental utilizado neste trabalho, o que me poupou bastante tempo e uma quantidade enorme de reagentes.

Às professoras Diana Azevedo e Maria Valderez pelas correções feitas no meu Exame Geral de Conhecimentos, de forma que eu pudesse melhorar o trabalho.

Ao Ives Jegi, meu companheiro de pesquisa, que foi quem deu início de fato ao projeto e quem sempre vinha com todas as respostas antes mesmo de eu fazer as perguntas, viabilizando o andamento da pesquisa no momento em que estava preocupada exclusivamente com as disciplinas do programa de pós-graduação.

Às minhas companheiras de mestrado, Alaídes, Ana Cristina, Anne Kamilly e Talita, pela amizade, companheirismo e momentos de descontração vividos.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada (GPTA), Aline, Bruna, Filipi, Francisca Maria, Márcia e Regiane, pela boa recepção e pelos conhecimentos generosamente compartilhados.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisas em Separações por Adsorção (GPSA), Bárbara, Bruna, Diego e Eurânio, também pela boa recepção e pela disponibilidade constante para ajudar qualquer que fosse o motivo.

Ao GPSA e GPTA, pelos recursos materiais e espaço físico disponibilizados, que permitiram a realização do projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, possibilitando a dedicação exclusiva para a execução do projeto de pesquisa.

“O nosso ideal, devemos colocá-lo nas estrelas, ainda que fiquemos na metade do caminho.”

L. Tolstoi

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se a extração de Imunoglobulina G (IgG) em Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) compostos por polietilenoglicóis (PEG) com massas moleculares iguais a 4000, 6000 e 8000 g.mol⁻¹ e tampão citrato com pHs 5,0, 6,0 e 7,0. Primeiramente, determinou-se o comportamento no equilíbrio para cada sistema por duas metodologias diferentes: *cloud-point*, a partir do qual foram obtidas as curvas binodais, e densitometria, que deu origem às linhas de amarração. Os resultados obtidos por ambas as técnicas apresentaram uma boa concordância. Observou-se que o aumento da massa molar do PEG, bem como o aumento do pH do tampão citrato levou a um aumento da área sobre a curva binodal. Entretanto, para o último caso, a expansão da região bifásica não foi significativa quando se aumentou o pH de 6,0 para 7,0. Em relação às linhas de amarração, também não foram observadas mudanças significativas tanto no comprimento como nas inclinações das mesmas quando se variou a massa molar e o pH, o que mostra a alta capacidade dos íons citrato em se hidratar preferencialmente e promover quase totalmente ou totalmente a exclusão do PEG da fase fundo, como observado nesse trabalho. O estudo de partição se deu a partir de um planejamento estatístico do tipo 2⁴ com resolução completa e adição de três pontos centrais, tendo como variáveis a % PEG, % tampão citrato, pH e massa molar do PEG. Para tal finalidade o *software* Statistica 7 foi utilizado. Foram realizados 19 experimentos e cada variável independente foi testada em três níveis, sendo os valores de porcentagem de PEG iguais a 26, 28 e 30% m/m e de tampão citrato iguais 8, 10 e 12% m/m. Os experimentos que apresentaram os maiores valores de coeficiente de partição (K_p) foram aqueles com pH 7,0 e 12% de tampão citrato, classificados como fatores significativos estatisticamente. Fixaram-se, então, esses valores de pH e % de tampão citrato e realizaram-se mais 27 experimentos com diferentes concentrações de NaCl (0, 0,2 e 0,4 M). Observou-se um aumento no valor de K_p quando se aumentou a concentração de NaCl. Os resultados apresentados neste estudo mostraram que elevados valores de K_p podem ser obtidos mesmo a baixas concentrações de sal neutro. Este resultado mostrou ser satisfatório visto que a utilização de grandes concentrações de sais em um processo industrial pode ocasionar diversos problemas como, por exemplo, a redução na vida útil dos equipamentos devido à corrosão dos mesmos.

PALAVRAS-CHAVE: Equilíbrio líquido-líquido, partição, anticorpos.

ABSTRACT

In this work, it was studied the extraction of immunoglobulin G (IgG) in Aqueous Two Phase Systems (ATPS) composed of polyethylene glycols (PEG) with molecular weight equal to 4000, 6000 and 8000 g.mol⁻¹ and citrate buffer with pH 5.0, 6.0 and 7.0. First, the behavior for each system in equilibrium was determined by two different methodologies: cloud-point from which binodal curves were obtained and density, which led to the tie-lines. The results obtained by both techniques showed good agreement. It was observed that the increase in PEG molecular weight and the increase in citrate buffer pH led to an increase in the area of the binodal curve. However, for the latter case, the expansion of two-phase region was not significant when the pH increased from 6.0 to 7.0. Regarding the tie-lines, there were also no significant changes in both length and slopes of the same while varying the molecular weight and pH, which shows the high ability of citrate ions on hydrating themselves preferably and promoting fully or almost fully the PEG exclusion bottom phase, as observed in this study. The study of partition was made from a statistical design of type 2⁴ with complete resolution and adding three central points, having as variables % PEG, % citrate buffer, pH and PEG molar mass. For this purpose the software Statistica 7 was used. 19 experiments were performed and each independent variable was tested in three levels, being the values of PEG percentage equals to 26, 28 and 30% (m/m) and citrate buffer percentage equals to 8, 10 and 12% (w/w). The experiments showed that the highest values of the partition coefficient (K_p) were obtained in systems with pH 7.0 and 12% citrate buffer, classified as statistically significant factors. These values of pH and % citrate buffer were settled and other 27 experiments were conducted with different concentrations of NaCl (0, 0.2 and 0.4 M). There was an increase in the K_p value when the NaCl concentration increased. The results of this study showed that high K_p values can be obtained even at low concentrations of neutral salt. This result is satisfactory since the use of high concentrations of salts in an industrial process may cause various problems such as the reduction in service life due to corrosion of the equipment thereof.

KEYWORDS: Liquid-liquid equilibrium, partition, antibodies.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Imunoglobulinas	4
3.2. Imunoglobulina G	6
3.3. Técnicas de purificação de biomoléculas	8
3.4. Sistemas aquosos bifásicos (SABs)	10
3.5. Diagramas de Equilíbrio	12
3.6. Fundamentos termodinâmicos sobre a formação dos SABs	13
3.7. Fatores que influenciam a partição em SABs	15
3.8. Trabalhos relacionados	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Materiais	20
4.2. Construção das curvas binodais pelo método <i>cloud-point</i>	20
4.3. Obtenção das linhas de amarração por densimetria	20
4.4. Planejamento experimental para extração da IgG	21
4.5. Obtenção dos coeficientes de partição	22
4.6. Análise estatística dos dados de partição	23
4.7. Investigação do efeito do NaCl na partição da IgG	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Dados de equilíbrio	25
5.2. Efeito da massa molar no diagrama de fases	26

5.3. Efeito do pH no diagrama de fases	28
5.4. Efeito da massa molar e do pH nas linhas de amarração	30
5.5. Coeficientes de partição da IgG	33
6. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
APÊNDICE	49
APÊNDICE A	50
APÊNDICE B	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura básica H2L2 de uma imunoglobulina típica. Fonte: PORTAL DE ONCOLOGIA PORTUGUÊS (2013) 5
- Figura 2. Estruturas características de cada classe de anticorpos. Fonte: AMERSHAM BIOSCIENCES (2002). 5
- Figura 3. Representação da partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos. Fonte: BENAVIDES *et al.*, 2008. 11
- Figura 4. Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio (--) linhas de amarração, (-) binodal. Fonte: SILVA (2000). 12
- Figura 5. Linhas de amarração e curvas binodais para o sistema PEG 4000 + Tampão Citrato pH 5,0. (■) Método *cloud-point*, (△) Método densimétrico. 25
- Figura 6. Curvas binodais para os sistemas PEG (■) 4000, (○) 6000, (▲) 8000 + Tampão Citrato com pH (a) 5,0, (b) 6,0 e (c) 7,0. 27
- Figura 7. Curvas binodais para os sistemas PEG (a) 4000, (b) 6000 e (c) 8000 + Tampão Citrato pH (■) 5,0, (○) 6,0, (▲) 7,0. 29
- Figura 8. Efeito do pH no STL e TLL dos sistemas PEG (a) 4000, (b) 6000 e (c) 8000 + Tampão citrato pH (--■--) 5,0, (···○···) 6,0, (-▲-) 7,0. 31
- Figura 9. Efeito da massa molar no STL e TLL dos sistemas PEG (--■--) 4000, (···○···) 6000, (-▲-) 8000 + Tampão citrato pH (a) 5,0 (b) 6,0 e (c) 7,0. 32
- Figura 10. Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da IgG para sistemas com (■) 26%, (○) 28% e (▲) 30% m/m de PEG (a) 4000, (b) 6000 e (c) 8000 + 12% m/m de tampão citrato pH 7,0. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento experimental feito no <i>software</i> Statistica 7 para obtenção de dados de partição da IgG.	22
Tabela 2. Valores de STL and TLL para os sistemas PEG (4000, 6000 e 8000) + Tampão Citrato (pH 5,0, 6,0 e 7,0).	30
Tabela 3. Valores de K_p e $\log K_p$ obtidos.	33
Tabela 4. Estimativas por ponto, por intervalo e testes de hipóteses para os efeitos e coeficientes.	34
Tabela 5. Análise de variância.	34
Tabela 6. Tabela ANOVA.	35
Tabela 7. Dados de K_p , $\log K_p$ e volumes das fases topo e fundo para sistemas aquosos bifásicos com pH 7 e 12% de tampão citrato.	37

LISTA DE ABREVIATURAS

- C_T – Concentração de equilíbrio da biomolécula particionada na fase topo
- C_F – Concentração de equilíbrio da biomolécula particionada na fase fundo
- C_P^T – Concentração de equilíbrio do polímero na fase topo
- C_P^F – Concentração de equilíbrio do polímero na fase fundo
- C_S^T – Concentração de equilíbrio do sal na fase topo
- C_S^F – Concentração de equilíbrio do sal na fase fundo
- F_{cal} – Fator F calculado
- F_{ab} – Fragmento de ligação do anticorpo
- F_c – Fragmento constante
- G – Energia Livre de Gibbs
- GL_{erro} – Grau de liberdade do erro
- GL_{reg} – Grau de liberdade da regressão
- GL_{tot} – Grau de liberdade total
- Ig – Imunoglobulina
- H – Entalpia
- K_p – Coeficiente de partição
- m/m – Razão entre massas
- M – Molaridade
- MM – Massa molar
- MQ_{reg} – Média quadrática da regressão
- MQ_{erro} – Média quadrática do erro
- $NaCl$ – Cloreto de sódio

PEG – Polietilenoglicol

pH – Potencial hidrogeniônico

S – Entropia

SAB – Sistema Aquoso Bifásico

SQ_{erro} – Soma quadrática do erro

SQ_{reg} – Soma quadrática da regressão

SQ_{tot} – Soma quadrática total

STL – Inclinação da linha de amarração

TLL – Comprimento da linha de amarração

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos, os anticorpos tem se mostrado potentes medicamentos no tratamento de diversas doenças (AZEVEDO *et al.*, 2009a). Segundo van Dijk e van de Winkel (2001), a classe de anticorpos mais abundante encontrada no sangue humano é a imunoglobulina G 1 (IgG₁), entretanto existem ainda outros nove tipos de anticorpos, chamados de isotipos, a saber: IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgA₃, IgD e IgE (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002). Infelizmente, a dose necessária destes para a obtenção de resultados eficazes tem que ser bastante elevada, o que torna urgente o desenvolvimento de técnicas de produção em grande escala rápidas, economicamente viáveis e que gerem produtos com alto grau de pureza (ROSA *et al.*, 2007a).

A etapa *upstream*, que envolve basicamente o crescimento celular, tem melhorado consideravelmente a produção de anticorpos monoclonais – produzidos a partir de células de hibridoma e, por isso, altamente específicos – devido às contínuas descobertas em biologia molecular e genética (AZEVEDO *et al.*, 2008). Esse cenário leva à necessidade de se melhorar também a etapa *downstream*, que diz respeito às técnicas de purificação do bioproduto de interesse e que tem sido considerado um gargalo na produção de grandes quantidades com custos razoáveis (ROSA *et al.*, 2009b).

Uma técnica bastante utilizada em combinação com outras operações unitárias no processo de purificação de anticorpos monoclonais é a cromatografia de afinidade com proteína A (SHUKLA *et al.*, 2007), por proporcionar a obtenção de um produto com mais de 98% de pureza (ZHOU *et al.*, 2006). Segundo Vançan (1999), entretanto, a sua utilização apresenta como desvantagens o alto custo, a toxicidade em caso de desprendimento do ligante da matriz sólida, a perda da atividade biológica ao longo do tempo e a possibilidade de contaminação bacteriana.

Outras técnicas não-cromatográficas, tais quais adsorção em membrana, precipitação, separação magnética, cristalização e extração em sistemas aquosos bifásicos (SABs), tem sido testadas com o intuito de substituir a cromatografia de afinidade com proteína A (MAO *et al.*, 2010). Rito-Palomares (2004) mostrou que é possível utilizar a extração líquido-líquido em duas fases aquosas como a primeira etapa do *downstream*, uma vez que esta técnica reúne em um único passo separação e concentração da molécula alvo.

Os SABs consistem de duas fases imiscíveis formadas quando soluções de polímeros solúveis em água são combinadas entre si, ou com uma solução salina, em determinadas concentrações (XU *et al.*, 2001). Há uma grande quantidade de trabalhos que investiga a extração de anticorpos monoclonais através de SABs. Muitos desses trabalhos utilizam sistemas compostos por polietilenoglicol (PEG)/dextrana (ROSA *et al.*, 2007b; ROSA *et al.*, 2009a; AZEVEDO *et al.*, 2009b), enquanto outros utilizam sistemas polímero/sal compostos por PEG/tampão fosfato (AZEVEDO *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2007b; LEE e FORCINITI, 2010; ROSA *et al.*, 2009b), devido à maior rapidez de separação das fases decorrente da maior diferença de densidade entre as soluções.

Recentemente, trabalhos utilizando PEG/tampão citrato (AZEVEDO *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2009a; LEE e FORCINITI, 2010; MAO *et al.*, 2010) começaram a ser testados e divulgados na literatura. Quando comparado ao fosfato, o citrato apresenta vantagens tais quais biodegradabilidade e não-toxicidade, permitindo que seja disposto em sistemas de tratamento de esgoto biológicos (MAO *et al.*, 2010). Além disso, menores concentrações de citrato são necessárias para a obtenção de um SAB, o que o torna mais efetivo na formação desses sistemas (SILVÉRIO *et al.*, 2012).

De acordo com Azevedo *et al.* (2007), melhores resultados de pureza e rendimento podem ser obtidos variando-se condições experimentais como pH, força iônica e peso molecular do polímero. Diante do exposto, no presente trabalho buscou-se investigar a influência do tamanho da cadeia do PEG, do pH da solução de tampão citrato e da presença de cloreto de sódio na partição de imunoglobulina G.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a partição de IgG em sistemas aquosos bifásicos (SABs) compostos por PEGs com diferentes massas moleculares, soluções de tampão citrato com diferentes pHs e com forças iônicas variando através da adição de um sal neutro.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar dados de equilíbrio de fases para SABs formados por PEG (4000, 6000 e 8000 g.mol⁻¹), tampão citrato (pHs 5,0, 6,0 e 7,0) e água a temperatura de 25 °C através dos métodos *cloud-point* e densimetria;
- Comparar as curvas binodais obtidas pelo método *cloud-point* às linhas de amarração obtidas pelo método densimétrico;
- Estudar a influência da massa molar do PEG e do pH da solução de tampão citrato sobre a área das curvas binodais e inclinação das linhas de amarração obtidas;
- Estudar a influência da massa molar do PEG, da porcentagem do PEG, da porcentagem do tampão citrato e do pH sobre a partição de IgG a partir de uma solução sintética contendo exclusivamente IgG;
- Validar estatisticamente os dados de partição obtidos;
- Estudar a influência da adição de um sal neutro (NaCl) sobre a partição de IgG nos SABs que apresentaram os melhores resultados de coeficiente de partição (K_p).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são proteínas biologicamente ativas encontradas no plasma sanguíneo, produzidas em resposta à presença de substâncias estranhas ao organismo, sendo, portanto, importantes componentes do sistema imune animal (BERELI *et al.*, 2006; ROQUE *et al.*, 2007). Correntemente, quando se fala em imunoglobulina refere-se tanto a imunoglobulina como a anticorpo, entretanto imunoglobulina é aquela que está expressa na membrana do linfócito B, que lá está acoplada, enquanto que anticorpos são as imunoglobulinas que foram secretadas. De qualquer forma, a especificidade dos anticorpos que foram secretados é exatamente igual àquela da imunoglobulina membranar (KINDT *et al.*, 2008).

Todas as imunoglobulinas, independente das suas especificidades, tem uma estrutura comum (Figura 1) com quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas (H) idênticas, cada uma com grupos de oligossacarídeos ligados covalentemente; e duas cadeias leves (L) idênticas não-glicosiladas. Todas as quatro cadeias polipeptídicas contém regiões constantes (C) e variáveis (V). As cadeias H e L tem uma região V única. Em relação às regiões C, as cadeias L tem uma única, enquanto que as cadeias H têm três (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002). As regiões V de ambas as cadeias H e L se combinam para formar dois sítios idênticos de ligação ao antígeno, os fragmentos Fab (ROQUE *et al.*, 2007), e as regiões C restantes, chamadas de fragmentos Fc, são responsáveis pelas atividades biológicas da imunoglobulina, tais quais ativar linfócitos T, ativar o complemento e promover a fagocitose (RAMALHO, 2007).

As imunoglobulinas são divididas em cinco classes principais de acordo com os componentes das cadeias H. A IgG tem uma cadeia H do tipo γ (gama), enquanto a IgA, a IgD, a IgE e a IgM, tem cadeias H dos tipos α (alfa), δ (delta), ϵ (épsilon) e μ (miu), respectivamente (LEHNINGER, 1984). Em relação às cadeias L, existem dois tipos: λ (lambda) ou κ (capa), mas as duas tem que ser iguais em cada imunoglobulina (RAMALHO, 2007). IgG, IgD e IgE são secretadas na forma de monômeros; IgA no soro é encontrada na forma de monômero, mas em secreções como a saliva e lágrimas é encontrada principalmente na forma de dímeros, apresentando quatro sítios de ligação ao antígeno; a IgM, por sua vez, é composta por cinco

unidades monoméricas, tendo, portanto, dez sítios de ligação ao antígeno (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002). A Figura 2 mostra as estruturas características de cada classe de anticorpo.

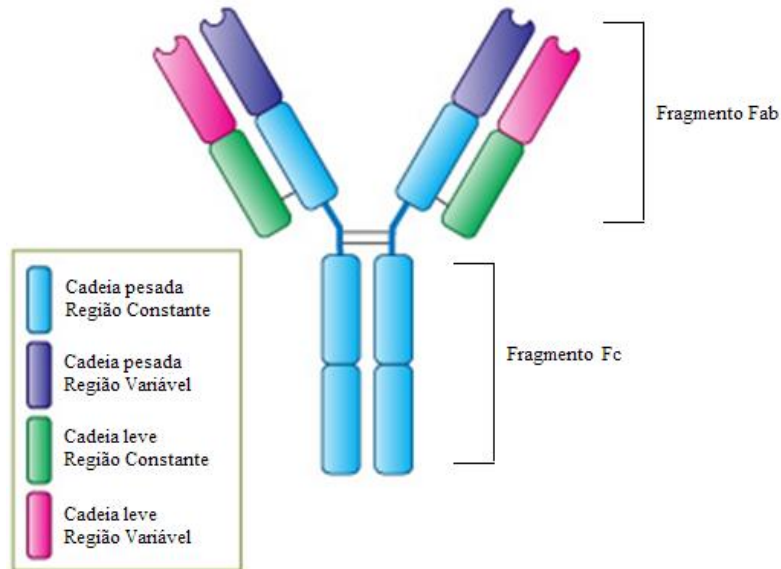


Figura 1. Estrutura básica H2L2 de uma imunoglobulina típica.
 Fonte: PORTAL DE ONCOLOGIA PORTUGUÊS (2013).

Classes de Anticorpos					
Característica	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Cadeia pesada	γ	μ	α	ϵ	δ
Cadeia Leve	κ or λ	κ or λ	κ or λ	κ or λ	κ or λ
Estrutura					

Figura 2. Estruturas características de cada classe de anticorpos.
 Fonte: Adaptado de AMERSHAM BIOSCIENCES (2002).

As imunoglobulinas da classe G (IgG) são as mais abundantes, correspondendo a 80% do total de Ig do soro (KINDT *et al.*, 2008) e exercem inúmeras funções biológicas importantes por interagirem com vários tipos de células (MARZOCCHI-MACHADO e LUCISANO-VALIM, 2005). A IgA é a segunda imunoglobulina sérica em maior quantidade, cerca de 15%, sendo a

principal classe de anticorpo nas secreções externas (saliva, lágrimas, muco bronquial e muco intestinal), de forma que protege o indivíduo contra microrganismos nas regiões onde se encontra (GRUMACH *et al.*, 1998). A IgM constitui aproximadamente 10% da composição sérica e por ser muito volumosa, devido aos cinco monômeros, está restrita quase inteiramente ao espaço intravascular, tendo como função suprimir parte da imunidade específica contra bactérias e vírus (VANÇAN, 1999). IgD e IgE são encontradas apenas em pequenas quantidades no soro, 0,2 e 0,004%, respectivamente; a função da IgE é ligar-se a alérgenos, enquanto a da IgD ainda não é conhecida. (LEHNINGER, 1984).

3.2. Imunoglobulina G

A IgG está presente no soro e nos tecidos e existe na forma de quatro subclasses: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄, que diferem quanto à quantidade de ligações dissulfeto entre as cadeias H e quanto ao tamanho da charneira – região rica em resíduos de prolina que permite à imunoglobulina ter alguma flexibilidade para se adaptar na ligação ao antígeno, podendo aumentar ou diminuir o ângulo formado pelos braços do Y (RAMALHO, 2007).

Entre as funções biológicas exercidas pela IgG, pode-se dizer que a mais importante é a ativação do complemento (HAMILTON, 2001), realizada com maior capacidade pela IgG₃, seguida da IgG₁ (AMARAL, 2002). Outra função vital da IgG humana é sua habilidade de se ligar aos receptores Fc das superfícies celulares, o que possibilita a complexação do anticorpo ao antígeno, facilitando a remoção de antígenos ou complexos imunes por fagocitose (HAMILTON, 2001).

Os anticorpos podem ser do tipo mono ou policlonais. Os anticorpos policlonais são aqueles derivados do plasma humano, produzidos no organismo por diferentes clones de células plasmáticas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002), enquanto que os anticorpos monoclonais são produzidos por células hidridoma – células imortais desenvolvidas pela primeira vez por Köhler e Milstein (1975) a partir da fusão de células de linfócitos B de um rato imunizado com células tumorais imortais derivadas de um mieloma de rato. Os anticorpos monoclonais são idênticos ao da célula de linfócito B original e, por isso, são altamente específicos.

Independente de serem mono ou policlonais, os anticorpos possuem alta afinidade e especificidade frente a alvos definidos e essas propriedades têm sido largamente exploradas para

diversas aplicações, incluindo pesquisa em biologia e biotecnologia, diagnósticos médicos e propostas médicas (HOLT *et al.*, 2003). Os anticorpos policlonais são usados para tratar deficiências imuno-adquiridas e genéticas, assim como várias doenças auto-imunes (DWYER, 1987), além de serem usados como reagentes em técnicas imunoquímicas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002). Os anticorpos monoclonais, por sua vez, tem sido aprovados para o tratamento de várias doenças como câncer (de mama, do tipo linfoma não-Hodgkin, do tipo leucemia, colorretal e de próstata), asma, rejeição de transplantes, doenças inflamatórias, cardiovasculares, infecciosas e auto-imunes (artrite reumatóide e doença de Crohn), além de serem utilizados em triagem clínicas e pré-clínicas (AZEVEDO *et al.*, 2009a, ROSA *et al.*, 2007a).

Apesar do sucesso, esses biofármacos são também os mais caros disponíveis no mercado, fazendo com que o mercado desses produtos seja um dos que cresce mais rapidamente e o mais lucrativo dentro da indústria farmacêutica (AZEVEDO *et al.*, 2009a). Diferentemente de outros produtos biotecnológicos aprovados até a metade da década de 90 que requerem pequenas quantidades de produto purificado, o tratamento à base de anticorpos requer altas doses por paciente (0,1 a 1,0 gramas ao invés de miligramas) para que o efeito desejado seja atingido, resultando em um custo anual por paciente que varia de U\$ 35 mil até U\$ 40 mil para o tratamento de um câncer, por exemplo (SHUKLA *et al.*, 2007; FARID, 2007; ROSA *et al.*, 2009b, ROSA *et al.*, 2010).

O alto custo desses produtos é justificado tanto pela dificuldade de produzi-los em grandes quantidades (FARID, 2007) como pela necessidade de obtê-los com um alto padrão de pureza, de forma que todas as impurezas incluindo DNA, partículas virais, endotoxinas e outros contaminantes sejam completamente removidos (CARSON, 2005). Nos últimos anos, a etapa *upstream* – que diz respeito à produção – tem recebido um considerável investimento em pesquisa e desenvolvimento, de forma que grandes avanços tecnológicos na cultura de células para obtenção de anticorpos monoclonais têm aumentando bastante a produtividade, levando à obtenção de vários gramas de anticorpos por litro de cultura celular ao invés de apenas poucos miligramas por litro (GOTTSCHALK, 2008). Essa melhora na produção leva à necessidade de se melhorar também a etapa *downstream* – relativa à purificação – que tem sido considerada um

gargalo na obtenção desses produtos, além de representar cerca de 50 – 80% do custo total de produção (ROQUE *et al.*, 2004; THIEL, 2004).

Os processos básicos da etapa *downstream* são (1) clarificação pela remoção de células e fragmentos de células por centrifugação ou microfiltração, (2) concentração por ultrafiltração, (3) etapas de purificação seletiva, (4) inativação e remoção de vírus e (5) testes de validação e controle de qualidade (NAVEH e SIEGEL, 1991). De acordo com Rosa *et al.* (2007a), as etapas 1, 2 e 4 correspondem a cerca de 10% dos custos totais de todo o processo de purificação, sendo a etapa 3 a que apresenta a maior necessidade de ser otimizada.

3.3. Técnicas de purificação de biomoléculas

A técnica mais usada na etapa de purificação seletiva é a cromatografia de afinidade com proteína A, que pode gerar em alguns casos um produto com mais de 98% de pureza, devido à alta afinidade da proteína A pelos fragmentos Fc do anticorpo (ZHOU *et al.*, 2006; SHUKLA *et al.*, 2007). Apesar disso, esta técnica apresenta várias desvantagens como a possibilidade de contaminação devido ao desprendimento da proteína da matriz, o que é intolerável em aplicações clínicas; o custo muito alto das resinas, tampões e outros consumíveis; a dificuldade de imobilização do ligante com orientação correta; a suscetibilidade à degradação durante procedimentos de limpeza; a baixa capacidade; a lenta difusão intraparticular; entre outras (BERELI *et al.*, 2006; HOBBER *et al.*, 2007; SERPA *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2010).

Devido a isso, os fabricantes de anticorpos estão buscando novas maneiras de realizar o processo de purificação. Entre as estratégias estão a diminuição do número de etapas, evitando-se etapas complexas; a redução dos custos das matérias-primas e o uso de formas alternativas para as operações unitárias de recuperação e purificação das biomoléculas (LOW *et al.*, 2007), que incluem outros tipos de cromatografia e técnicas não cromatográficas, tais quais precipitação (YVER e PRZYBYCIEN, 1994; YVER e PRZYBYCIEN, 1995), cristalização (LEE *et al.*, 2000), adsorção em membrana (BOI, 2007; VAN REIS e ZYDNEY, 2007), separação magnética (HUBBUCH *et al.*, 2001) e sistemas aquosos bifásicos (ALBERTSSON, 1986; WALTER *et al.*, 1985; ZASLAVSKY, 1994).

A precipitação é um dos métodos de fracionamento mais simples; sob condições amenas, a precipitação da proteína é reversível e a dissolução subsequente restaura a atividade total.

Entretanto, é uma técnica de separação de baixa resolução devido à ausência de especificidade, além de apresentar, quando realizada em larga escala, desvantagens como o alto custo dos agentes precipitantes e o impacto ambiental causado pelo descarte dos seus resíduos (ROSA *et al.*, 2010).

A cristalização é uma tecnologia barata e que realiza simultaneamente a concentração, a purificação e a estabilização do produto alvo, mas a sua implementação em um processo em larga escala para separação e purificação de anticorpos terapêuticos é inviável devido ao grande tamanho destes, à glicosilação e ao alto grau de flexibilidade segmental, além da inerente complexidade do processo e das dificuldades em controlá-lo (GOTTSCHALK, 2008; THOMMES e ETZEL, 2007; LOW *et al.*, 2007).

A adsorção em membrana, apesar de estar crescendo como uma alternativa à tradicional cromatografia em coluna, apresenta algumas limitações que precisam ser superadas antes da implantação dessa técnica em um processo de larga escala. Entre esses problemas podem-se citar a distribuição distorcida do fluxo de injeção, a distribuição de tamanho não-idêntica dos poros da membrana, a desigualdade da espessura da membrana e a baixa capacidade de ligação (THOMMES e ETZEL, 2007; GHOSH, 2002; ZHOU *et al.*, 2006).

As colunas de separação magnética são feitas com partículas superparamagnéticas pequenas (sub-micron), obtidas de cristais magnéticos, revestidas com poliglutaraldeído. Essas partículas têm sido utilizadas para a purificação de enzimas, enquanto um novo adsorvente magnético tem sido usado para purificação de IgG em um leite fluidizado magneticamente estabilizado (ÖSKARA *et al.*, 2004). Certas bactérias também tem habilidade para produzir partículas magnéticas que podem ser fabricadas para dispor de proteína A em suas superfícies, de forma a viabilizar economicamente a técnica caso a capacidade para anticorpos seja suficientemente alta (YOSHINO e MATSUNAGA, 2006).

O uso de sistemas aquosos bifásicos (SABs), no processo de purificação dos anticorpos, tem sido relatado desde os anos 90 como uma alternativa viável (AZEVEDO *et al.*, 2009b) para substituir a convencional extração líquido-líquido. Diferentemente desta última, que também consiste em sistemas de pelo menos duas fases imiscíveis, mas apresenta uma delas rica em solvente orgânico, o que leva à desnaturação de biomoléculas, os SABs apresentam alto conteúdo de água (80–90% em massa), promovendo um ambiente adequado para a manutenção da atividade biológica e solubilidade protéica (SCHÜGERL e HUBBUCH, 2005).

3.4. Sistemas aquosos bifásicos (SABs)

Sistemas aquosos bifásicos (SABs) resultam da incompatibilidade entre duas soluções aquosas de componentes diferentes estruturalmente, tais como dois polímeros, ou um polímero e um sal, acima de certa concentração crítica (ALBERTSSON, 1986 apud ROSA *et al.*, 2010). No primeiro caso, quando os dois polímeros são misturados, grandes agregados se formam e os dois polímeros tendem a separar-se em duas fases diferentes, devido, entre outros fatores, à exclusão estérica. Um fenômeno semelhante de exclusão é observado para o segundo tipo de sistema, uma vez que o sal irá captar uma grande quantidade de água presente no meio, forçando a exclusão do polímero da mistura (ASENJO e ANDREWS, 2011).

Devido ao alto conteúdo de água presente nesse tipo de sistema, os SABs dispõem de um ambiente suave que preserva biomateriais lábeis, isto é, são altamente biocompatíveis; apresentam baixa tensão interfacial, o que favorece a migração das biomoléculas através da interface, minimizando a degradação do produto; e possibilitam o aumento da escala linearmente em até 104 vezes, facilitando a aplicação industrial (PEREZ *et al.*, 2013; NUCCI *et al.*, 2001). Além disso, os SABs apresentam como vantagens o uso de materiais de baixo custo e a possibilidade de reciclagem dos polímeros e sais (PESSOA JÚNIOR, 2001; ZASLAVSKY, 1994).

A utilização dos SABs é adequada para recuperação primária (COLLÉN *et al.*, 2001), como mostra a Figura 3, pois misturas complexas, como caldo de fermentação contendo materiais particulados, podem ser diretamente carregadas sem centrifugação ou filtração prévia, o que resulta na integração em uma única operação unitária das etapas de clarificação, concentração e purificação parcial da biomolécula alvo (RITO-PALOMARES e LYDDIATT, 2002; SCHÜGERL e HUBBUCH, 2005).

Para propósitos industriais, sistemas do tipo polímero/sal são os mais comumente usados, devido ao mais baixo custo, maior diferença de densidade entre as fases, menor viscosidade e menor tempo de separação de fases que estes apresentam quando comparados a sistemas polímero-polímero, entretanto, deve-se levar em consideração qual o sal a ser utilizado, pois um descarte com altas concentrações deste resulta em um problema ambiental (SILVA, 2007; MALPIEDI *et al.*, 2008). O polímero mais utilizado é o polietilenoglicol (PEG), devido ao seu baixo custo, enquanto que o sal que tem sido utilizado preferencialmente nos últimos anos é o citrato de sódio, devido à sua biodegradabilidade.

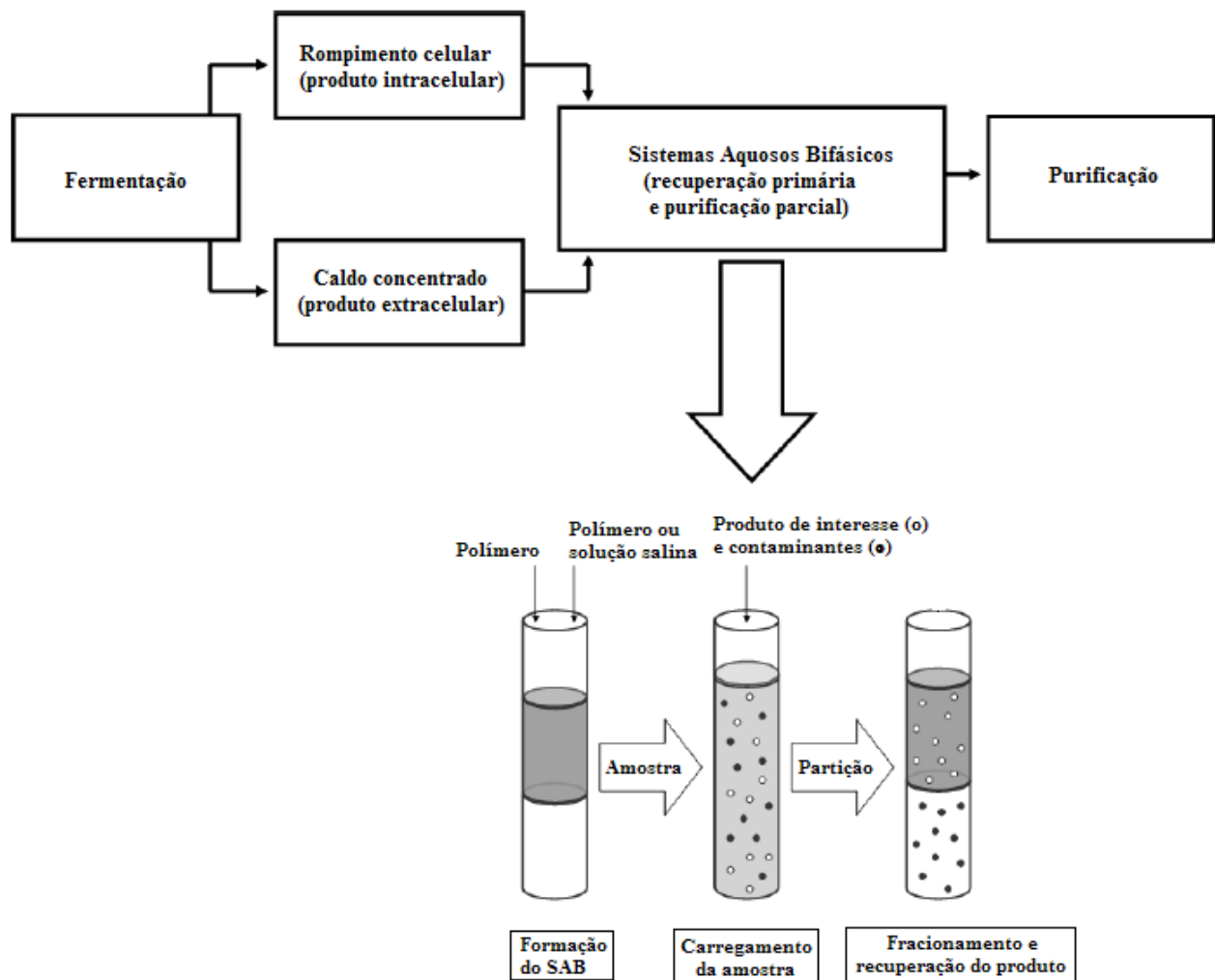


Figura 3. Representação da partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos.
 Fonte: Adaptado de BENAVIDES *et al.*, 2008.

O PEG é um poliéter neutro, solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos e que pode ser produzido com diferentes massas molares – desde centenas a milhares de Daltons. É uma substância de grande interesse para a comunidade biotécnica e médica, uma vez que não é tóxico, não desnatura proteínas ou células ativas, é fracamente imunogênico e pode ser facilmente modificado quimicamente, o que permite a sua anexação a outras moléculas e superfícies (PESSOA JÚNIOR, 2001).

O citrato de sódio é um sal tribásico, que por ser a base conjugada do ácido cítrico, um ácido fraco, pode formar um agente tamponador que resiste a mudanças no pH. Muito utilizado na indústria alimentícia como aditivo ou conservante, o citrato começou a ser estudado como substituinte de sais de fosfato para a formação de SABs (SILVÉRIO *et al.* 2012;

PERUMALSAMY *et al.*, 2007; JAYAPAL *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2008; TUBÍO *et al.*, 2006; MURUGESAN e PERUMALSAMY, 2005) devido a sua não-toxicidade e biodegradabilidade, de forma que o descarte desses resíduos não ocasionasse problemas ambientais (PORTO *et al.*, 2011).

3.5. Diagramas de Equilíbrio

Os SABs são representados por um diagrama de equilíbrio (Figura 4), que é formado pelas linhas de amarração (LA) ou linhas de amarração e pela curva binodal. Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo da abscissa e da ordenada, respectivamente (SILVA, 2007). A composição dos sistemas é expressa em porcentagem mássica (% m/m), que é a razão entre a massa do polímero na fase superior e a massa do sal na fase inferior (ESMANHOTO, 2002).

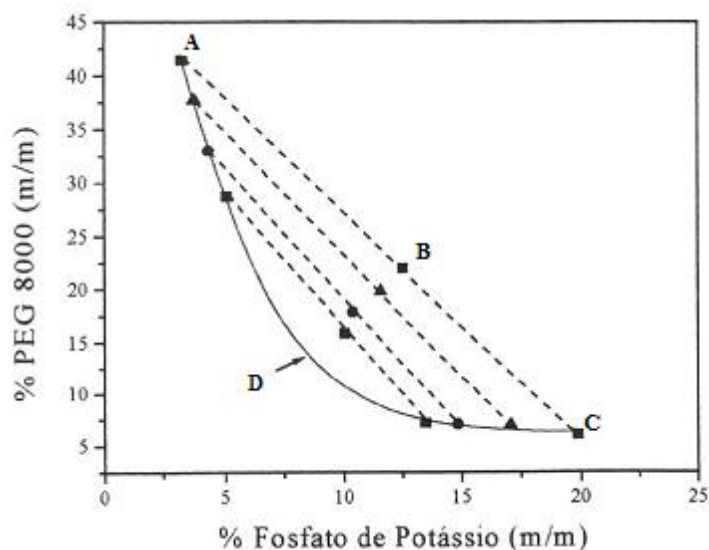


Figura 4. Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio (--) linhas de amarração, (—) curva binodal.

Fonte: SILVA (2000).

As linhas de amarração são obtidas através da união dos pontos que representam as concentrações dos componentes nas fases superior e inferior com o ponto da concentração mássica global do sistema (A, B, C). Qualquer ponto sobre elas representa um sistema com a mesma composição global, porém com diferentes volumes das fases superior e inferior. O

comprimento e a inclinação da linha de amarração podem ser calculados para que haja um maior entendimento da composição das fases e de como essa composição pode variar com a alteração de uma propriedade física do sistema, respectivamente (SILVA, 2007).

A curva binodal divide o diagrama de equilíbrio em duas regiões, monofásica e bifásica, e é traçada pela união dos pontos extremos das linhas de amarração. A região acima da curva é a bifásica e a abaixo é a monofásica. Quanto maior a área acima da curva binodal, menor é a quantidade dos componentes requerida para que haja a separação das fases (SILVA, 2000).

Chama-se ponto crítico (D) o ponto que divide a parte da binodal que reúne as fases ricas em polímero àquela parte contendo as fases ricas em sal, no caso do sistema abaixo. Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico (D) menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSON, 1986).

O diagrama de equilíbrio é construído a partir da determinação da composição das fases em equilíbrio. O método mais prático, porém menos preciso por ser uma análise visual e, portanto, subjetiva, é o de titulação turbidimétrica ou *cloud-point*. Nesse método a uma massa conhecida da solução de um dos componentes adiciona-se a solução do outro componente gota a gota e sob constante agitação até que o sistema fique e mantenha-se turvo, indicando que o mesmo entrou na região de duas fases (inicialmente o sistema é bem transparente). Depois, pesa-se o sistema e determina-se a massa do componente adicionado, já que a massa inicial era conhecida. Adicionando-se água o sistema volta à região monofásica, ficando transparente novamente. Repetindo-se o processo obtêm-se os demais pontos do diagrama (PESSOA JÚNIOR e KILIKIAN, 2005).

3.6. Fundamentos termodinâmicos sobre a formação dos SABs

A formação de duas fases durante o processo de mistura de soluções aquosas de dois polímeros (ou de um polímero e de um sal) dependerá das interações intermoleculares – expressas em termos da energia livre de Gibbs – entre os constituintes formadores do sistema (DA SILVA & LOH, 2006). Para que ocorra a separação de fases é necessário que a energia livre de Gibbs do

sistema seja minimizada. Quando PEG, sal e água são misturados, uma solução é formada em decorrência da energia livre de Gibbs (G) da solução ser menor do que o somatório das energias livres de Gibbs dos componentes puros, como relacionado pela Equação 1 (CARVALHO, 2004):

$$G_{\text{sol}} < G_{\text{PEG}}^* + G_{\text{sal}}^* + G_{\text{água}}^* \quad (1)$$

em que G_{sol} a energia livre de Gibbs da solução; o asterisco corresponde a cada componente no seu estado puro.

A determinada proporção dos três componentes misturados forma-se um sistema aquoso bifásico. As duas fases líquidas serão formadas após o tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido. A formação do SAB ocorre, pois o somatório da energia livre de Gibbs de cada fase é menor do que a energia livre de Gibbs da solução naquelas concentrações de polímero e de sal, como mostra a Equação 2 (CARVALHO, 2004).

$$G_{\alpha} + G_{\beta} < G_{\text{sol}} \quad (2)$$

em que G_{α} e G_{β} as fases do sistema aquoso bifásico.

A partir da definição da energia livre de Gibbs, podem-se vincular os efeitos entálpicos e entrópicos (Equação 3):

$$\Delta_{\text{mis}}G = \Delta_{\text{mix}}H - T\Delta_{\text{mix}}S \quad (3)$$

em que H a entalpia, S a entropia, T a temperatura e o subscrito mis relativo à mistura.

Pode-se dizer, então, que para que ocorra a formação do sistema de duas fases aquosas de PEG e sal é necessário que a compensação dos fatores entálpicos e entrópicos resulte na minimização da G.

A dissolução do Na_2SO_4 em solução aquosa de PEG é um processo exotérmico (DA SILVA & LOH, 2000), isto significa que na formação de uma solução aquosa de PEG e sal a liberação de energia na formação das interações (PEG-água, íon-água e PEG-íon) é maior do que a quantidade de energia absorvida na quebra das interações entre os componentes puros. Desta

forma, a variação da entalpia de solução na formação da solução aquosa de PEG e sal é exotérmica, ou seja, negativa e favorável para a minimização de G (CARVALHO, 2004).

Para avaliar o efeito entrópico, deve-se analisar a entropia de duas maneiras: em relação à configuração (número de formas diferentes de se arranjar as moléculas na solução) e em relação à conformação (estrutura molecular) (CARVALHO, 2004).

Existem 3 tipos de contribuição para a entropia configuracional do sistema: 1 - a entropia configuracional aumenta quando se misturam os três componentes do sistema, pois o aumento do tipo e da quantidade de substâncias aumenta o número de formas diferentes de se arranjar as mesmas na solução; 2 - a entropia configuracional diminui devido às interações PEG-água, íon-água, uma vez que as mesmas são caracterizadas pela formação de camadas de solvatação ao redor das moléculas de PEG e dos íons, o que diminui a entropia translacional das moléculas de água, ou seja, o grau de liberdade translacional das moléculas de água diminui devido à solvatação; e 3 - a entropia configuracional aumenta devido às interações íon-PEG, pois para que os íons se aproximem da cadeia do polímero, as moléculas de água que antes solvatavam os íons e o PEG devem ser afastadas possibilitando a aproximação do sal com o polímero e a interação íon-PEG. À medida que as moléculas de água são liberadas das camadas de solvatação, o grau de liberdade translacional das mesmas aumenta, com consequente incremento da entropia configuracional do sistema (CARVALHO, 2004).

Em relação à entropia conformacional, esta é relacionada ao polímero e irá variar com a sua concentração na solução. Em soluções diluídas do polímero, as ligações carbono-carbono estão na forma TRANS, devido à sua interação com as moléculas de água, tornando a cadeia da macromolécula linear. Ao concentrar uma solução polimérica, a conformação muda espontaneamente para a forma CIS, pois as ligações passam da forma TRANS para a CIS (enovelada e mais energética) aumentando a diferença de entropia entre as fases do sistema (CARVALHO, 2004).

3.7. Fatores que influenciam a partição em SABs

Quando materiais biológicos são adicionados em SABs, os mesmos se distribuem entre as duas fases e essa distribuição é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de

partição, K_p , que é definido pela relação entre as concentrações da biomolécula nas fases superior e inferior (ALBERTSSON, 1986), como mostra a Equação 4:

$$K_p = \frac{C_T}{C_F} \quad (4)$$

em que C_T e C_F são as concentrações de equilíbrio da biomolécula particionada nas fases topo e fundo, respectivamente.

Para que uma purificação parcial significativa seja alcançada, a biomolécula de interesse deve ser preferencialmente particionada para uma das fases, enquanto que as outras substâncias interferentes do processo de extração devem migrar para a outra fase do sistema (OLIVEIRA *et al.*, 2001). A distribuição desigual da biopartícula entre as duas fases é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a proteína e as outras espécies (polímeros, H_2O e/ou sais inorgânicos) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (FARRUGGIA *et al.*, 2003).

A proteína interage com as moléculas vizinhas dentro de uma fase através de várias ligações, tais quais ligações de hidrogênio, iônicas e interações hidrofóbicas, além de outras forças fracas, como as ligações de van der Waals. A interação é comumente diferente nas duas fases, o que resulta na partição preferencial da proteína por uma das fases (ASENJO e ANDREWS, 2011). Os fatores que influenciam a partição são massa molar, tamanho e concentração dos polímeros e da biomolécula, temperatura, pH, força iônica e outras variáveis, sendo a seleção do sistema de fases o passo chave do trabalho de partição (HARTOUNIAN *et al.*, 1994; SILVA, 2000).

Em geral, o aumento da MM do polímero, que enriquece uma das fases, causará a migração do biocomposto para a outra fase (ALBERTSSON, 1986). De acordo com Da Silva e Loh (2006), o aumento no grau de polimerização do polímero formador do SABs acaba diminuindo a entropia configuracional da fase enriquecida neste polímero, reduzindo o valor da entropia de transferência da proteína para esta fase. Entretanto, este efeito diminui com o aumento da cadeia polimérica (ALBERTSSON, 1986) e depende da massa molar da biomolécula a ser separada, sendo as proteínas com massas moleculares maiores, mais influenciadas pelas mudanças na massa molar do polímero (ASENJO, 1990 apud MARQUES, 2010). Em relação à concentração do polímero, sabe-se que próximo do ponto crítico de um sistema aquoso bifásico, as biomoléculas migram quase que igualmente para as duas fases. Portanto, se a concentração do

polímero for aumentada, o valor de K_p poderá aumentar ou diminuir de acordo com o deslocamento do sistema (PESSOA JÚNIOR, 2001)

Outra propriedade físico-química que influencia marcadamente a partição de uma proteína é o pH, uma vez que sua carga global muda com a acidez da solução (WALTER e JOHANSSON, 1994). As biomoléculas em geral contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos com diferentes valores de pK_a , resultando em cargas elétricas que são funções dos valores de pH. Esta densidade de carga elétrica na superfície da proteína pode modificar como processos de associação ou dissociação entre as macromoléculas presentes no sistema. (DA SILVA e LOH, 2006). Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas (ALBERTSSON, 1986).

A adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados (SARUBBO, 2000). A adição de sais neutros, tais como NaCl, em um sistema PEG/dextrana tende a diminuir o coeficiente de partição das proteínas carregadas negativamente e tende a aumentar o coeficiente de partição das proteínas carregadas positivamente (PORTO, 2004).

A temperatura tem um complexo efeito na partição. De acordo com Ahuja (2000), temperaturas mais baixas resultam em polímeros com maiores viscosidades, o que provavelmente aumenta a diferença entre as fases, direcionando a biomolécula preferencialmente para uma delas. Entretanto, enquanto alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON *et al.*, 1984; ZASLAVSKY, 1994); outros não observaram relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD *et al.*, 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

3.8. Trabalhos relacionados

Azevedo *et al.* (2008) avaliaram um processo que incorporava três técnicas (sistemas aquosos bifásicos, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de exclusão por tamanho) para a purificação de imunoglobulina G humana (IgG) a partir de células sobrenadantes de ovário de hamster chinês. Em relação à primeira técnica, os SABs, foram utilizados PEG 3350 e solução de tampão citrato com pH 6,0 para compor as duas fases e estudou-se também a influência da adição de NaCl na partição das biomoléculas. Os sistemas eram compostos por 10, 15 e 20% (m/m) de PEG, 8, 10 e 12% (m/m) de tampão e 0 e 15% (m/m) NaCl. Todas as composições de sistema avaliadas sem NaCl originaram rendimentos de recuperação muito elevados na fase fundo, exceto para o sistema 20% de PEG/ 12% de tampão citrato, para os quais foi observada uma diminuição significativa na produção de IgG total, provocada pela precipitação de IgG na interface e causada pela concentração extremamente elevada de citrato desta fase fundo. Por outro lado, todos os sistemas com 15% NaCl apresentaram índices de recuperação abaixo de 80%, que são muito menores do que os correspondentes aos sistemas sem NaCl.

Azevedo *et al.* (2009a) estudaram a partição e purificação de IgG em SABs compostos por PEG 1000, 3350 ou 6000 e tampão citrato com pH 6,0 na ausência ou presença de NaCl. O estudo de partição foi feito a partir de uma solução contendo exclusivamente IgG em sistemas compostos por 10, 15 e 20% (m/m) de PEG, 8, 10 e 12% (m/m) de tampão e 0, 5, 10 e 15% (m/m) NaCl. Nos sistemas com PEG 1000 quase toda a IgG precipitou devido à alta concentração de tampão requerida para a formação das duas fases. Nos sistemas compostos por 15% de PEG (3350 e 6000) e 10% de tampão, a IgG particionou quase que exclusivamente para a fase fundo (rica em tampão) na ausência de NaCl e só mostrou comportamento inverso – partição para a fase topo – quando a concentração de NaCl era maior que 10%. O estudo de purificação foi feito com uma mistura de proteínas contendo 1 g/L de IgG, 10 g/L de albumina e 2 g/L de mioglobina apenas nos sistemas com PEG 3350, pois foram os que apresentaram os maiores valores de K_p obtidos no estudo de partição realizado previamente. Para os sistemas sem NaCl, IgG, albumina e mioglobina particionaram principalmente para a fase fundo, enquanto que para os sistemas com 15% NaCl, a IgG particionou principalmente para a fase topo e as outras proteínas para a fase fundo.

Lee e Forciniti (2010) estudaram a purificação de IgG recombinante expressa em milho em sistemas compostos por PEG (1450, 3350, 8000 e 10000)/tampão fosfato (pH 6,0, 7,0 e 8,0) e

por PEG 3350/tampão citrato (pH 4,0, 5,0 e 6,0), com ou sem adição de NaCl. Particularmente para os sistemas com tampão citrato, a IgG precipitou quando se trabalhou no pH 4,0. A purificação se deu em dois estágios, sendo o primeiro o de extração e o segundo de precipitação. Para os sistemas com pH 5,0 utilizaram-se no estágio de purificação 12 ou 13% de PEG/17 ou 18% de tampão e no estágio de precipitação utilizou-se 16% de PEG/ 20 ou 21% de tampão. Para os sistemas com pH 6,0, as concentrações para o primeiro estágio foram 10% de PEG/14 ou 15% de tampão e para o último estágio 13 ou 14% de PEG/17 – 19% de tampão. Nos sistemas com pH 5,0, conseguiu-se uma pureza de até 36%, entretanto com uma recuperação de apenas 55%. Foi observado que a diminuição da concentração de citrato levava a uma diminuição na recuperação, mas a um aumento na pureza. Os resultados obtidos no pH 6 mostraram resultados consistentes para a recuperação (47 – 59%), mas com grandes diferenças na pureza (20 – 40%). Verificou-se que uma diminuição na concentração de sal na primeira fase favoreceu a compartimentação de impurezas na fase superior.

Mao *et al.* (2010), estudaram a extração de IgG a partir de um fluido de cultura de células clarificado obtido por centrifugação e microfiltração de células de ovário de hamster chinês, por meio do uso de SABs compostos por PEG 3350 e tampão citrato (pH 5,5, 6,4 e 7,2), com adição de NaCl. As concentrações dos componentes dos sistemas eram iguais a 8 e 15% de PEG, 8, 10 e 12% de tampão citrato e 8, 11,5 e 15% de NaCl. Como resultado de uma análise estatística, a porcentagem de NaCl foi determinada como o fator significativo. A partição do anticorpo aumentou com o aumento da concentração do NaCl, porque a presença do sal no meio aumenta a diferença na hidrofobicidade entre as duas fases. Os autores afirmaram ainda que o pH é outro fator importante no direcionamento da partição das biomoléculas, apesar de seu efeito não ter sido notado devido à pequena faixa estudada ou ao efeito mascarante causado pelo NaCl.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para o levantamento dos diagramas de fase foram utilizados PEGs 4000, 6000 e 8000 g.mol⁻¹ (Sigma Aldrich), citrato de trisódio diidratado (Vetec), e ácido cítrico monohidratado (Dinâmica). Tanto os polímeros quanto os sais foram usados sem purificação prévia.

Para a obtenção dos dados de partição foram utilizados, além dos reagentes citados anteriormente, γ -globulinas de soro humano (Sigma Aldrich) e cloreto de sódio P.A. (Vetec).

4.2. Construção das curvas binodais pelo método *cloud-point*

As soluções aquosas de PEG foram preparadas na concentração de 50% m/m, enquanto as soluções de tampão citrato 40% m/m com pHs 5,0, 6,0 e 7,0 foram preparadas adicionando-se quantidades apropriadas da solução de ácido cítrico 40% m/m na solução de citrato de sódio 40% m/m. Utilizou-se um pHmetro Digimed DM-22 para auxiliar no ajuste do pH das soluções tampão.

As curvas binodais foram determinadas pelo método *cloud-point*. Dessa forma, a solução de tampão citrato foi gotejada em uma massa conhecida da solução de PEG, sob agitação, até que o sistema se tornasse turvo, o que indicava que o sistema havia atingido a região bifásica. Deve-se mencionar que inicialmente o sistema era transparente. A massa da solução tampão foi obtida por gravimetria, utilizando-se uma balança eletrônica Tecnal modelo Mark 210A com precisão de 0,0001 g. Depois disso, uma massa conhecida de água foi adicionada ao sistema que se tornou transparente novamente. Esse procedimento foi repetido contínuas vezes até a obtenção de pontos suficientes para a formação da curva binodal de cada sistema.

4.3. Obtenção das linhas de amarração por densimetria

As linhas de amarração foram obtidas por densimetria, utilizando-se um equipamento DAS 5000M Anton Paar, com uma incerteza de 0,0005 g.cm⁻³. Primeiramente, curvas de calibração para cada fase (fase topo – rica em PEG, e fase fundo – rica em tampão citrato) foram construídas a partir de misturas com massas conhecidas de PEG, tampão citrato e água. A partir

dessas curvas, os parâmetros A, B e C (Equação 5) foram determinados para cada componente em cada fase e a equação pode providenciar as concentrações de PEG, tampão citrato e água em cada fase de sistemas onde apenas a composição total era conhecida.

$$y = A + Bx + Cx^2 \quad (5)$$

em que y é a densidade, x é a % m/m de PEG, tampão citrato e água, e A, B e C são parâmetros ajustáveis, como descrito acima.

As misturas ternárias de PEG + tampão citrato + água foram preparadas pesando-se as quantidades apropriadas das soluções de PEG e tampão citrato e a homogeneização destas foi feita utilizando-se um equipamento vortex durante 30 segundos, de forma a permitir um contato íntimo entre ambas as fases. As misturas foram deixadas em repouso por 24 horas, de forma a garantir a completa separação das fases. Após atingir o equilíbrio, foram feitas medidas de densidade de cada fase. Dessa forma, as concentrações de PEG, tampão citrato e água foram determinadas para cada fase e as linhas de amarração foram obtidas. A inclinação das linhas de amarração (STL) e o comprimento das linhas de amarração (TLL) foram calculadas utilizando-se as Equações 6 e 7, respectivamente.

$$STL = \frac{C_p^T - C_p^F}{C_s^T - C_s^F} \quad (6)$$

$$TLL = \left[(C_p^T - C_p^F)^2 + (C_s^T - C_s^F)^2 \right]^{1/2} \quad (7)$$

em que C_p^T e C_p^F são as concentrações do polímero nas fase topo e fundo, respectivamente, enquanto C_s^T e C_s^F são aquelas de tampão citrato, respectivamente.

4.4. Planejamento experimental para partição da IgG

Com bases nos dados dos diagramas de fase obtidos para cada sistema PEG (4000, 6000 e 8000)/Tampão citrato (pH 5,0, 6,0 e 7,0), escolheram-se três concentrações de PEG e tampão

citrato nos quais era observada a formação de duas fases e que eram comuns a todos os sistemas, para se realizar um estudo sobre a partição da IgG. As concentrações escolhidas em porcentagem de massa (% m/m) para o PEG foram 26, 28 e 30%, enquanto que para o tampão citrato foram 8, 10 e 12%.

Utilizou-se o *software* Statistica 7 para gerar um planejamento experimental padrão do tipo 2^k com resolução completa, onde k é o número de variáveis independentes e é igual a 4, a saber: porcentagem de PEG, porcentagem de tampão citrato, pH e massa molar do PEG. O planejamento, para o qual a variável de resposta é o coeficiente de partição da IgG, ficou composto por 19 experimentos, sendo 3 deles pontos centrais, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento experimental feito no *software* Statistica 7 para obtenção de dados de partição da IgG.

Experimento	pH	% Tampão	PEG	% PEG
1	5	8	26	4000
2	5	12	26	4000
3	5	8	30	4000
4	5	12	30	4000
5	5	8	26	8000
6	5	12	26	8000
7	5	8	30	8000
8	5	12	30	8000
9	6	10	28	6000
10	6	10	28	6000
11	6	10	28	6000
12	7	8	26	4000
13	7	12	26	4000
14	7	8	30	4000
15	7	12	30	4000
16	7	8	26	8000
17	7	12	26	8000
18	7	8	30	8000
19	7	12	30	8000

4.5. Obtenção dos coeficientes de partição

Os SABs foram preparados pesando-se quantidades apropriadas dos componentes. Utilizaram-se soluções aquosas de 50% m/m de PEG, de 40% m/m de tampão citrato, de 1 g/L de

IgG pura e água destilada. Admitiu-se que o pH dos sistemas era o mesmo da solução tampão utilizada. Uma curva de calibração para a IgG (Figura B1, Apêndice B) foi construída a partir de soluções aquosas contendo exclusivamente IgG nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 g.L⁻¹.

Os ensaios foram feitos em tubos de centrífuga de 50 mL. Foram feitos sistemas com e sem IgG (ensaio em branco). Todos os sistemas foram agitados em um equipamento vortex por 30 segundos e foram deixados por um período de 24 h em um banho termostático TE-2005 da Tecnal a 20°C. Os volumes das fases foram determinados e amostras das fases topo e fundo foram analisadas a 280 nm em um espectrofotômetro Biomate 3 da Thermo Scientific (USA).

4.6. Análise estatística dos dados de partição

A análise estatística dos dados de K_p foi feita no software Statistica 7 com um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Consideraram-se como fatores significativos na partição da biomolécula aqueles que apresentaram valores de probabilidade de significância (p-valor) menores do que α (RODRIGUES e IEMMA, 2009). O software também gerou dados de variância (média quadrática dos desvios), que é um parâmetro que descreve a dispersão ou a variabilidade de uma população. A partir destes dados calcularam-se os valores da soma quadrática da regressão (Equação 8), do grau de liberdade da regressão (Equação 9), da média quadrática da regressão (Equação 10) e o valor de F (Equação 11) (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

$$SQ_{reg} = SQ_{tot} - SQ_{erro} \quad (8)$$

$$GL_{reg} = GL_{tot} - GL_{erro} \quad (9)$$

$$MQ_{reg} = SQ_{reg}/GL_{reg} \quad (10)$$

$$F_{cal} = MQ_{reg}/MQ_{erro} \quad (11)$$

em que SQ_{reg} é a soma quadrática da regressão, SQ_{tot} é a soma quadrática total, SQ_{erro} é a soma quadrática do erro, GL_{reg} é o grau de liberdade da regressão, GL_{tot} é o grau de liberdade total, GL_{erro} é o grau de liberdade do erro, MQ_{reg} é a média quadrática da regressão, MQ_{erro} é a média quadrática do erro e F_{cal} é o fator F calculado.

4.7. Investigação do efeito do NaCl na partição da IgG

Baseando-se nos SABs que promoveram os maiores valores de K_p , estendeu-se a investigação sobre a influência da adição de NaCl na partição da IgG. Dessa maneira, um novo grupo de 27 experimentos foi realizado, fixando-se os valores das variáveis que se mostraram estatisticamente significativos e que providenciaram os melhores valores de K_p e variando-se a concentração molar de NaCl de 0 a 0,4 M. Os ensaios foram feitos da mesma maneira descrita no item 4.5, com a diferença de que foram adicionadas quantidades apropriadas de cloreto de sódio aos sistemas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Dados de equilíbrio

Os dados binodais para os sistemas PEG (4000, 6000 e 8000) + tampão citrato (pH 5,0, 6,0 and 7,0) a 25 °C são mostrados na Tabela A1 no Apêndice A. Os dados de regressão polinomial advindos das curvas de calibração feitas para que fosse possível a construção das linhas de amarração estão mostrados na Tabela A2, no Apêndice A. Pode-se observar que houve um bom ajuste ao modelo de regressão polinomial ($R^2 \geq 0.99$). A partir desses resultados, foi possível determinar os dados de equilíbrio que deram origem às linhas de amarração mostrados na Tabela A3 no Apêndice A.

A Figura 5 mostra uma boa concordância entre os dados obtidos pelos métodos *cloud-point*, utilizado na obtenção das curvas binodais, e densitometria, utilizado na obtenção das linhas de amarração, para o sistemas PEG 4000/Tampão Citrato pH 5,0, o que deixa claro que ambas metodologias são confiáveis para a obtenção de dados de equilíbrio. O mesmo comportamento foi observado para os outros sistemas e pode ser observado nas Figuras B2-B4 no apêndice B.

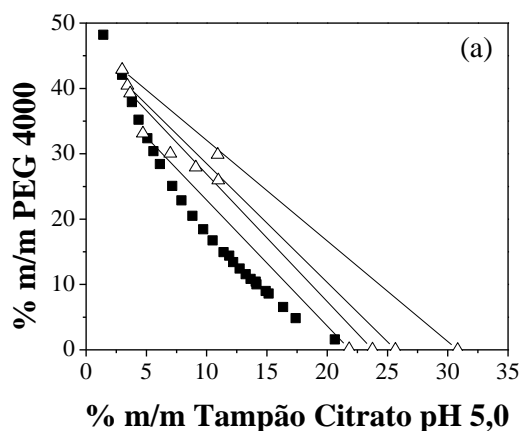


Figura 5. Linhas de amarração e curvas binodais para o sistema PEG 4000 + Tampão Citrato pH 5,0. (■) Método *cloud-point*, (△) Método densimétrico.

5.2. Efeito da massa molar no diagrama de fases

A influência da massa molar do PEG nos sistemas PEG/tampão citrato é mostrada na Figura 6. Pode-se observar que o aumento da massa molar do PEG leva a uma pequena expansão na região bifásica. De acordo com Asenjo e Andrews (2011), quanto maior a massa molecular do polímero, menor é a concentração necessária para a formação das duas fases, e quanto maior for a diferença entre as massas moleculares dos polímeros, mais assimétrica é a curva do diagrama de fases.

Tubío *et al.* (2006) verificaram em sistemas de PEG (600, 1000, 1450, 3350 e 8000)/citrato a 22 °C que as curvas binodais se tornaram assimétricas e mais próximas à origem com o aumento da massa molecular do PEG e, conseqüentemente menores concentrações de PEG eram necessárias para que ocorresse a separação de fases. De acordo com estes pesquisadores, isso acontece devido ao aumento da incompatibilidade entre os componentes do sistema uma vez que o PEG adquire um caráter mais hidrofóbico à medida que seu peso molecular aumenta.

Esse comportamento também foi observado nos trabalhos de Oliveira *et al.* (2008) para sistemas de PEG (1500 e 4000)/citrato a 5, 10, 25, 35 e 45 °C; e de Jayapal *et al.* (2007) para sistemas de PEG (2000 e 6000)/citrato a 25, 35, e 45 °C. De acordo com Oliveira *et al.* (2008), a região bifásica aumenta com o aumento da massa molar do PEG, provavelmente devido à alta hidrofobicidade do PEG e sua reduzida solubilidade em água, o que leva à exclusão do polímero da mistura e, conseqüentemente, à formação das duas fases.

Silvério *et al.* (2012) avaliaram não só a influência da massa molar dos PEGs (1500 e 8000), mas também a influência dos cátions e ânions dos sais utilizados (citrato de sódio, citrato de potássio, formato de sódio e formato de potássio em SABs a 23 °C. Além de observarem a formação de maiores regiões bifásicas para os sistemas com PEG 8000/sal do que para os compostos por PEG 1500/sal, observaram que a região bifásica para os sistemas que utilizaram os ânions citratos era extremamente maior do que quando o ânion formato foi utilizado, o que dá uma maior liberdade de escolha em relação às concentrações a serem utilizadas para a realização da partição de biomoléculas.

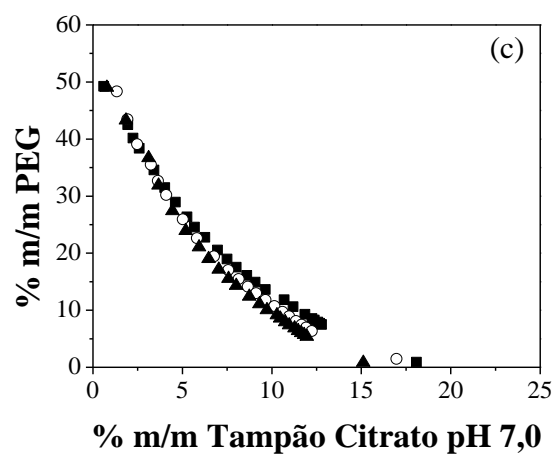
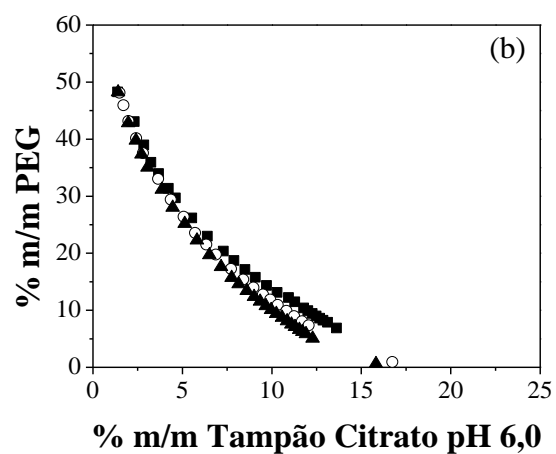
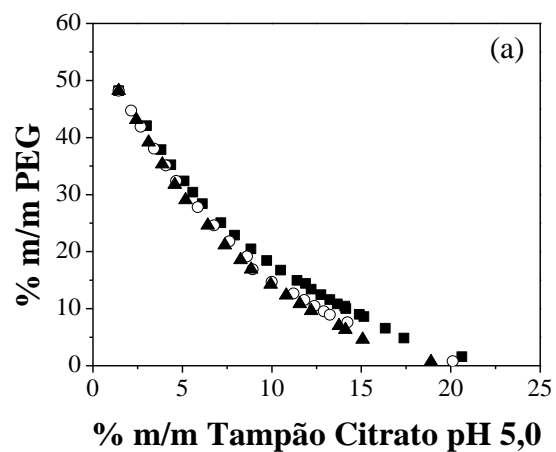


Figura 6. Curvas binodais para os sistemas PEG (■) 4000, (○) 6000, (▲) 8000 + Tampão Citrato com pH (a) 5,0, (b) 6,0 e (c) 7,0.

5.3. Efeito do pH no diagrama de fases

A influência do pH nos sistemas PEG/tampão citrato é mostrada na Figura 7. Percebe-se uma pequena expansão da região bifásica quando o pH varia de 5,0 para 6,0. Entretanto, não há praticamente diferença entre os diagramas de fases para os pHs 6,0 e 7,0.

O ânion citrato é uma espécie trivalente. À medida que se adiciona uma solução de ácido cítrico a uma solução de citrato de sódio, aumenta-se a quantidade de íons H^+ no meio, reduzindo-se o pH, e obtém-se um novo tipo de ânion, o divalente. Quanto menor o pH, menor é a concentração de íons trivalentes, o que faz com que a razão $HC_6H_5O_7^{-2}/C_6H_5O_7^{-3}$ aumente. De acordo com Tubío *et al.* (2006), os íons trivalentes são mais facilmente solvatados pelas moléculas de água e, portanto, mais eficientes na promoção da exclusão do polímero. Sendo assim, para maiores valores de pH, uma menor concentração de tampão é necessária para a formação das duas fases e, conseqüentemente, uma maior região bifásica é observada.

Acredita-se que para os sistemas PEG/citrato uma baixa concentração de íons trivalentes é requerida para causar a exclusão do polímero da fase rica em tampão, uma vez que o PEG é uma molécula grande e hidrofóbica. Essa concentração é obtida mesmo em condições ácidas menos drásticas, como nos pHs 6,0 e 7,0, onde a concentração dos íons trivalentes não é abundante, e devido a isso não é observada muita diferença entre as curvas binodais dos pHs 6,0 e 7,0.

Esses resultados são similares aos encontrados no trabalho de Tubío *et al.* (2006) para sistemas de PEG 3350/citrato a diferentes pHs (5,2, 8,2 e 9,2), no qual os diagramas de fases para os pHs 8,2 e 9,2 se sobrepõem da mesma forma que os diagramas do presente trabalho para os pHs 6,0 e 7,0. No trabalho de Porto *et al.* (2007), uma sobreposição nas curvas binodais dos sistemas PEG (400, 550, 1000, 1500, 3350 e 8000)/citrato (pH 6,0 – 8,0) também foi observada.

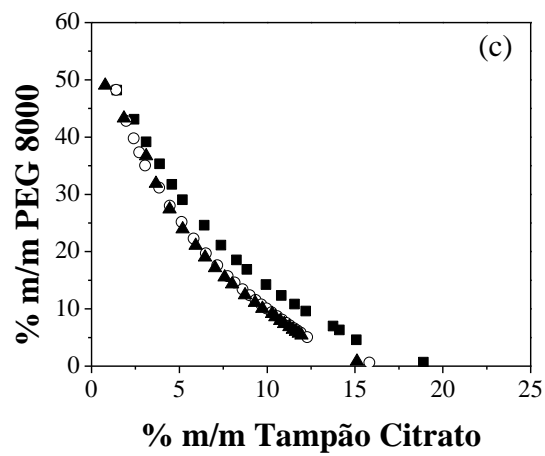
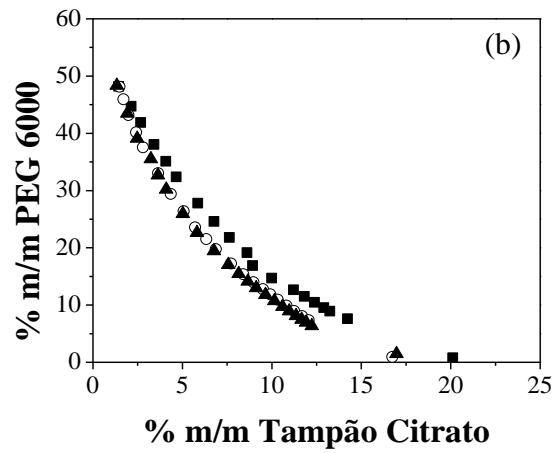
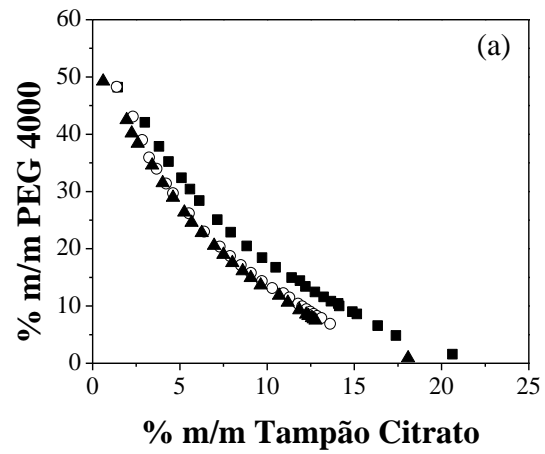


Figura 7. Curvas binodais para os sistemas PEG (a) 4000, (b) 6000 e (c) 8000 + Tampão Citrato pH (■) 5,0, (○) 6,0, (▲) 7,0.

5.4. Efeito da massa molar e do pH nas linhas de amarração

Os valores de STL e TLL são dados na Tabela 2. A Figura 8 mostra o efeito do pH, enquanto a Figura 9 mostra o efeito da massa molar nos valores de STL e TLL de todos os sistemas. É importante mencionar que não foram observadas mudanças significativas nesses valores quando se variou o pH e a massa molar.

A influência da massa molar e tipos de sais foi estudada por Silvério *et al.* (2012), que obtiveram valores similares de STL e TLL para os sistemas PEG 1500 e 8000 + citrato de sódio. Tubío *et al.* (2006) estudaram a influência tanto do pH, como da massa molar e da temperatura em sistemas compostos por PEG/citrato de sódio, e também não observaram diferenças significantes nos valores de STL e TLL quando os valores de pH ou massa molar foram variados. A influência do pH, da temperatura e do tipo de sal para sistemas compostos por UCON 50 HB-2000 + fosfato de potássio ou citrato de sódio foi estudada por Nascimento *et al.* (2011). Diferenças significativas nos valores de STL and TLL foram observadas quando se compararam as temperaturas 277,15 e 298,15 K, mas quando se aumentou o pH de 7,0 para 8,0 apenas uma pequena mudança foi observada. Todos os resultados mostram a alta capacidade dos íons citrato em se hidratar preferencialmente e promover quase totalmente ou totalmente a exclusão do PEG da fase fundo, como observado nesse trabalho.

Tabela 2. Valores de STL and TLL para os sistemas PEG (4000, 6000 e 8000) + Tampão Citrato (pH 5,0, 6,0 e 7,0).

Linha de amarração	PEG 4000		PEG 6000		PEG 8000	
	STL	TLL	STL	TLL	STL	TLL
pH 5,0						
1	-1,93	28,21	-1,68	46,01	-1,69	46,67
2	-1,95	44,02	-1,73	43,74	-1,69	44,10
3	-1,82	46,11	-1,73	28,76	-1,71	28,77
4	-1,54	32,59	-1,60	35,39	-1,62	36,13
pH 6,0						
1	-1,71	28,09	-1,85	31,84	-1,81	31,73
2	-1,67	41,71	-1,81	45,22	-1,80	44,79
3	-1,66	45,68	-1,75	47,99	-1,72	46,84
4	-1,63	34,53	-1,69	36,20	-1,64	35,28
pH 7,0						
1	-1,78	30,49	-1,69	28,13	-1,75	30,09
2	-1,73	44,19	-1,65	42,62	-1,74	44,29
3	-1,72	45,31	-1,63	44,43	-1,69	46,76
4	-1,64	35,43	-1,61	34,61	-1,61	34,47

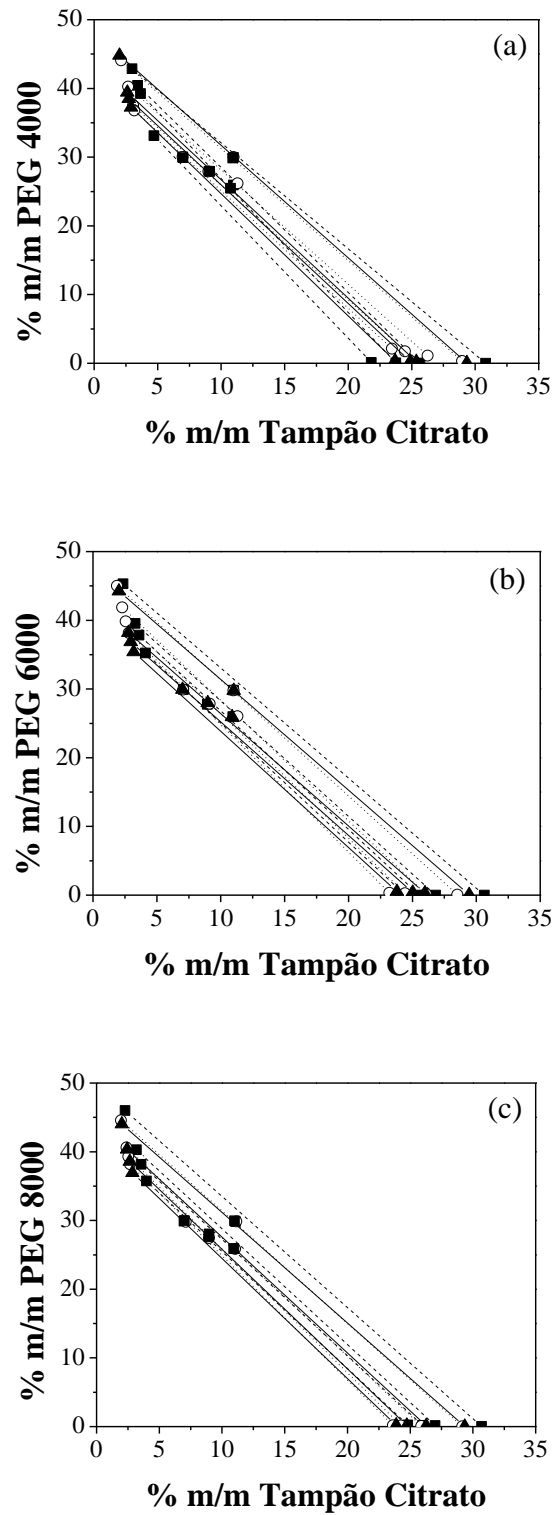


Figura 8. Efeito do pH no STL e TLL dos sistemas PEG (a) 4000, (b) 6000 e (c) 8000 + Tampão citrato pH (---■---) 5,0, (···○···) 6,0, (-▲-) 7,0.

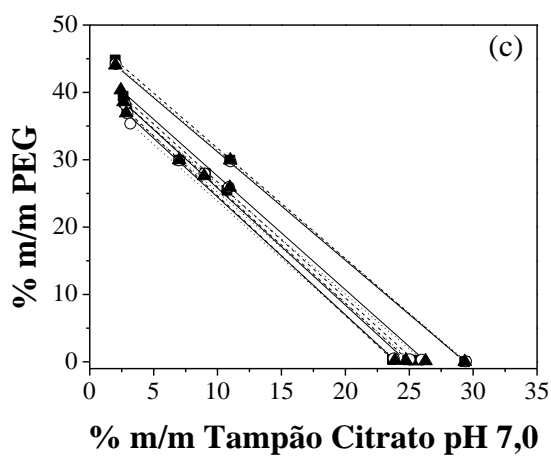
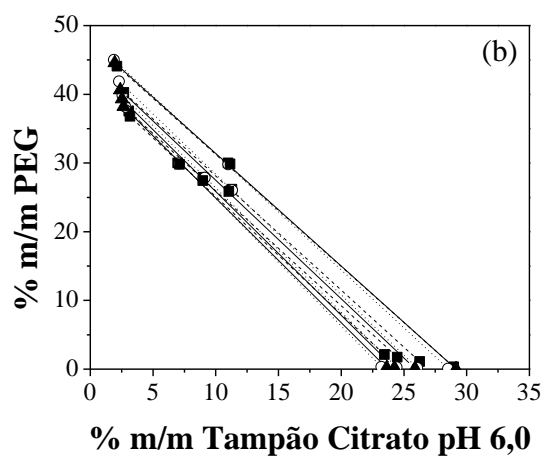
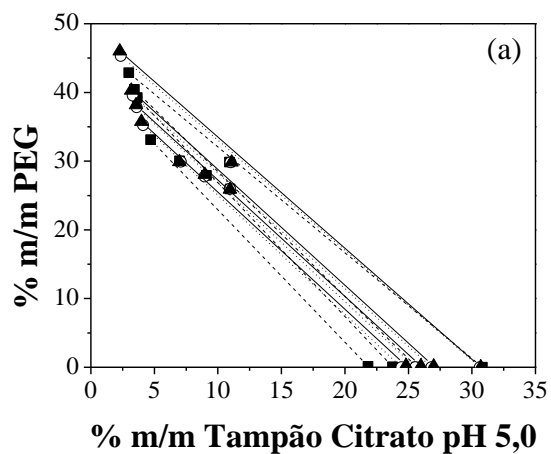


Figura 9. Efeito da massa molar no STL e TLL dos sistemas PEG (—■—) 4000, (···○···) 6000, (-▲-) 8000 + Tampão citrato pH (a) 5,0 (b) 6,0 e (c) 7,0.

5.5. Coeficientes de partição da IgG

A Tabela 3 mostra os valores de K_p obtidos para o grupo de 19 experimentos, onde se investigou a influência de quatro variáveis (tamanho da massa molar do PEG, porcentagem de PEG, porcentagem de tampão citrato e pH) na partição da IgG. A análise estatística feita no *software* Statistica 7 com um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) gerou as Tabelas 4 e 5. Na Tabela 4 pode-se ver que apenas os fatores pH e % de tampão apresentaram valores de probabilidade de significância (p-valor) menores do que α , indicando que apenas esses fatores são significativos no que diz respeito à partição da biomolécula. A partir dos dados da Tabela 5 obteve-se o valor de F calculado, mostrado na Tabela 6. Como o F calculado resultou em um valor maior do que o F tabelado (RODRIGUES e IEMMA, 2009), o estudo da partição se mostrou estatisticamente significativo.

Tabela 3. Valores de K_p e $\log K_p$ obtidos.

Experimento	pH	% Tampão	% PEG	MM PEG	K_p	$\log K_p$
1	5,0	8	26	4000	0,13	-0,89
2	5,0	12	26	4000	0,50	-0,30
3	5,0	8	30	4000	1,55	0,19
4	5,0	12	30	4000	1,33	0,12
5	5,0	8	26	8000	0,19	-0,73
6	5,0	12	26	8000	2,56	0,41
7	5,0	8	30	8000	0,86	-0,07
8	5,0	12	30	8000	3,52	0,55
9	6,0	10	28	6000	1,60	0,20
10	6,0	10	28	6000	1,19	0,07
11	6,0	10	28	6000	5,10	0,71
12	7,0	8	26	4000	0,80	-0,10
13	7,0	12	26	4000	7,34	0,87
14	7,0	8	30	4000	5,21	0,72
15	7,0	12	30	4000	7,30	0,86
16	7,0	8	26	8000	2,93	0,47
17	7,0	12	26	8000	9,44	0,98
18	7,0	8	30	8000	8,73	0,94
19	7,0	12	30	8000	10,04	1,00

Tabela 4. Estimativas por ponto, por intervalo e testes de hipóteses para os efeitos e coeficientes.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t_{calc}	p-Valor	Estimativas por Intervalo (95%)		Coeficiente	Erro Padrão do Coeficiente	Estimativas por Intervalo (95%)	
					L. Inferior	L. Superior			L. Inferior	L. Superior
					Média	3,70			0,38	9,86
(1) pH	5,14	0,82	6,29	0,00	3,26	7,03	2,57	0,41	1,63	3,52
(2) % Tampão	2,70	0,82	3,31	0,01	0,82	4,59	1,35	0,41	0,41	2,30
(3) % PEG	1,83	0,82	2,24	0,06	-0,05	3,72	0,92	0,41	-0,03	1,86
(4) PEG	1,76	0,82	2,16	0,06	-0,12	3,65	0,88	0,41	-0,06	1,83
1 x 2	1,41	0,82	1,72	0,12	-0,48	3,29	0,70	0,41	-0,24	1,65
1 x 3	0,86	0,82	1,05	0,32	-1,03	2,75	0,43	0,41	-0,51	1,37
1 x 4	0,86	0,82	1,05	0,32	-1,03	2,75	0,43	0,41	-0,51	1,37
2 x 3	-1,24	0,82	-1,52	0,17	-3,13	0,64	-0,62	0,41	-1,56	0,32
2 x 4	0,51	0,82	0,62	0,55	-1,38	2,40	0,25	0,41	-0,69	1,20
3 x 4	0,18	0,82	0,22	0,83	-1,71	2,07	0,09	0,41	-0,85	1,03

Tabela 5. Análise de variância.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p-Valor
(1) pH	105,86	1	105,86	39,53	0,00
(2) % Tampão	29,26	1	29,26	10,93	0,01
(3) % PEG	13,42	1	13,42	5,01	0,06
(4) PEG	12,44	1	12,44	4,65	0,06
1 x 2	7,90	1	7,90	2,95	0,12
1 x 3	2,97	1	2,97	1,11	0,32
1 x 4	2,96	1	2,96	1,10	0,32
2 x 3	6,18	1	6,18	2,31	0,17
2 x 4	1,04	1	1,04	0,39	0,55
3 x 4	0,13	1	0,13	0,05	0,83
Erro	21,42	8	2,68		
Total	203,58	18			

Tabela 6. Tabela ANOVA.

	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
Regressão	182,16	10	18,22	6,80	3,35
Erro	21,42	8	2,68		
Total	203,58	18			

Com base nesses resultados de significância, que indicaram que as variáveis significativas são o pH e a % de tampão, verificou-se na Tabela 3 em qual nível de cada fator significante foram obtidos os melhores valores de K_p . Entende-se por melhor valor de K_p , aquele que indica que a IgG particionou para um fase em que as outras proteínas “contaminantes” do soro humano não particionariam.

No plasma sanguíneo, além das globulinas, a proteína quantitativamente mais importante é a albumina. Uma das diferenças entre IgGs e albumina é a massa molar. As IgGs humanas apresentam valores de massa molar que variam de 146 a 170 kDa (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002), enquanto a da albumina é de cerca de 66 kDa (ROSA *et al.*, 2007a). De acordo com Albertsson (1986), efeitos de exclusão por tamanho estão envolvidos na partição seletiva, isto é, moléculas grandes são facilmente excluídas da fase rica em PEG. Além de maior, a IgG é mais hidrofóbica do que a albumina, tendo cerca de 14% dos átomos de sua superfície pertencentes a resíduos hidrofóbicos (ROSA *et al.*, 2007a). Desse ponto de vista, a IgG, assim como a albumina, seria particionada para a fase a rica em tampão citrato. Entretanto, os dados da Tabela 3, mostram que para vários experimentos, o valor de K_p foi superior a 1, o que significa que a concentração de IgG encontrada na fase topo (rica em PEG) foi superior à encontrada na fase fundo (rica em tampão citrato). Isso se deve a outros fatores importante que regem a partição de biomoléculas, como o ponto isoelétrico e a carga superficial.

O ponto isoelétrico da IgG varia de 5,0 a 9,5 (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002), enquanto que o da albumina é igual a 4,7 (NAYAK e SHIN, 2008). Em valores de pH mais elevados do que 4,7, a albumina sofre uma transição neutro-ácida e se torna negativamente carregada (NAYAK e SHIN, 2008). Em relação à IgG, na faixa de pH estudada neste trabalho (5,0 – 7,0), parte das IgGs está negativamente carregada, assim como a albumina; outra parte está eletricamente neutra, quando o pH do meio coincidir com o ponto isoelétrico; e outra parte está positivamente carregada. Albertsson (1986) demonstrou que materiais negativamente carregados

tem baixos coeficientes de partição enquanto que Walter *et al.* (1985) apud Perumalsamy e Murugesan (2007) mostrou o comportamento inverso para proteínas carregadas positivamente. Rosa *et al.* (2009b) consideraram o pI da IgG igual a 9. Estes autores afirmaram que o K_p aumenta com o aumento do pH, pois assim a IgG estará mais próximo do seu pI. Essa condição a torna mais suscetível ao fenômeno de *salting-out*, fazendo-a particionar para a fase topo.

Observando-se a Tabela 3, vê-se que para sistemas com as mesmas concentrações de % PEG, % tampão citrato e massa molar do PEG, mas diferentes valores de pH, os valores de K_p foram maiores quando o pH era igual a 7,0. Pode-se observar também que quando a diferença é a % de tampão citrato, há um maior coeficiente de partição quando se tem 12% de tampão citrato ao invés de 8%. Em sistemas polímero/sal, a força iônica da fase fundo (rica em sal) é relativamente alta, e à medida que a quantidade de sal na solução aumenta, maior é o valor de K_p .

Dessa maneira, encontrou-se que os melhores valores de K_p são os que apresentam os maiores valores, porque indicam que a IgG particionou para a fase topo, e que estes foram obtidos para os experimentos 17 e 19, que por sua vez apresentam os mesmos valores de % de tampão citrato e pH, 12 e 7,0, respectivamente. Como muitos trabalhos relatam sobre o aumento da partição da IgG quando se adiciona ao sistema um sal neutro (AZEVEDO *et al.*, 2007, AZEVEDO *et al.*, 2008, AZEVEDO *et al.*, 2009a, LEE e FORCINITI, 2010, MAO *et al.*, 2010, ROSA *et al.*, 2007a, ROSA *et al.*, 2009b) decidiu-se prosseguir a investigação sobre a partição da IgG adicionando-se NaCl aos SABS com 12% de tampão citrato e pH 7,0.

O novo conjunto de experimentos realizado e os respectivos valores de K_p estão mostrados na Tabela 7. A Figura 10 mostra a influência da % de NaCl na partição da biomolécula. É possível observar um aumento do valor de K_p quando este fator é aumentado. Quando se adiciona NaCl ao sistema, as moléculas de água sofrem uma redistribuição. Os dados experimentais mostram uma redução do volume da fase topo e um aumento do volume da fase fundo quando se aumenta a concentração do sal. A razão dessa observação está no fato de o sistema tentar manter constante a composição final (ROSA *et al.*, 2009b), pois com a entrada de NaCl as moléculas de água que antes estavam solvatando a proteína, se ligam fortemente ao íons provenientes da dissociação do sal neutro. Como consequência disso, as regiões hidrofóbicas da proteína ficam expostas, o que leva a interações proteína-proteína, que resultam na precipitação das mesmas – *salting out* (MAO *et al.*, 2010) – ou a interações com as regiões hidrofóbicas do PEG. Em ambos os casos o valor de

K_p vai ser elevado, mas apenas no segundo uma boa recuperação da IgG é conseguida (ROSA *et al.*, 2009b).

Tabela 7. Dados de K_p , $\log K_p$ e volumes das fases topo e fundo para sistemas aquosos bifásicos com pH 7 e 12% de tampão citrato.

pH	% Tampão	% PEG	PEG	NaCl (M)	V_{topo}	V_{fundo}	K_p	$\log K_p$
7	12	26	4000	0	14,4	7,7	7,34	0,87
7	12	26	4000	0,2	14,0	8,2	9,23	0,97
7	12	26	4000	0,4	13,7	8,0	17,37	1,24
7	12	28	4000	0	15,0	7,4	6,74	0,83
7	12	28	4000	0,2	14,5	7,6	10,24	1,01
7	12	28	4000	0,4	14,3	7,5	14,69	1,17
7	12	30	4000	0	15,0	6,8	7,30	0,86
7	12	30	4000	0,2	14,9	7,1	8,49	0,93
7	12	30	4000	0,4	14,7	7,0	9,68	0,99
7	12	26	6000	0	14,4	7,9	10,46	1,02
7	12	26	6000	0,2	13,8	8,2	12,44	1,09
7	12	26	6000	0,4	13,2	8,0	13,04	1,12
7	12	28	6000	0	14,8	7,5	8,00	0,90
7	12	28	6000	0,2	14,5	7,8	14,18	1,15
7	12	28	6000	0,4	13,7	7,6	17,50	1,24
7	12	30	6000	0	15,0	7,1	8,06	0,91
7	12	30	6000	0,2	14,5	7,1	10,03	1,00
7	12	30	6000	0,4	14,3	7,1	12,13	1,08
7	12	26	8000	0	14,5	7,9	9,44	0,98
7	12	26	8000	0,2	13,8	8,2	11,07	1,04
7	12	26	8000	0,4	13,7	8,2	16,44	1,22
7	12	28	8000	0	14,7	7,6	4,14	0,62
7	12	28	8000	0,2	14,1	7,8	9,82	0,99
7	12	28	8000	0,4	14,0	7,7	11,09	1,05
7	12	30	8000	0	14,8	7,1	10,05	1,00
7	12	30	8000	0,2	14,7	7,4	13,03	1,11
7	12	30	8000	0,4	14,5	7,3	16,07	1,21

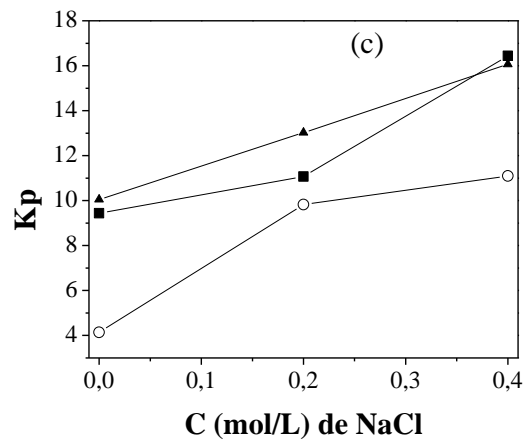
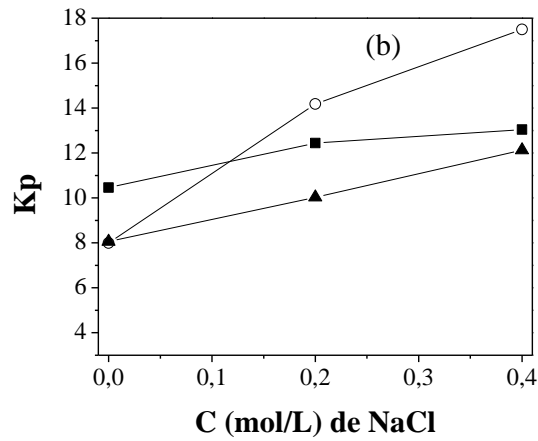
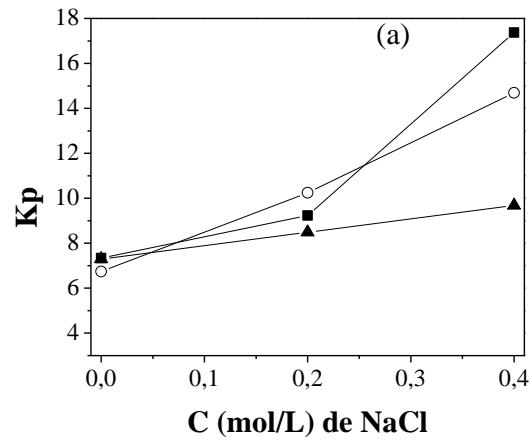


Figura 10. Influência da adição de NaCl no coeficiente de partição da IgG para sistemas com (■) 26%, (○) 28% e (▲) 30% m/m de PEG (a) 4000, (b) 6000 e (c) 8000 + 12% m/m de tampão citrato pH 7,0.

Todos os sistemas de PEG 4000 apresentaram uma significativa precipitação da IgG na interface e/ou na superfície da fase topo. Quando o PEG utilizado foi o 6000 ou o 8000 pouca ou nenhuma precipitação foi observada. De acordo com Rosa *et al.* (2007a), quanto menor a massa molar do PEG, menor o comprimento da sua cadeia e, assim, menos grupos de óxido de etileno estarão disponíveis para as interações com as proteínas, o que torna a fase superior menos hidrofóbica e favorece o *salting-out*.

Azevedo *et al.* (2009a) estudaram a partição de IgG pura em sistemas compostos por 15% de PEG 3350 ou 6000, 10% de tampão citrato a pH 6,0 e água, sem e com adição de NaCl (0, 5, 10 e 15%). Para os sistemas em que não se adicionou NaCl, todos os valores de $\log K_p$ foram negativos, indicando que a IgG particionou preferencialmente para a fase fundo. Apenas para valores de % de NaCl a partir de 10%, os valores de $\log K_p$ se tornaram positivos, sendo o valor máximo de $\log K_p$ obtido menor do que 0,8.

Os resultados obtidos no presente trabalho para o pH 6,0 (Tabela 3) exibem valores de $\log K_p$ positivos quando a concentração de NaCl era igual a 0 M (0%), uma vez que uma maior concentração de PEG foi utilizada, o que aumentou a hidrofobicidade da fase topo. Para os experimentos no pH 7,0 (Tabela 7), todos os valores de $\log K_p$ foram positivos e maiores do que 0,8, mesmo quando se utilizou quantidades extremamente menores de NaCl (0,2 e 0,4 M de NaCl correspondem a 1 e 2% de NaCl, respectivamente). Esses últimos resultados ressaltam a influência do pH na partição da biomolécula. Como já foi comentado anteriormente, apenas os valores de K_p não são suficientes para garantir a eficiência de um sistema no quesito recuperação da biomolécula, sendo apenas um estudo mais profundo com métodos cromatográficos capaz de fazê-lo.

De qualquer maneira, a possibilidade de se conseguir recuperar a biomolécula utilizando-se menores quantidade de NaCl é um avanço. Segundo Rosa *et al.* (2009b), a utilização de grandes concentrações de sais em um processo industrial pode ocasionar uma redução na vida útil dos equipamentos devido à corrosão dos mesmos, uma diminuição na quantidade de proteína purificada porque mais NaCl terá de ser dissolvido, além de poder causar a precipitação do produto por *salting-out*.

6. CONCLUSÕES

O estudo de partição da IgG em SABs compostos por PEG e tampão citrato foi realizado de maneira satisfatória, pois conseguiu-se particionar a IgG para a fase topo do sistema com elevados valores de K_p apenas com a variação de fatores tais como o pH, massa molar do polímero e força iônica do meio.

Os dados das curvas binodais e linhas de amarração para os sistemas compostos por PEG (polietilenoglicol), tampão citrato de sódio e água a 25 °C foram determinados usando o método *cloud-point* e medidas densimétricas, respectivamente. As curvas binodais e as linhas de amarração obtidas mostraram resultados concordantes, o que deu credibilidade aos resultados obtidos.

A influência da massa molar do PEG e do pH da solução tampão na região bifásica foi investigada, e foi observada uma concordância entre os resultados obtidos nesse trabalho com dados publicados anteriormente disponíveis na literatura para diferentes condições operacionais (massa molar, temperatura e pH).

As curvas binodais mostraram ser diferentes para os PEGs (4000, 6000 e 8000) e soluções de pH (5,0, 6,0 e 7,0) estudados neste trabalho, entretanto, a diferença não foi pronunciada. Esses resultados são úteis para a partição de biomoléculas, uma vez que se pode escolher a condição operacional mais conveniente dentre os parâmetros massa molar do PEG e pH da solução de tampão citrato.

Em relação à partição da IgG, dentre os parâmetros estudados, pH e % tampão citrato foram os fatores que se mostraram significativos quando a variável dependente considerada era o coeficiente de partição da biomolécula. Os dados foram validados estatisticamente e prosseguiu-se a investigação sobre a influência da adição de NaCl aos sistemas que apresentaram os melhores valores de K_p .

Os valores de K_p aumentaram com a adição de NaCl, mas os sistemas de PEG 4000 apresentaram precipitação de IgG, o que mostra que além da força iônica do meio, o tamanho da cadeia molecular do PEG é um fator importante na partição de biomoléculas. Valores de $\log K_p$ foram comparados a valores encontrados na literatura e se mostraram superiores mesmo utilizando-se quantidades nitidamente menores de NaCl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, A. **Handbook of Bioseparations**. Academic Press: New York, 2000.

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**; Wiley and Sons: New York, 1986.

ALVES, J. G. L. F.; BRENNEISEN, J.; NINNI, L.; MEIRELLES, A. J. A.; MAURER, G. Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol) and Sodium Citrate: Experimental Results and Modeling. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 53, p. 1587–1594, 2008.

AMARAL, J. **Fracionamento do Plasma com Isolamento Cromatográfico de Imunoglobulina-G (IgG) e da sua subclasse IgG3**. In: Conferência Científica e Tecnológica em Engenharia, Lisboa – Portugal, 2002.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **Antibody Purification Handbook**, Edition AC, 2002. Disponível em: <http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_antibodypurification.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2011.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8826– 8835, 2011.

AZEVEDO, A. M.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AIRES-BARROS, M. R. Optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 209–217, 2007.

AZEVEDO, A. M.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AIRES-BARROS, M. R. Integrated process for the purification of antibodies combining aqueous two-phase extraction, hydrophobic interaction chromatography and size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1213, p. 154–161, 2008.

AZEVEDO A. M.; GOMES, A. G.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; PISCO, A. M. M. O.; AIRES-BARROS, M. R. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 14–21, 2009a.

AZEVEDO A. M.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; PISCO, A. M. M. O.; DE VRIES, J.; KORPORAAL, R.; VISSER, T. J.; AIRES-BARROS, M. R. Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 31–39, 2009b.

BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; LAPIZCO-ENCINAS, B. H.; RITO-PALOMARES, M. Extraction and Purification of Bioproducts and Nanoparticles using Aqueous Two-Phase Systems Strategies. **Chemical Engineering and Technology**, v. 31, n. 6, p. 838–845, 2008.

BERELI, N.; Uzun, L.; Yavuz, H.; Elkak, A.; Denizli, A. Antibody Purification Using Porous Metal–Chelated Monolithic Columns. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, n. 1, p. 395–404, 2006.

BOI, C. Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 848, p. 19–27, 2007.

CARVALHO, C. P. Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. 2004. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2004.

CARSON, K. L. Flexibility—the guiding principle for antibody manufacturing. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1054–1058, 2005.

COLLÉN, A.; WARD, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Genetic engineering of the *Trichoderma reesei* endoglucanase I (Cel7B) for enhanced partitioning in aqueous two-phase systems containing thermoseparating ethylene oxide–propylene oxide copolymers. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 179–191, 2001.

DA SILVA, L. H. M; LOH, W. Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 10069–10073, 2000.

DA SILVA, L. H. M; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345–1351, 2006.

DWYER, J.M. Intravenous therapy with gamma globulin. **Advances in Internal Medicine**, v. 32, p. 111–136, 1987.

ESMANHOTO, E. **Purificação de rentamicina através de extração em sistemas de duas fases aquosas**. 2002. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FARID, S. S. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture, **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 8–18, 2007.

FARRUGGIA, B.; NERLI, B.; PICO, G. Study of the serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 798, p. 25–33, 2003.

GHOSH, R. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. **Journal of Chromatography A**, v. 952, p. 13–27, 2002.

GOTTSCHALK, U. Bioseparation in Antibody Manufacturing: The Good, The Bad and The Ugly. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 496–503, 2008.

GRUMACH, A. S.; JACOB, C. M. A.; PASTORINO, A. C. Deficiência de IgA: avaliação clínico-laboratorial de 60 pacientes do Instituto da Criança. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 277–282, 1998.

HAMILTON, R. G. **The Human IgG Subclasses**. 2001. Disponível em: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/affinity/CALBIOCHEM_HumanIgG_Subclasses.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2013.

HARTOUNIAN, H.; KALER, E. W.; SANDLER, S. I. Aqueous Two-Phase Systems. 2. Protein Partitioning. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 33, p. 2294–2300, 1994.

HOBER, S.; NORD, K.; LINHULT, M. Protein A chromatography for antibody purification. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 40–47, 2007.

HOLT, L. J.; HERRING, C.; JESPERS, L. S.; WOOLVEN, B. P.; TOMLINSON, I. A. Domain antibodies: proteins for therapy. **Trends Biotechnology**, v. 21, p. 484–490, 2003.

HUBBUCH, J. J.; MATTHIESEN, D. B.; HOBLEY, T. J.; THOMAS, O. R. T. High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principle comparison. **Bioseparation**, v. 10, p. 99–112, 2001.

JAYAPAL, M.; REGUPATHI, I.; MURUGESAN, M. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly(ethylene glycol) 2000 + Potassium Citrate + Water at (25, 35, and 45) °C. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 52, p. 56–59, 2007.

JOHANSSON, G.; ANDERSON, M.; AKERLUND, H-E. Counter-current distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands. **Journal of Chromatography A**, v. 289, p. 483–493, 1984.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495–497, 1975.

LEE, J.-W.; FORCINITI, D. Purification of Human Antibodies from Transgenic Corn Using Aqueous Two-Phase Systems. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 1, p. 159–167, 2010.

LEE, T. S.; VAGHJIANI, J. D.; LYE, G. J.; TURNER, M. K. A systematic approach to the large-scale production of protein crystals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 582–592, 2000.

LEHNINGER, A. **Princípios da Bioquímica**. Sarvier: São Paulo, 1984.

LOW, D.; O'LEARY, R.; PUJAR, N. S. Future of antibody purification. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 48–63, 2007.

MALPIEDI, L. P.; PICÓ, G.; NERLI, B. Features of partitioning pattern of two pancreatic enzymatic precursors: Trypsinogen and chymotrypsinogen in polyethyleneglycol–sodium citrate aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography B**, v. 870, p. 1–7, 2008.

MAO, L. N.; ROGERS, J. K.; WESTOBY, M.; CONLEY, L.; PIERACCI, J. Downstream Antibody Purification using Aqueous Two-Phase Extraction. **Biotechnol Progress**, v. 26, n. 6, p. 1662–1670, 2010.

MARQUES, D. A. V. **Produção e extração de ácido clavurânico de Streptomyces spp. Por fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas**. 2010. 214 p. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Receptores para imunoglobulina G (Fc γ R). **Medicina**, v. 38, n. 1, p. 82–95, 2005.

MURUGESAN, T.; PERUMALSAMY, M. Liquid-Liquid Equilibria of Poly(ethylene glycol) 2000 + Sodium Citrate + Water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 50, p. 1392–1395, 2005.

NASCIMENTO, K. S.; YELO, S.; CAVADA, B. S.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-Liquid Equilibrium Data for Aqueous Two-Phase Systems Composed of Ethylene Oxide Propylene Oxide Copolymers. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 56, p. 190–194, 2011.

NAVEH, D.; SIEGEL, R. C. **Large scale downstream processing of monoclonal antibodies**. *Bioseparation*, v. 1, p. 351–366, 1991.

NAYAK, N. C.; SHIN, K. Human serum albumin mediated self-assembly of gold nanoparticles into hollow spheres. **Nanotechnology**, v. 19, n. 26, p. 1–4, 2008.

NUCCI, H. D., NERLI, B., PICÓ, G. Comparison between the thermodynamic features of α 1-antitrypsin and human albumin partitioning in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Biophysical Chemistry**, v. 89, p. 219–229. 2001.

OLIVEIRA, G. G. G.; DA SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JÚNIOR, A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrate. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 2, 2001.

OLIVEIRA, R. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; SILVA, L. H. M.; FONTES, M. P. F. Liquid–Liquid Equilibria of Biphasic Systems Composed of Sodium Citrate +

Polyethylene(glycol) 1500 or 4000 at Different Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 53, p. 895–899, 2008.

ÖSKARA, S.; AKGÖL, S.; ÇANAK, Y.; DENIZLI, A. A Novel Magnetic Adsorbent for Immunoglobulin-G Purification in a Magnetically Stabilized Fluidized Bed. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1169–1175, 2004.

PEREZ, B.; MALPIEDI, L. P.; TUBÍO, G.; NERLI, B.; PESSÔA FILHO, P. A. Experimental determination and thermodynamic modeling of phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing biodegradable salts. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 56, p. 136–143, 2013.

PERUMALSAMY, M.; BATHMALAKSHMI, A.; MURUGESAN, T. Experiment and Correlation of Liquid-Liquid Equilibria of an Aqueous Salt Polymer System Containing PEG6000 + Sodium Citrate. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 52, p.1186–1188, 2007.

PERUMALSAMY, M.; MURUGESAN, T. Partition Behavior of Bovine Serum Albumin in PEG 2000-Sodium Citrate-Water Based Aqueous Two-Phase System. **Separation Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 2049–2065, 2007.

PESSOA JÚNIOR, A. **Extração Líquido-Líquido de Enzimas**. 2001. 298 p. Texto sistematizado (Concurso de Livre Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. 1 ed. Editora Manole: Barueri – SP, 2005.

PORTAL DE ONCOLOGIA PORTUGUÊS. Disponível em: <<http://www.pop.eu.com>>. Acesso em: 05 fev. 2013.

PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; LIMA-FILHO, J. L. PORTO, ANA L. F. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 165–171, 2011.

PORTO, T. S. **Extração da Pró-toxina Épsilon e de uma Protease a partir de *Clostridium perfringens* em Sistemas de Duas Fases Aquosas Utilizando PEG/Citrato**. 2004. 93 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PORTO, T. S.; PESSÔA-FILHO, A. P.; BARROS NETO, B.; LIMA FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F., JR. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 547–552, 2007.

RAMALHO, R. **Imunoglobulinas**. 2007. Disponível em: <http://users.med.up.pt/cc04-10/Imunologia/desgravadas/6_Imunoglobulinas.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2013.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 3–11, 2004.

RITO-PALOMARES, M.; LYDDIATT, A. Process integration using aqueous two-phase partition for the recovery of intracellular proteins. **Chemical Engineering Journal**. v. 87. p. 313–319, 2002.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2 ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

ROSA, P. A. J.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 50–60, 2007a.

ROSA, P. A. J.; AZEVEDO, A. M.; FERREIRA, I. F.; DE VRIES, J.; KORPORAAL, R.; VERHOEF, H. J.; VISSER, T. J.; AIRES-BARROS, M. R. Affinity partitioning of human antibodies in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1162, p. 103–113, 2007b.

ROSA, P. A. J.; AZEVEDO, A. M.; FERREIRA, I. F.; SOMMERFELD, S.; BÄCKER, W.; AIRES-BARROS, M. R.; Downstream processing of antibodies: Single-stage *versus* multi-stage aqueous two-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8741–8749, 2009a.

ROSA, P. A. J.; AZEVEDO, A. M.; SOMMERFELD, S.; MUTTER, M.; AIRES-BARROS, M. R.; BÄCKER, W. Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: A multi-stage approach. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 306–313, 2009b.

ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2296–2305, 2010.

ROQUE, A. C. A.; LOWE, C. R.; TAIPA, M. A. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 639–654, 2004.

ROQUE, A. C. A.; SILVA, C. S. O.; TAIPA, M. A. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 1160, p. 44–55, 2007.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. 2000. 174 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Campinas, São Paulo, 2000.

SCHÜGERL, K., HUBBUCH, J. Integrated bioprocesses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 294–300. 2005.

SERPA, G.; AUGUSTO, E. F. P.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; RIBEIRO, M. B.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G₁ monoclonal antibody. **Journal of Chromatography B**, v. 816, 259–268, 2005.

SHUKLA, A. A.; HUBBARD, B, TRESSEL, T.; GUHAN, S.; LOW, D. Downstream processing of monoclonal antibodies – Application of platform approaches. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 28–39, 2007.

SILVA, C. A. S. **Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos**. 2007. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

SILVA, L. H. M. **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: Polímero/polímero e polímero/sal**. 2000. 128p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

SILVÉRIO, S. C.; WEGRZYN, A.; LLADOSA, E.; RODRÍGUEZ, O.; MACEDO, E. A. Effect of Aqueous Two-Phase System Constituents in Different Poly(ethylene glycol)–Salt Phase Diagrams. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 57, n. 4, p. 1203–1208, 2012.

THIEL, K.A. Biomanufacturing, from bust to boom...to bubble? **Nature Biotechnology**, v. 22, 1365–1372, 2004.

THOMMES, J.; ETZEL, M. Alternatives to Chromatographic Separations. **Biotechnology Progress**, v. 23, 42–45, 2007.

TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P-A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 1036–1043, 1985.

TUBÍO, G; PELLEGRINI, L.; NERLI, B. B.; PICÓ, G. A. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 51, p. 209–212, 2006.

VAN DIJK, M. A.; VAN DE WINKEL, J. G. J. Human antibodies as next generation therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 368–374, 2001.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 297, p.16–50, 2007.

VANÇAN, S. **Purificação de imunoglobulina G a partir do plasma ou soro humano utilizando cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados**. 1999. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.

WALTER, H.; BROOKS, D. E.; FISHER, D. **Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems**. Academic Press: New York, 1985.

WALTER, H.; JOHANSSON, G. **Methods in enzymology**. Academic Press: New York, 1994.

XU, Y.; DE SOUZA, A.; RIBEIRO-PONTES, M. Z.; VITOLO, M.; PESSOA JR., A. Liquid-liquid Extraction of Pharmaceuticals by Aqueous Two-phase Systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 305 – 320, 2001.

YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T. Efficient and Stable Display of Functional Proteins on Bacterial Magnetic Particles Using Mms13 as a Novel Anchor Molecule. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 465–471, 2006.

YVER, H. V.; PRZYBYCIEN, T. M. Protein precipitation: Effects of mixing on protein solubility. **AIChE Journal**, v. 40, p. 349–360, 1994.

YVER, H. V.; PRZYBYCIEN, T. M. Metal affinity protein precipitation – effects of mixing, protein-concentration, and modifiers on protein fractionation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, p. 324–332, 1995.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1994.

ZHOU, J. X.; TRESSEL, T.; GOTTSCHALK, U.; SOLAMO, F.; PASTOR, A.; DERMAWAN, S.; HONG, T.; REIF, O.; MORA, J.; HUTCHISON, F.; MURPHY, M. New Q membrane scale-down model for process-scale antibody purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, p. 66–73, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela A1. Dados binodais para os sistemas PEG (4000, 6000 e 8000) + Tampão Citrato (pH 5,0, 6,0 e 7,0).

PEG 4000 (1) + Tampão Citrato pH 5,0 (2)		PEG 4000 (1) + Tampão Citrato pH 6,0 (2)		PEG 4000 (1) + Tampão Citrato pH 7,0 (2)		PEG 6000 (1) + Tampão Citrato pH 5,0 (2)		PEG 6000 (1) + Tampão Citrato pH 6,0 (2)		PEG 6000 (1) + Tampão Citrato pH 7,0 (2)		PEG 8000 (1) + Tampão Citrato pH 5,0 (2)		PEG 8000 (1) + Tampão Citrato pH 6,0 (2)		PEG 8000 (1) + Tampão Citrato pH 7,0 (2)	
m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂
48,20	1,44	48,28	1,37	49,24	0,61	48,20	1,44	48,14	1,49	48,34	1,33	48,20	1,44	48,24	1,40	49,03	0,78
42,07	2,99	43,06	2,31	42,50	1,95	44,71	2,13	45,94	1,71	43,47	1,92	43,12	2,43	42,82	1,98	43,30	1,84
37,89	3,81	38,99	2,85	40,18	2,24	41,88	2,67	43,19	1,99	39,10	2,47	39,17	3,11	39,78	2,40	36,67	3,11
35,21	4,36	35,93	3,24	38,37	2,59	38,04	3,41	40,15	2,41	35,51	3,24	35,32	3,88	37,31	2,72	31,90	3,67
32,37	5,09	33,98	3,67	34,56	3,42	35,10	4,08	37,55	2,80	32,67	3,64	31,73	4,57	35,03	3,05	27,41	4,45
30,40	5,59	31,38	4,22	31,48	4,01	32,38	4,65	33,02	3,65	30,21	4,10	29,05	5,18	31,15	3,86	23,90	5,19
28,42	6,12	29,70	4,61	28,92	4,61	27,79	5,86	29,40	4,36	25,93	5,02	24,60	6,42	28,00	4,46	21,04	5,94
25,07	7,15	26,17	5,53	26,36	5,25	24,59	6,77	26,40	5,07	22,64	5,82	21,11	7,37	25,16	5,13	19,01	6,46
22,87	7,91	22,99	6,39	24,55	5,68	21,80	7,63	23,57	5,71	19,44	6,76	18,52	8,25	22,26	5,81	17,15	7,04
20,49	8,83	20,38	7,28	22,77	6,26	19,14	8,61	21,50	6,33	17,04	7,57	16,89	8,85	19,69	6,51	15,53	7,58
18,43	9,71	18,72	7,88	20,55	6,96	16,90	8,92	19,77	6,87	15,45	8,15	14,24	9,94	17,61	7,16	14,31	8,01
16,73	10,49	17,14	8,49	18,96	7,49	14,71	9,99	17,23	7,72	14,13	8,65	12,34	10,80	15,71	7,75	12,40	8,74
14,94	11,41	15,78	9,08	17,52	8,01	12,68	11,21	15,38	8,40	12,99	9,13	10,82	11,56	14,59	8,15	11,07	9,31
14,41	11,89	14,35	9,71	16,11	8,60	11,52	11,81	13,98	8,97	11,80	9,64	9,59	12,20	13,41	8,60	10,06	9,73
13,43	12,20	13,13	10,30	14,93	9,07	10,46	12,39	12,76	9,50	10,71	10,15	6,98	13,75	12,37	9,01	9,14	10,28
12,45	12,75	12,21	10,93	13,64	9,64	9,54	12,90	11,86	9,91	9,73	10,59	6,33	14,11	11,54	9,34	8,55	10,47
11,58	13,24	11,46	11,28	11,84	10,69	8,92	13,24	10,95	10,33	8,91	10,97	4,59	15,08	10,76	9,66	7,93	10,74
10,85	13,66	10,40	11,78	10,62	11,19	7,61	14,22	9,90	10,81	8,11	11,35	0,68	18,90	10,06	9,95	7,40	10,97
10,43	14,08	9,93	12,00	9,30	11,85	0,80	20,11	8,96	11,24	7,48	11,67			9,39	10,24	6,83	11,27
10,02	14,14	9,43	12,26	8,54	12,24			8,08	11,69	6,97	11,92			8,71	10,57	6,40	11,46
9,00	14,90	8,99	12,48	8,29	12,38			7,35	12,05	6,34	12,23			8,11	10,85	6,03	11,64
8,60	15,15	8,59	12,67	7,92	12,58			0,93	16,73	1,46	16,96			7,53	11,10	5,70	11,80
6,56	16,35	8,23	12,85	7,69	12,68									7,10	11,29	5,40	11,96
4,84	17,39	7,90	13,11	7,49	12,78									6,59	11,53	0,82	15,11
1,58	20,63	6,89	13,61	0,88	18,08									6,23	11,71		
														5,83	11,90		
														5,05	12,27		
														0,60	15,82		

* m₁: % m/m PEG; m₂: % m/m Tampão Citrato

Tabela A2. Coeficientes A, B e C para o modelo de regressão polinomial ($y = A + Bx + Cx^2$) obtido para o estudo das linhas de amarração dos sistemas.

	A	B	C	R ²	A	B	C	R ²
PEG 4000 + Tampão Citrato pH 5,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 4000	1,1106	-0,1596	0,2760	0,99				
Água	1,2623	-0,5322	0,4050	0,99	2,3675	-2,8105	1,6082	1,00
Tampão Citrato pH 5,0					1,1678	-0,4209	1,6291	1,00
PEG 4000 + Tampão Citrato pH 6,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 4000	1,0251	0,2180	-0,1514	1,00				
Água	1,0906	0,1040	-0,1893	1,00	1,1592	1,1016	-1,4847	0,99
Tampão Citrato pH 6,0					1,0372	0,3454	0,7001	0,99
PEG 4000 + Tampão Citrato pH 7,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 4000	1,1009	-0,1623	0,3163	1,00				
Água	1,2693	-0,5323	0,3729	1,00	1,8485	-1,1011	0,2475	1,00
Tampão Citrato pH 7,0					1,0220	0,4494	0,4703	1,00
PEG 6000 + Tampão Citrato pH 5,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 6000	1,0866	-0,0534	0,1567	1,00				
Água	1,2026	-0,3083	0,1946	1,00	1,8154	-1,0933	0,2783	1,00
Tampão Citrato pH 5,0					1,0289	0,3739	0,5072	1,00
PEG 6000 + Tampão Citrato pH 6,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 6000	1,0869	-0,0919	0,2261	1,00				
Água	1,2385	-0,4261	0,2807	1,00	1,8524	-1,0401	0,1622	0,99
Tampão Citrato pH 6,0					1,0029	0,5498	0,4010	0,99
PEG 6000 + Tampão Citrato pH 7,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 6000	1,0766	-0,0353	0,1577	1,00				
Água	1,1991	-0,2821	0,1537	1,00	1,8031	-0,9606	0,1392	1,00
Tampão Citrato pH 7,0					1,0230	0,4440	0,4782	1,00
PEG 8000 + Tampão Citrato pH 5,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 8000	1,0610	0,0725	0,0011	1,00				
Água	1,1342	-0,0667	-0,0192	1,00	1,7850	-1,0003	0,2075	1,00
Tampão Citrato pH 5,0					1,0136	0,4632	0,3794	1,00
PEG 8000 + Tampão Citrato pH 6,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 8000	1,0876	-0,1127	0,2705	1,00				
Água	1,2602	-0,4883	0,3121	1,00	1,9298	-1,2771	0,3429	0,99
Tampão Citrato pH 6,0					1,0105	0,5039	0,4689	0,99
PEG 8000 + Tampão Citrato pH 7,0 + Água								
	Fase Topo (Fase rica em PEG)				Fase Fundo (Fase rica em Tampão Citrato)			
PEG 8000	1,0574	0,0442	0,0707	1,00				
Água	1,1705	-0,1774	0,0542	1,00	1,8534	-1,1164	0,2593	1,00
Tampão Citrato pH 7,0					1,0140	0,4957	0,4048	1,00

Tabela A3. Dados de linha de amarração para os sistemas PEG (4000, 6000 e 8000) + Tampão Citrato (pH 5,0, 6,0 e 7,0).

Linha de amarração	PEG 4000 (1) + Tampão Citrato pH 5,0 (2)						PEG 4000 (1) + Tampão Citrato pH 6,0 (2)						PEG 4000 (1) + Tampão Citrato pH 7,0 (2)					
	Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo		Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo		Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo	
	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂
1	30,04	6,98	33,11	4,72	0,12	21,83	30,02	6,97	36,78	3,17	2,12	23,45	29,93	6,98	37,25	2,91	0,35	23,70
2	27,91	9,10	39,23	3,65	0,07	23,75	27,93	9,00	37,53	3,06	1,73	24,48	27,95	9,05	38,51	2,74	0,27	24,89
3	25,94	10,96	40,44	3,83	0,04	25,66	26,17	11,29	40,24	2,69	1,12	26,26	25,45	10,74	39,42	2,61	0,24	25,37
4	29,86	10,92	42,86	2,99	0,00	30,83	30,00	10,99	44,07	2,13	0,34	28,96	29,95	10,97	44,81	1,99	0,05	29,35
	PEG 6000 (1) + Tampão Citrato pH 5,0 (2)						PEG 6000 (1) + Tampão Citrato pH 6,0 (2)						PEG 6000 (1) + Tampão Citrato pH 7,0 (2)					
	Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo		Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo		Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo	
	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂
1	29,91	7,08	35,23	4,11	0,00	24,46	29,92	7,07	38,16	2,81	0,34	23,21	29,91	7,00	35,37	3,19	0,51	23,79
2	27,77	8,96	37,84	3,61	0,00	25,54	27,84	9,13	39,85	2,57	0,26	24,41	27,96	8,98	36,85	2,96	0,38	25,03
3	25,97	10,95	39,55	3,30	0,00	26,81	26,02	11,30	41,86	2,29	0,17	26,06	25,94	10,88	38,19	2,77	0,30	25,97
4	29,82	11,01	45,29	2,36	0,00	30,63	29,79	10,99	45,00	1,88	0,06	28,52	29,77	11,01	44,22	2,03	0,07	29,44
	PEG 8000 (1) + Tampão Citrato pH 5,0 (2)						PEG 8000 (1) + Tampão Citrato pH 6,0 (2)						PEG 8000 (1) + Tampão Citrato pH 7,0 (2)					
	Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo		Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo		Sistema Total		Fase Topo		Fase Fundo	
	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂	m ₁	m ₂
1	29,89	6,97	35,76	3,99	0,24	24,81	29,81	7,11	38,20	2,67	0,17	23,63	29,98	7,00	36,93	2,86	0,22	23,88
2	28,02	8,96	38,15	3,55	0,18	25,98	27,42	8,97	39,31	2,53	0,15	24,27	27,60	8,96	38,58	2,64	0,18	24,72
3	25,88	10,95	40,28	3,19	0,14	27,00	25,84	11,05	40,62	2,38	0,09	25,88	25,88	10,96	40,34	2,43	0,12	26,27
4	29,84	11,07	45,98	2,27	0,02	30,69	29,86	11,15	44,57	1,94	0,02	29,15	29,95	11,00	44,01	2,02	0,03	29,34

*m₁: % m/m PEG; m₂: % m/m Tampão Citrato

APÊNDICE B

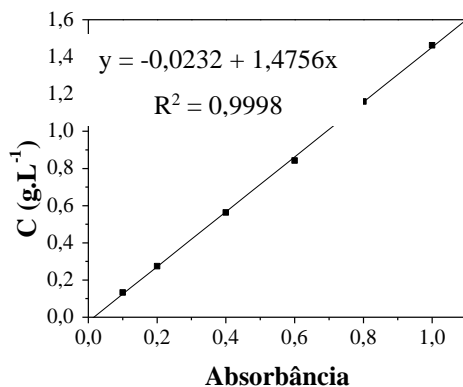


Figura B1. Curva de calibração de IgG.

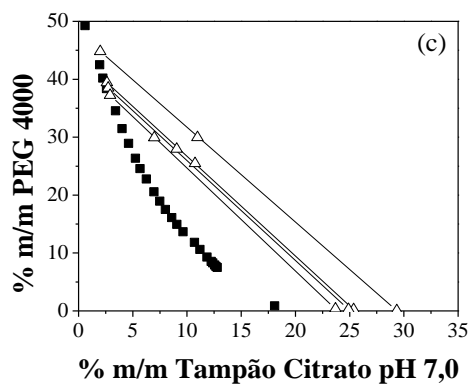
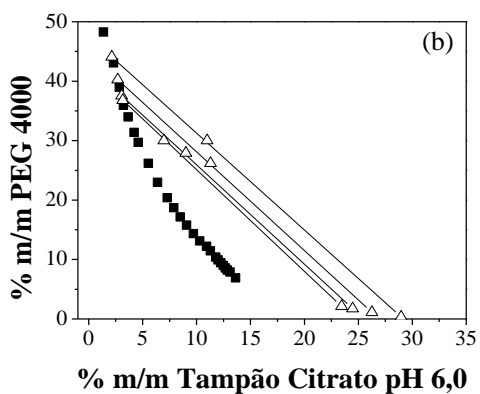


Figura B2. Linhas de amarração e curvas binodais para os sistemas (a) PEG 4000 + Tampão Citrato pH 6,0 e (b) PEG 4000 + Tampão Citrato pH 7,0. (■) Método *cloud-point*, (△) Método densimétrico.

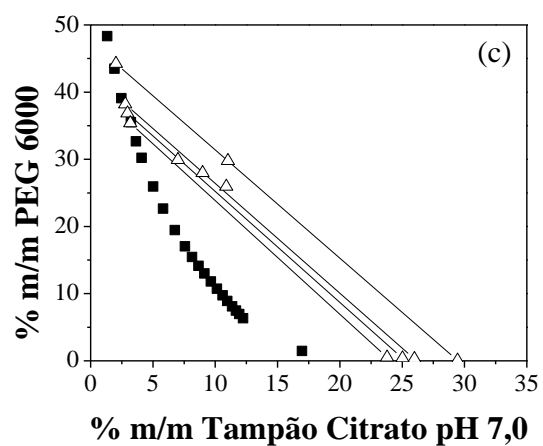
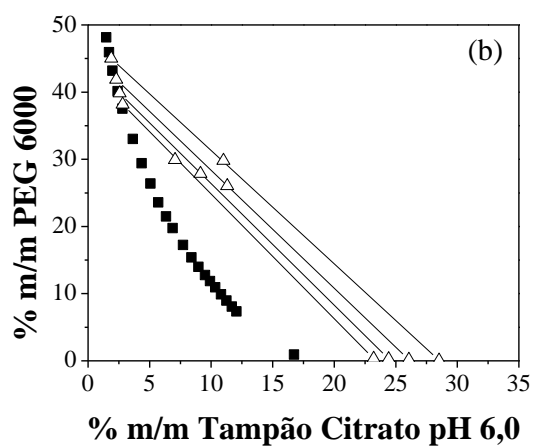
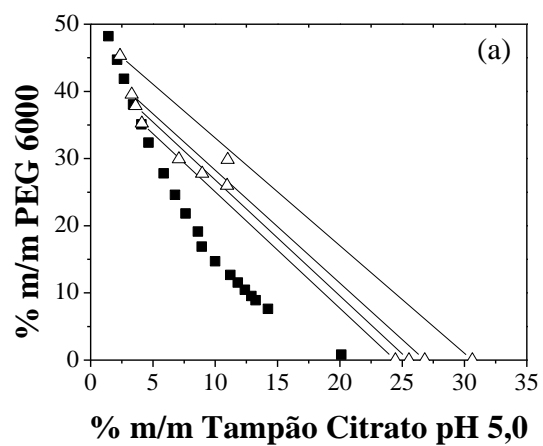


Figura B3. Linhas de amarração e curvas binodais para os sistemas (a) PEG 6000 + Tampão Citrato pH 5,0, (b) PEG 6000 + Tampão Citrato pH 6,0 e (c) PEG 6000 + Tampão Citrato pH 7,0. (■) Método *cloud-point*, (△) Método densimétrico.

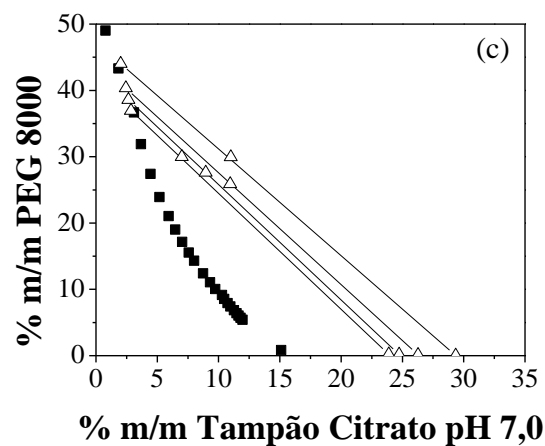
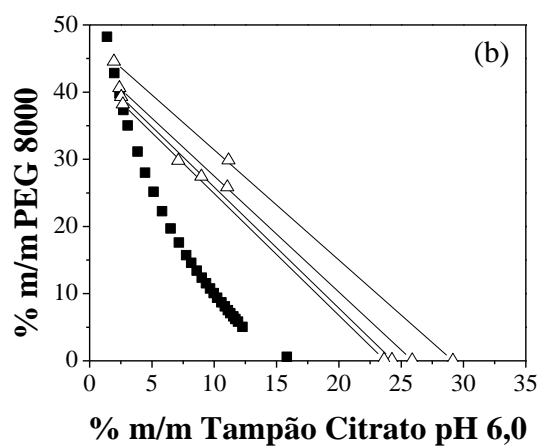
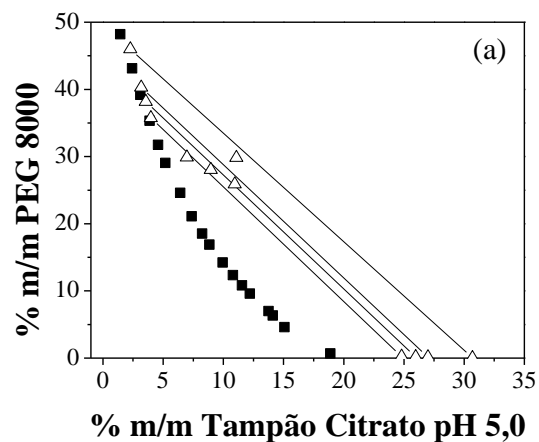


Figura B4. Linhas de amarração e curvas binodais para os sistemas (a) PEG 8000 + Tampão Citrato pH 5,0, (b) PEG 8000 + Tampão Citrato pH 6,0, e (c) PEG 8000 + Tampão Citrato pH 7,0. (■) Método *cloud-point*, (△) Método densimétrico.