

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo dos sistemas aquosos bifásicos formados por
polietilenoglicol e sais de tartarato, e purificação da lectina
ConBol obtida a partir da *Canavalia boliviana***

Alexandra C. G. Pinto

Dissertação de Mestrado em Química

Vitória

2016

Alexandra C. G. Pinto

Estudo dos sistemas aquosos bifásicos formados por
polietilenoglicol e sais de tartarato, e purificação da lectina
ConBol obtida a partir da *Canavalia boliviana*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química do Centro de
Ciências Exatas da Universidade Federal
do Espírito Santo como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Fuzer
Mesquita

VITÓRIA

2016

**Estudo dos sistemas aquosos bifásicos formados por
polietilenoglicol e sais de tartarato, e purificação da lectina
ConBol obtida a partir da *Canavalia boliviana***

Alexandra C. G. Pinto

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Química.

Aprovado(a) em 08/04/2016 por:

Prof. Dr. Anderson Fuzer Mesquita
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profa. Dr. Denise Rocco de Sena
Instituto Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Eloi Alves da Silva Filho
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Rafael de Queiroz Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, abril de 2016

Dedico este trabalho ao meu pai (*In memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Maria Santíssima por estarem presentes em todos os momentos em que mais precisei.

Aos meus pais e em especial à minha tia, Maria Nazaré, por todo o cuidado e amor incondicional nessa caminhada.

Ao Professor Anderson Fuzer Mesquita pela orientação, amizade, e por toda compreensão diante das minhas dificuldades e limitações.

À Kelany Santiago por compartilhar seus conhecimentos.

Aos amigos Deise Menezes Santos e Lucas Queiroz pelo apoio e amizade.

Aos amigos do Grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Físico-Química: Diego Faria e Cristiano Caliman.

Ao Laboratório de Águas e à Equipe do Laboratório de Produtos Naturais que gentilmente me auxiliaram durante as análises no HPLC.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo –Campus Vila Velha- na pessoa da Diretora Denise Rocco de Sena que permitiu que parte dos experimentos fosse realizada nesta instituição.

Ao Biomol-Lab da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Prof. Dr. Benildo S. Cavada por gentilmente me ceder a proteína para a realização do trabalho.

À minha equipe de trabalho Carolina Simões Fávero, Ariel Horta Esperandio, Danilo Tavares, Ana Luiza Kruger Velten e em especial Eliza Siqueira por todo o apoio e ajuda na execução dos trabalhos.

Aos professores Denise Rocco de Sena, Prof. Dr. Eloi Alves da Silva Filho e Prof. Dr. Rafael de Queiroz Ferreira por participarem da banca examinadora.

À CAPES pelo incentivo a pesquisa

A todo o corpo docente responsável pela minha formação acadêmica.

“Estudar é polir a pedra preciosa; cultivando o espírito, purificamo-lo”.

Confúcio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios ativos disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.....	20
Figura 2: Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares, de um SAB formado por polietilenoglicol e um sal.....	22
Figura 3: Curvas de equilíbrio para PEG/ fosfato em pH 8. ³⁰	24
Figura 4: Migração das moléculas de água na formação da camada de hidratação dos íons.....	25
Figura 5: Esquema da purificação de uma proteína utilizando um sistema aquoso bifásico.....	27
Figura 6: Proteína Conbol ⁷⁶	29
Figura 7: Curvas binodais para PEGs de diferentes massas molares (●) 3350, (■) 10000 (▲) 20000 e sais de tartarato de potássio a 298 K.....	47
Figura 8: Curvas binodais para PEGs de diferentes massas molares (●) 3350, (■) 10000 (▲) 20000 e sais de tartarato de sódio a 298 K.....	47
Figura 9: Curvas bimodais a 298 K e pH 7 para os polímeros PEG 1000 (■) e PEG 8000 (●) ¹³	48
Figura 10: Curvas binodais para PEG 2000 e tartarato de (♦) sódio e (●) potássio.....	49
Figura 11: Curvas binodais para PEG 3350 e tartarato de (♦) sódio e (●) potássio.....	49
Figura 12: Curvas binodais para o PEG 3350 e tartarato de potássio a 298, 308 e 318K...	50
Figura 13: Efeito da temperatura sobre o diagrama de fase do sistema formado por PEG 3350 + tartarato de potássio + H ₂ O a 288 K (●) e 308 K (■).....	55

Figura 14: Efeito da temperatura sobre o diagrama de fase do sistema formado por PEG10000 + tartarato de potássio + H ₂ O a 288 K (●) e 308 K (■).....	55
Figura 15: Efeito da temperatura sobre o diagrama de fase do sistema formado por PEG20000 + tartarato de potássio + H ₂ O a 288 K (●) e 308 K (■).....	56
Figura 16: Curva de calibração da proteína ConBol de área do cromatograma (uA) versus concentração da proteína (mg/mL) a 298 K e pH 7 em tampão fosfato KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ .	64
Figura 17: Cromatogramas da curva de calibração da proteína ConBol. (a) injeção de 5 uL, (b) 15 uL, (c) 20uL e (d) 25uL.....	65
Figura 18: Efeito na massa molar do polímero no coeficiente de partição (K _p).....	66
Figura 19:Efeito na massa molar do polímero no rendimento (Y%)	66
Figura 20:Efeito na massa molar do polímero na pureza (P _{HPLC}) da proteína ConBol	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de componentes que formam sistemas aquosos bifásicos	19
Tabela 2: Dados de equilíbrio do sistema PEG3350 + tartarato de potássio + H ₂ O a 288 K, 298 K e 308 K	53
Tabela3: Dados de equilíbrio do sistema PEG10000+tartarato de potássio+H ₂ O a 288 K, 298 K e 308 K	53
Tabela 4: Dados de equilíbrio do sistema PEG20000 +tartarato de potássio +H ₂ O a 288 K, 298 K e 308 K	54
Tabela 5: Inclinação da linha de amarração calculada para o PEG3350, PEG10000 e PEG2000 nas temperaturas de 288K, 298K e 308K.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

K_p – Coeficiente de partição

CLA – Comprimento da linha de amarração

ILA – Inclinação da linha de amarração

LA – Linha de amarração

P_c – Ponto crítico

PEG - Polietilenoglicol

P_{HPLC} – Pureza HPLC

Y – Rendimento

SABs – Sistemas aquosos bifásicos

LISTA DE SÍMBOLOS

C_p^S e C_p^I - Concentração de polímero na fase superior e inferior, respectivamente

C_s^S e C_s^I - Concentração de sal na fase superior e inferior, respectivamente

pH – Potencial hidrogeniônico

ΔC_p - Variação das concentrações polímero nas fases superiores e inferiores, respectivamente

ΔC_s - Variação das concentrações de sal nas fases superiores e inferiores, respectivamente

RESUMO

A purificação de extratos proteicos é um processo complexo que envolve várias fases indo desde a precipitação da proteína por soluções salinas até métodos de separação cromatográficos. Essa metodologia, embora bem estabelecida na comunidade científica, é de alto custo, elevado tempo de operação e encontra dificuldades para que seja ampliada em escala industrial. É neste contexto que os sistemas aquosos bifásicos surgem como uma alternativa economicamente viável e sustentável, do ponto de vista ambiental.

Para este estudo foram desenvolvidas duas frentes de pesquisa, divididas nos capítulos 4 e 5 deste trabalho. No capítulo 4 foi avaliado o efeito da temperatura, da massa molar do polímero e do cátion nos equilíbrios de fase dos sistemas formados por (PEG3350+tartarato de potássio + H₂O), (PEG10000 + tartarato de potássio + H₂O) e (PEG20000 + tartarato de potássio + H₂O), em pH7 e a 288,0 K, 298,0 K e 308,0 K. Os resultados denotam que o aumento da temperatura, o aumento da massa molar do polímero e o cátion de menor energia de hidratação deslocaram a binodal em direção à origem, ou seja, para valores menores de concentração de PEG e Sal.

No capítulo 5 foram determinados o coeficiente de partição (K_p), a taxa de recuperação (Y) e a pureza (P_{HPLC}) da proteína ConBol em sistemas formados por PEG400 + KH₂PO₄/K₂HPO₄ + H₂O e PEG600 + KH₂PO₄/K₂HPO₄ + H₂O. Diante dos resultados observa-se que o melhor sistema para particionar a proteína ConBol é o formado por PEG400 + KH₂PO₄/K₂HPO₄ + H₂O, nas concentrações de 16%, 18,8% e 65,2% respectivamente. Este sistema apresentou um coeficiente de partição (K_p) no valor de 13,40, uma taxa de rendimento (Y) de 6,42% e uma taxa de pureza no valor de 69%.

Palavras-chave: Sistemas aquosos bifásicos, tartarato, *Canavalia boliviana*

ABSTRACT

Purification of protein extracts is a complex process that involves several steps ranging from protein precipitation by salt solutions to chromatographic separation methods. This methodology, although well established in the scientific community, is high cost, high uptime and finds it difficult to be expanded on an industrial scale. It is in this context that the aqueous two-phase systems emerge as an economically viable and sustainable alternative, from an environmental point of view.

For this study were developed two research fronts, divided in chapters 4 and 5 in this work. At fourth one was evaluated the effect of temperature, polymer molecular weight and the cation on the phase equilibria of the system formed by PEG3350 + potassium tartrate + H₂O, PEG10000 + potassium tartrate + H₂O and PEG20000 + potassium tartrate + H₂O in pH7 and 288K, 298K and 308K. . The results show that the increasing of temperature, the increasing of polymer's molecular weight and the cation of lower hydration energy, shifted the bimodal toward the origin, where is found lower values of concentration of Polyethyle glycol (PEG) and salt.

In the fifth chapter we determined the partition coefficient (K_p), recovery rate (Y) and purity (P_{HPLC}) of ConBol protein in systems formed by PEG400 + KH₂PO₄ / K₂HPO₄ + H₂O + PEG600 and KH₂PO₄ / K₂HPO₄ + H₂O. With the results it is observed that the best system to partition the ConBol protein is formed by PEG400 + KH₂PO₄ / K₂HPO₄ + H₂O, in concentrations of 16%, 18.8% and 65.2% respectively. This system showed a partition coefficient (K_p) of 13.40, a recovery yeld (Y) of 6.42% and a purity of 69%.

Keywords: Aqueous two phase system, tartrate, *Canavalia boliviana*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Aspectos teóricos dos sistemas aquosos bifásicos.....	19
1.2 Aplicação dos sistemas aquosos bifásicos na partição de biomateriais	25
1.3 Proteína ConBol obtida a partir da <i>Canavalia boliviana</i>	28
1.4 Referências bibliográficas.....	30
2.OBJETIVOS	40
2.1. Gerais.....	40
2.2. Específicos.....	40
3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL	41
3.1. Materiais, reagentes e instrumentação	41
4. ESTUDO DO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO FORMADO POR PEGs DE DIFERENTES MASSAS MOLARES E SAIS DE TARTARATO DE SÓDIO E POTÁSSIO EM DFERENTES TEMPERATURAS.....	42
4.1 Resumo	42
4.2 Introdução	43
4.3 Parte Experimental	44
4.3.1 Materiais	44
4.3.2 Procedimento experimental.....	45
4.3.2.1 Titulação turbidimétrica.....	45

4.3.2.2 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos	45
4.3.2.3 Análise das fases dos sistemas aquosos bifásicos	46
4.4 Resultados e discussão	46
4.4.1 .Análise dos efeitos da massa molar do polímero, da temperatura e do tipo de sal sobre os sistemas aquosos bifásicos	46
4.4.2 Análise das composições do equilíbrio de fase dos sistemas aquosos bifásicos formados por PEG3350+tartarato de potássio + H ₂ O, PEG10000 + tartarato de potássio + H ₂ O e PEG20000 + tartarato de potássio + H ₂ O, em pH 7 e a 288 K, 298 K e 308 K	51
4.5 Conclusão	57
4.6 Referências bibliográficas.....	58
5. UTILIZAÇÃO DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR PEG400 + KH₂PO₄/K₂HPO₄ + H₂O, PEG600 + KH₂PO₄/K₂HPO₄ + H₂O e PEG1500 + KH₂PO₄/K₂HPO₄ + H₂O PARA PARTICIONAR A LECTINA (ConBol) OBTIDA A PARTIR DA <i>Canavalia boliviana</i> em pH 7 a 298K.....	60
5.1 Resumo	60
5.2 Introdução	61
5.3 Sessão Experimental.....	62
5.3.1 Materiais	62
5.3.2 Procedimento experimental.....	62
5.3.4 Testes de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	63
5.4 Resultados e discussão	63
5.5 Conclusão	68

5.6 Referências bibliográficas	69
--------------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO GERAL

Beijerinck foi um dos primeiros a observar que soluções aquosas de gelatina e ágar formavam sistemas bifásicos. Sendo a fase superior constituída por gelatina e a inferior constituída por ágar. Contudo, foi Albertsson, na década de 50, que identificou a aplicabilidade desses sistemas para particionar materiais biológicos. O cientista sueco, em um dos seus experimentos, observou que clorosplatos associados à hidroxiapatita, quando imersos em uma solução formada por polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato, eram dessorvidos e migravam para a solução. Desde então eles tem sido utilizado largamente para a extração de produtos inorgânicos e principalmente de biomateriais, tais como, peptídeos e proteínas.¹⁻⁴

Buscando a redução dos impactos ambientais causados por resíduos de processos industriais, os sais inorgânicos tradicionalmente utilizados para a construção de sistemas aquosos bifásicos têm sido substituídos por sais orgânicos biodegradáveis, tais como, os citratos, oxalatos e tartaratos. Estudos do equilíbrio de fases desses sistemas bifásicos são amplamente encontrados na literatura.⁵⁻⁹ Como exemplos, podemos citar os trabalhos de Govindarajan e Rescheke.^{10,11} Eles avaliaram os diagramas de fase e as massas específicas de sistemas formados por PEG4000 e citrato de amônio em diferentes temperaturas. Rescheke e colaboradores fizeram ainda uma avaliação menos trivial dos sistemas bifásicos e construíram um modelo que permitiu calcular a massa específica e o coeficiente osmótico de sistemas formados por PEG e sal de citrato, tartarato, oxalato e maleato.¹¹

Recentemente, quanto à partição de biomateriais utilizando sistemas aquosos bifásicos, várias publicações mostram a extração e purificação de proteínas, peptídeos e até mesmo vírus.¹²⁻²⁰

Neste trabalho foram exploradas estas duas vertentes de estudo dos sistemas aquosos bifásicos. Também foram avaliados os aspectos teóricos de sua construção e os parâmetros físico-químicos que regem o seu comportamento, bem como a sua aplicabilidade na partição de um biomaterial de interesse tecnológico.

1.1 Aspectos teóricos dos sistemas aquosos bifásicos

Quando soluções aquosas de dois polímeros quimicamente diferentes são misturadas ocorre espontaneamente a formação de agregados que levam ao surgimento de um sistema aquoso bifásico (SAB), ficando uma das fases enriquecida com um dos componentes. Um fenômeno similar ocorre quando são misturadas uma solução polimérica e uma solução salina de alta concentração.^{21,22}

Na literatura encontram-se sistemas aquosos bifásicos formados por diferentes materiais.²³⁻²⁵ Um pequeno exemplo desses sistemas encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 Exemplos de componentes que formam sistemas aquosos bifásicos

Componente 1	Componente 2
polipropilenoglicol	polietilenoglicol, polivinilpirrolidona
polietilenoglicol	dextrana, polivinilalcool, K ₃ PO ₄ , Na ₃ PO ₄ ,
metilcelulose	Dextrana
ovoalbumina (pH 6)	Caseína
carboximetilcelulose de sódio	Hidroxipropildextrana

Os SABs formados por polímero/sal apresentam vantagens em relação aos sistemas formados por polímero-polímero por apresentarem baixa tensão interfacial e baixo custo. A viscosidade reduzida também é interessante nesses sistemas, pois possibilita a migração do soluto entre as fases.²⁶

O polietilenoglicol (PEG) é, sem dúvida, o polímero mais utilizado no estudo de sistemas aquosos bifásicos. Também conhecido como poli(óxido) etileno, PEO, é um polímero sintético, hidrofílico e não iônico. Além disso, é não-tóxico, não inflamável e não volátil. É possível obtê-lo com diferentes massas molares, como, por exemplo, 400g.mol⁻¹,

600g.mol⁻¹, 800g.mol⁻¹ Comercialmente esses polímeros são chamados de PEG 400, PEG 600 e PEG 800, respectivamente. ²⁷

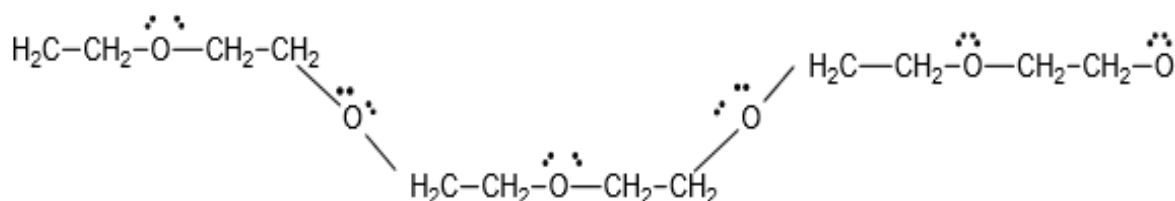


Figura 1: Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios ativos disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema

Os sais mais comumente utilizados são os fosfatos, os sulfatos e os carbonatos; contudo com o advento da química verde e a busca por processos que gerem resíduos de baixo impacto ambiental, tais sais inorgânicos tem sido substituídos, em pesquisas

Quanto ao mecanismo de formação de um SAB, pode-se compreender esse fenômeno a partir de uma análise termodinâmica, avaliando o comportamento da energia livre de Gibbs do sistema, como foi proposto por Silva e Loh.⁴³

Sabe-se que quando PEG, sal e água são misturados uma solução é formada uma vez que a energia livre de Gibbs da solução é menor do que a soma das energias livres e Gibbs dos componentes independentes (G^*), como pode ser descrito na equação 1:

$$G_{\text{mistura (solução)}} < G^*_{\text{água}} + G^*_{\text{PEG}} + G^*_{\text{sal}} \quad (1)$$

Contudo, quando se altera as quantidades de cada componente em proporções específicas, o sistema sai do seu estado de equilíbrio e se reorganiza até que um novo

estado de equilíbrio termodinâmico seja estabelecido. Essa reorganização dos componentes é o que promove o aparecimento de uma nova fase, e o sistema que era monofásico passa a ser bifásico. Termodinamicamente podemos dizer que a soma da energia livre de Gibbs de cada fase é menor do que a energia livre de Gibbs da solução homogênea inicial, como descrito na equação 2:

$$G_{\text{fase superior}} + G_{\text{fase inferior}} < G_{\text{mistura (solução homogênea)}} \quad (2)$$

Sabendo ainda que a energia livre de Gibbs é definida como:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

Assim, podemos concluir que a formação de um SAB ocorre a partir das contribuições entálpicas e entrópicas do sistema visando diminuir sua energia livre de Gibbs.⁴³

A composição de um SAB pode ser expressa graficamente em diagramas de fase (Figura 2). O eixo das abscissas representa a concentração do sal e o eixo das ordenadas a concentração do polímero utilizado no sistema. A partir do diagrama é possível identificar as composições que produzem sistemas bifásicos e as que produzem sistemas monofásicos. As duas regiões, monofásica e bifásica, são separadas pela curva binodal (ACB). Para a construção da curva binodal dois métodos são utilizados: a titulação turbidimétrica, ou ponto de nuvem, e a análise de fases.³⁰⁻³²

são as propriedades intensivas dos sistemas. Quanto maior a CLA, maior é a diferença de composição entre as fases.³³

Outro fator importante a ser observado no diagrama é o ponto crítico (Pc), representado pela letra C (Figura 2). Neste ponto não é possível diferenciar as fases superior e inferior, pois ambas possuem as mesmas propriedades termodinâmicas.³⁴

A partir da composição das fases também se calcula a inclinação da linha de amarração (ILA), como descrito na equação 5:

$$ILA = \frac{C_P^S - C_P^I}{C_S^S - C_S^I} = \frac{\Delta C_P}{\Delta C_S} \quad (5)$$

na qual, ΔC_P é a diferença entre a concentração polimérica na fase superior e inferior e , ΔC_S é a diferença entre a concentração salina, também nas respectivas fases.³⁵⁻³⁸

Algumas propriedades físico-químicas influenciam o comportamento do sistema aquoso bifásico, dentre as quais podemos citar a temperatura, a massa molar do polímero, o tipo de sal empregado e o pH.

Quanto ao efeito da temperatura, diversos estudos mostram que, o aumento desta causa o incremento da área bifásica, deslocando a binodal para a área inferior do diagrama, correspondente a menores quantidades de sal e de polímero.³⁹⁻⁴² Silva e Loh, além da avaliação da energia livre de Gibbs propuseram um mecanismo molecular no qual a formação de um sistema bifásico ocorre devido à interação endotérmica íon-polímero (fatores entálpicos) e à mudança na conformação da cadeia polimérica (fatores entrópicos).⁴³ Tais fenômenos são altamente favorecidos pelo aumento da temperatura.

A partir dos estudos de Albertsson observa-se que, de uma forma geral, o aumento da massa molar faz com que a massa de polímero necessária para que se alcance o ponto crítico de saturação, ou seja, o ponto no qual o sistema deixa de ser monofásico e passa a ser bifásico, seja menor.²⁴ Padilha e colaboradores analisaram a influência da massa molar do polímero na construção dos diagramas de equilíbrio de fase.²⁵ Os resultados,

como podem ser observados a seguir (Figura 2) corroboram as conclusões de Albertsson acerca desse fenômeno. Para uma mesma concentração salina (%) é necessária uma menor quantidade de PEG 4000 g.mol⁻¹ em relação ao PEG 400 g.mol⁻¹ (Representados por PEG 4000 e PEG 400), para que se alcance o equilíbrio do sistema bifásico.

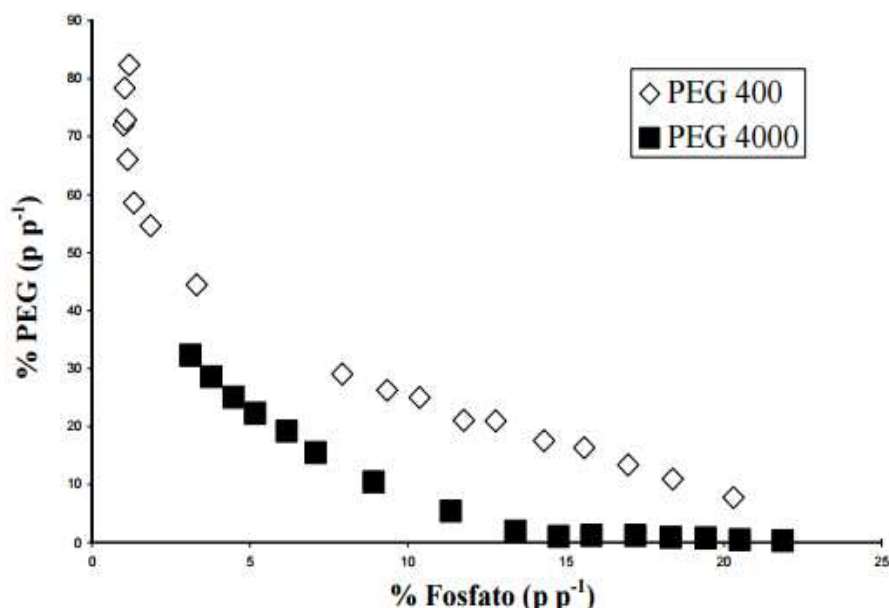
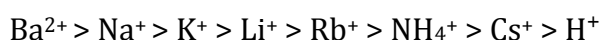


Figura 3: Curvas de equilíbrio para PEG/ fosfato em pH 8. ³⁰

Os íons influenciam na formação de um sistema bifásico devido à sua interação tanto com o polímero quanto com as moléculas de água. Essa capacidade de indução à formação de um equilíbrio bifásico pode ser explicada, com base em uma aproximação termodinâmica, a partir das séries de Hofmeister e da energia livre de hidratação. A série de Hofmeister é uma série empírica que classifica os íons de acordo com a sua capacidade de induzir o efeito *salting-out* em proteínas. Para os cátions a série é: ⁴⁵⁻⁴⁷



Em termos de energia livre de hidratação, quanto mais negativa for esta, maior será a camada de hidratação do íon e menos moléculas de água estarão disponíveis para solubilizar o polímero.⁴

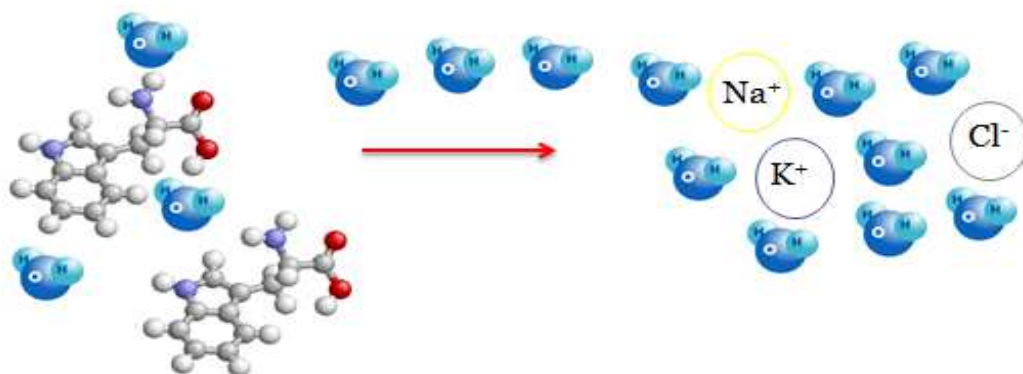


Figura 4: Migração das moléculas de água na formação da camada de hidratação dos íons

1.2 Aplicação dos sistemas aquosos bifásicos na partição de biomateriais

A distribuição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis é um fenômeno de equilíbrio governado pelas interações químicas existentes entre o soluto e o solvente. Para um determinado soluto S distribuído em uma fase orgânica (org) e uma fase aquosa (aq) podemos escrever o equilíbrio como:



A razão entre a concentração de $S_{(aq)}$ e $S_{(org)}$ é uma constante K denominada coeficiente de distribuição ou coeficiente de partição. A constante K indica a tendência de S em se distribuir preferencialmente em uma das fases.⁴⁹

A metodologia que aplica o princípio da partição para separar um componente de uma mistura é denominada extração líquido-líquido e tem sido largamente utilizada para a extração de compostos orgânicos e inorgânicos.⁵⁰ Um dos inconvenientes da extração

líquido-líquido clássica é a utilização de solventes orgânicos, muitas vezes voláteis, tóxicos e inflamáveis, como por exemplo o diclorometano e o éter. Além disso, a técnica se torna ineficiente na extração de compostos biológicos, tais como as proteínas, uma vez que estas podem sofrer um processo de desnaturação por solventes orgânicos, levando à sua inatividade.⁵¹

Em geral, os processos de purificação de extratos proteicos brutos possuem de três a quatro fases que incluem a precipitação da proteína seguida de métodos de separação cromatográficos (cromatografia por troca iônica, cromatografia por afinidade, cromatografia por exclusão molecular).^{52,53} Contudo, essa metodologia ainda apresenta inconvenientes devido ao elevado tempo de operação, alto custo envolvido e a dificuldade de ampliar a técnica para um escala industrial. Muitos extratos proteicos, por conterem pigmentos, óleos e outras substâncias complexas, podem ainda danificar as colunas de equipamentos cromatográficos, impedindo assim a continuidade do processo de purificação.⁵⁴ É neste contexto que os sistemas aquosos bifásicos surgem como uma alternativa viável e sustentável, do ponto de vista ambiental e econômico.

Os sistemas aquosos bifásicos são facilmente ampliados para a escala industrial, são de fácil operação, curto tempo de estabilização, apresentam alta seletividade dos compostos de interesse, são atóxicos e possuem baixo impacto ambiental. Além disso, os reagentes podem ser reutilizados e os sistemas, uma vez que são formados por 70 a 80% de água, são biocompatíveis, o que elimina o risco de perda da atividade biológica dos compostos em fase de purificação.^{1,24,55}

As etapas de purificação utilizando um sistema bifásico incluem: a) a seleção de um sistema otimizado a partir de estudos prévios, b) o preparo do sistema bifásico com a inserção do extrato proteico contendo a proteína de interesse e impurezas, c) a homogeneização do sistema, d) a estabilização do sistema e a separação de fases. Estas etapas podem ser observadas esquematicamente na Figura 3.

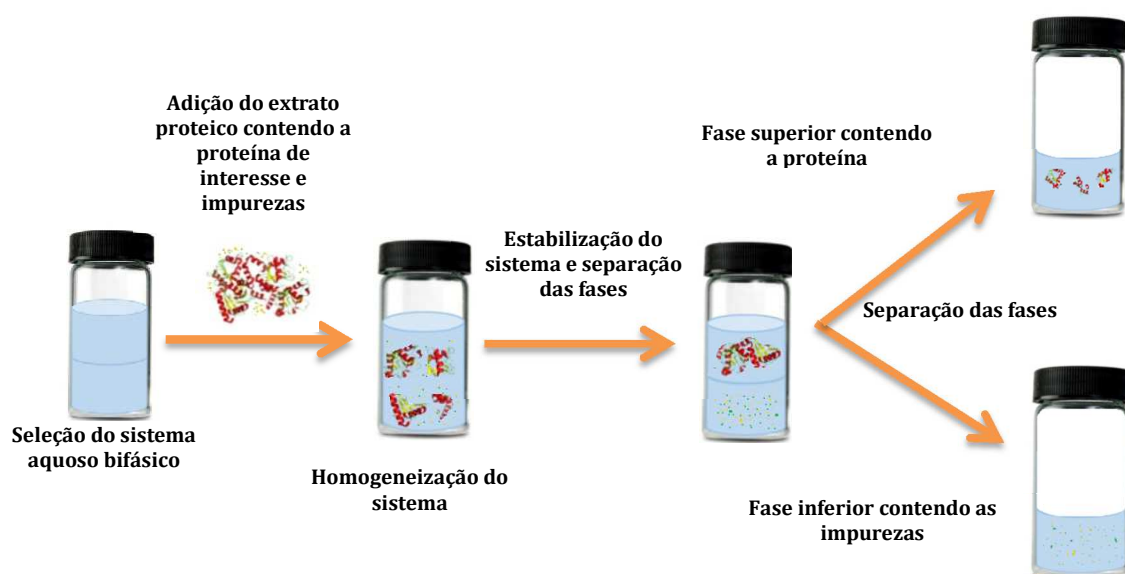


Figura 5: Esquema da purificação de uma proteína utilizando um sistema aquoso bifásico

A eficiência e seletividade da separação será determinada pelas características tanto do sistema quanto da proteína. Dentre tais características podemos citar: a massa molar do polímero, concentração dos componentes, pH do meio e a temperatura.⁵⁶

Estudos demonstram que o aumento da massa molar do polímero causa a diminuição na eficiência da partição da proteína. Isso ocorre, pois com o aumento da massa molar do polímero e da cadeia polimérica tem-se menos espaço disponível para a acomodação do biomaterial, forçando-o a se particionar preferencialmente na fase inferior, ou fase salina. Esse efeito é conhecido como volume de exclusão molecular.^{57,58}

A concentração dos componentes pode ser relacionada com o comprimento da linha de amarração (CLA) e para avaliar esta correlação, dois efeitos devem ser observados: a diminuição do volume livre na solução — efeito do volume de exclusão molecular - e o aumento da força iônica - efeito *salting-out*. A proteína se particionará preferencialmente na fase oposta ao efeito mais intenso. Se os dois possuírem a mesma intensidade, a biopartícula se precipitará na interface do sistema.⁵⁹⁻⁶¹

O efeito do pH se correlaciona diretamente com o potencial da superfície do biomaterial, principalmente quando se fala de proteínas. É sabido que proteínas, devido a grupamentos amino e carboxil, podem apresentar-se positivamente ou negativamente carregadas, quando presentes em meios ácidos ou básicos respectivamente. O pH, portanto, influenciará na partição da proteína por um efeito eletrostático. Proteínas negativamente carregadas sofrerão repulsão dos íons presentes na fase salina, tendendo a se particionar preferencialmente junto aos polímeros, já proteínas positivamente carregadas sofrerão atração destes mesmos íons, ficando retidas na fase inferior.⁶²

A forma da proteína também pode ser alterada por uma mudança no pH. Na literatura é reportado que a lectina ConBr apresenta um equilíbrio dímero-tetrâmero na faixa de pH 5 a 8,5, prevalecendo a forma tetramérica, com o aumento do pH. Uma vez que a forma tetramérica tem maior afinidade pela fase hidrofóbica, rica em polímeros, os maiores coeficientes de partição são alcançados quando se trabalha nos limites superiores da faixa apresentada.⁶³

1.3 Proteína ConBol obtida a partir da *Canavalia boliviana*

O primeiro relato sobre lectinas data de 1888 quando pesquisadores, ao estudarem a toxicidade do extrato da mamona, observaram sua capacidade para aglutinar eritrócitos. Posteriormente foi comprovado que esta propriedade era devido à presença da ricina, uma proteína presente no extrato. Apesar da data, foi somente na década de 60 que o estudo das lectinas ganhou impulso e as primeiras aplicações começaram a ser identificadas.^{64,65}

A definição mais aceita para lectinas é que são proteínas de origem não imune que possuem no mínimo um domínio não-catalítico e que se ligam reversivelmente e especificamente a um mono ou a um oligossacarídeo.⁶⁶

As lectinas estão largamente distribuídas na natureza sendo encontradas em seres unicelulares, animais e vegetais. Neste último grupo se concentram principalmente nas sementes, mas podem também ser encontradas nas cascas, folhas, e flores. As que são

encontradas em órgãos de armazenagem de plantas, como tubérculos, sementes e raízes, são mais interessantes para estudos pois se encontram em quantidades preparativas.⁶⁷⁻⁶⁹

O grande interesse da comunidade científica acerca das lectinas advém de sua capacidade de se ligar a açúcares, apresentando diversos efeitos biológicos que podem ser utilizados, por exemplo, na ação contra insetos, fungos, bactérias e ainda na inibição do crescimento de células tumorais.⁷⁰⁻⁷³

A lectina (ConBol) utilizada neste trabalho foi isolada a partir da *Canavalia bolviana*, uma angiosperma dicotiledônea pertencente à família *Leguminosae papilionaceae*, encontrada principalmente na Bolívia, Peru e no norte do Brasil. De acordo com literatura, a lectina Conbol apresenta-se como um tetrâmero formado por 237 aminoácidos e com massa molar aproximado de 25,6 KDa.⁷⁴⁻⁷⁶

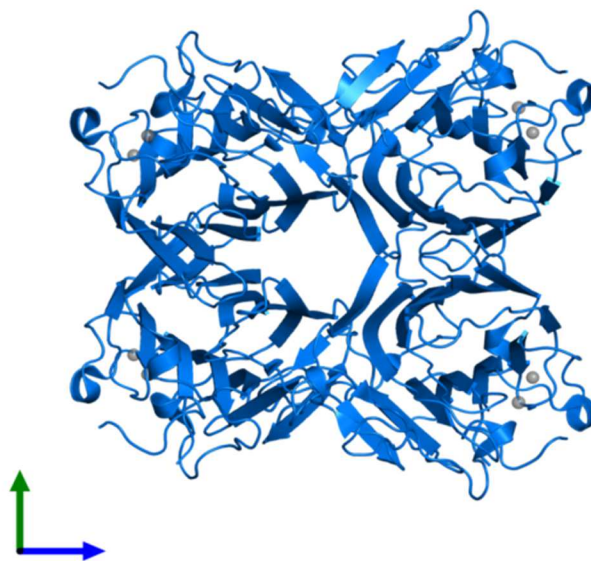


Figura 6: Proteína Conbol ⁷⁶

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Walter, . H.; Brooks D.E.; and D. Fisher (Editors), Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology, Academic Press, Orlando, FL, 1985.
2. Silvério, F.O.; Silva, J.G.S.; Aguiar, M.C.S.; Cacique, A.P; Pinho, G.P. Analysis of pesticides in water using liquid-liquid extraction with partition at low temperature and high performance liquid chromatography. *Quim Nova*, **2012**, 35, 10, .2052-2056.
3. Da Silva, G.C.; Da Cunha, J.W.S.D.; Dweck, J.; Afonso, J.C. Liquid-liquid extraction (LLE) of Fe(III) and Ti(IV) by bis-(2-ethyl-hexyl) phosphoric acid (D2EHPA) in sulfuric acid medium. *Quím Nova*, **2008**, 31, 5, 1230-1236.
4. Woller, N; Subklew, G; Schwuger, M.J.. Reactive liquid-liquid extraction of heavy metals from leachate with oil-soluble complexing surfactants. *Colloid Surface A*, **1996**, 117, 189-200.
5. Glyk, A.; Scheper, T; Beutel S. Influence of Different Phase-Forming Parameters on the Phase Diagram of Several PEG–Salt Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chem Eng Data* **2014**, 59, 850–859.
6. Govindarajan, R.; Perumalsamy, M. Phase Equilibrium of PEG 2000 + Triammonium Citrate + Water System Relating PEG Molecular Weight, Cation, Anion with Effective Excluded Volume, Gibbs Free Energy of Hydration, Size of Cation, and Type of Anion at (298.15, 308.15, and 318.15) K. *J. Chem Eng Data* **2013**, 58, 2952–2958.
7. Moattari, M. T. Z.; Hanzezadeh, S.; Hosseinzadeh, S. Phase diagrams for liquid–liquid equilibrium of ternary poly(ethylene glycol) + di-sodium tartrate aqueous system and vapor–liquid equilibrium of constituting binary aqueous systems at T = (298.15, 308.15, and 318.15) K Experiment and correlation. *Fluid Phas Equilbr*, **2008**, 268, 142–152.

8. Moattar, M. T. Z.; Tolouei, S. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol 4000 and di-potassium tartrate, potassium sodium tartrate, or di-potassium oxalate: Experiment and correlation. *Calphad*, **2008**, 32, 655-660.
9. Malpiedi, P. L.; Fernandez, C.; Picó, G.; NERLI, B. Liquid-Liquid Equilibrium Phase Diagrams of Polyethyleneglycol + Sodium Tartrate + Water Two-Phase. *J. Chem. Eng. Data*, **2008**, 53, 1175-1178.
10. Govindarajan, R.; Divya, K.; Perumalsamy, M.. Phase Behavior and Density for Binary and Ternary Solutions of PEG 4000 + Triammonium Citrate + Water Aqueous Two Phase Systems at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **2013**, 58 ,2, 315-321.
11. Reschke, T.; Bransenbush, C.; Sadowski, G. Modeling aqueous two-phase systems: III. Polymers and organic salts as ATPS former. *Fluid Phas Equilbr*, **2015**, 387, 178-189.
12. Ali, M. S.; Ling, T. C.; Muniandy, S.; TAN, Y. S.; Raman, J.; Sabaratnam, V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polythicha* (MONT) Sacc by an aqueous two-phase system. *Sep Purif Technol*, **2014**, 122, 359-366
13. Souza, E. C.; Coimbra, J. S. R.; Oliveira, E. B.; Bonono, R. C. F. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B*, **2014**, 973, 84-88.
14. Vijayaragavan, K. S.; Zahid, A.; Young, J. W.; Heldit, Caryn L. Separation of porcine parvovirus from bovine serum albumin using PEG-salt aqueous two-phase system. *J Chromatogr B*, **2014**, 967, 118-126.
15. Prinz, A.; Honig, J.; Schuttmann, I.; Zorn, H.; Zeiner, T. Separation and purification of laccases from two different fungi using aqueous two-phase extraction. *Process Biochem* **2014**, 49, 335-346.

16. Maciel, M. H.C.; Ottoni, C. A.; Herculano, P. N.; Porto, T. S.; Porto, A. L. F.; Santos, C.; Lima, N.; Moreina, K. A.; Motta, C. S. Purification of polygalacturonas produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilib*, **2014**, 371, 125-130.
17. Araújo, R. F. F.; Porto, T. S.; Martins, D. B. G.; Dutra, R. F.; Porto, A. L. F.; Lima-filho, J.L. Partitioning of lactate dehydrogenase from bovine heart crude extract by polyethylene glycol-citrate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilib*, **2011**, 301, 46-50.
18. Porto, T. S.; Silva, M. G. M.; Porto, C. S.; Cavalcanti, M. T. H.; Neto, B. B.; Lima-filho, J. L.; Conventi, A.; Porto, A. L. F. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Eng*, **2008**, 47, 716-721.
19. Malpied, L. P.; Romanini, D.; Pico, G. A.; Nerli, B. B.. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. *Sep and Purif Technol*, **2009**, 65, 40-45
20. Silva, C. A. S.; Coimbra, J. S. R.; Rojas, E. E. G.; Teixeira, J. A. C.. Partitioning of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems. *Process Biochem*, **2009**, 44, 1213-1216.
21. Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective *J Chromatogr A*, **2011**, 1218, 49,, 8826-8835
22. Zaslavsky, B. Y. Aqueous two-phase partitioning. Physical chemistry and bioanalytical applications. New York: Marcel Dekker, **1995**.
23. Muruchi, L.; Galleguillos, H. R.; Jimenez, Y. P. Aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 4000 and ferrous sulfate at different temperatures. *Fluid Phase Equilib*, **2016**, 412, 29-38
24. Albertsson, P. A. Partition of cell and macromolecules. New York: John Wiley, 1960.

25. Hatti-Kaul, R. Aqueous two-phase Systems: Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press. 2000.
26. Silvério, S. C.; Rodríguez, O.; Teixeira, J. A.; Macedo, E. A. The Effect of Salts on the Liquid-Liquid Phase Equilibria of PEG600 + Salt Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chem Eng Data*, **2013**, 58, 3528-3535
27. Xie, X.; Yan, Y.; Han, J.; Wang, Y.; Yin, G.; Guan, W. (2010). Liquid- liquid equilibrium of aqueous two-phase systems of PPG400 and biodegradable salts at temperatures of (298.15, 308.15, and 318.15) K. *J Chem Eng Data*, **2010**, 55,8, 2857-2861
28. Lenardão, E. J.; Freitag, M. J.; Dabdoub, A. C. F. Batista, Silveira, C. C. Green Chemistry – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quím Nova*, **2003**, 26, 123-129
29. Silva, Luis H. M. Uso da calorimetria em estudos físico-químicos de processos responsáveis pela formação de sistemas líquidos bifásicos contendo poli (óxido de etileno). 2001. 102 f. Tese de doutorado. Instituto de Química da Unicamp. Campinas, São Paulo, 2001.
30. Zhang, W., Hu, Y.; Wang, Yun.; Han, J.; Ni, L. Wu, Y. Liquid-liquid Equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) of different molecular weights and several ammonium salts at 298.15 K. *Thermochim Acta*, **2013**, 560, p 47-54.
31. Salabat, A.; Dashti, H. Phase compositions, viscosities and densities of systems PPG425 + Na₂SO₄+H₂O and PPG425 + (NH₄)₂SO₄ + H₂O at 298.15 K. *Fluid Phas Equilbr* **2004**, 216, 153-157.
32. Sarubbo, L.A.; Oliveira, L.A.; Porto, A.L.F.; Duarte, H.S.; Carneiro-Leão, A.M.A.; Lima-Filho, J.L.; Campos-Takaki, G.M.; Tambourgi, E.B.. New aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). *J Chromatogr B*, **2000**, 743, 79-84

33. Silva, M, C, H.; Silva, L. H., Pagiolli, F. J.; Coimbra, J. C. R. Minim, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. *Quím. Nova*, **2006**, 29, 6, 1332-1339
34. Martins, J. P. Partição de cianocomplexos em sistemas aquosos bifásicos com diferentes balanços hidrofílico-lipofílicos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2008.
35. Barbosa, A. A. Obtenção de dados de equilíbrio de sistemas aquosos formados por PEG, sulfato e água e partição de antocianina do jamelão. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.
36. Martins, J. P.; Mageste, A. B.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; PATRÍCIO, P. R.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **2009**, 54, 2891–2894
37. Rodrigues, G. D.; Teixeira, L. S.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Carvalho, R. M. M. Phase diagrams of aqueous two-phase systems with organic salts and F68 triblock copolymer at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **2010**, 55, 1158–1165.
38. Lemos, L. R.; Santos, I. J. B.; Rodrigues, G. D.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Carvalho, R. M. M. Phase compositions of aqueous two-phase systems formed by L35 and salts at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **2010**, 55, 1193–1199, 2010.
39. Yuliang, Li.; Yajing Wu. Experimental Determination of Phase Equilibrium in Aqueous Two-Phase Systems Containing Ionic Liquids and Sodium Salts at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data* **2015**, 60, 2003–2017.

40. Barrueto, Y.; Muñoz, K.; Garnica, K.; Villalobos, I.; Jimenez Y. P.; Aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 4000 and sodium molybdate at different temperatures. *Fluid Phas Equilbr*, **2015**, 399, 66–73.
41. Martins, J. P.; Oliveira, F. C.; Coimbra, J. S.; Silva, L. H. M.; Silva, M. C. H.; Nascimento, B.; Equilibrium Phase Behavior for Ternary Mixtures of Poly(ethylene) Glycol 6000 + Water + Sulfate Salts at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **2008**, 53, 2441–2443.
42. Hasa, H.; Mohsen-Nia, M.; Modarres, H.. Phase separations in aqueous two phase systems containing poly (ethylene glycol) and magnesium sulfate at different temperatures. *J. Chem. Thermod*, **2008**, 40, 573–579.
43. 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). *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 10069-10073
44. Costa, Angélica R. Partição de lactoferrinas em sistemas aquosos bifásicos. 2010. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de pós-graduação em engenharia de alimentos. Itapetinga, Bahia, .2010,
45. Padilha, G.; Ferreira, J. F.; Alegre, R. M.; Tambourgi, E. B.. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. *Acta Scient. Tech*, **2011**. 33, 1-4
46. 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. *J. Chem. Eng. Data*, **2012**, 57, 1203–1208
47. Baldwin, R. L. How Hofmeister Ion Interactions Affect Protein Stability. *Biophysical Journal*, **1996**, 71, 2056-2063.
48. Faria, N. Diego. Estudo e determinação de diagramas de fase e propriedades físico-químicas em sistemas aquosos bifásicos (SABs) formados por PEG/L64 + sais de fosfato e

em misturas binárias e ternárias baseadas em SABs. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. Programa de pós graduação em Química. Vitória, ES, 2015.

49. Skoog, D.A; West, D.M; Holler, F.J. & Stanley, R.C. Fundamentos da química Analítica,. Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed.Thomson, 2007.

50. Freire, E.F.; Miranda, J.L.; Maia, P.P.; Vieira, E.P.; Borges, K.B. ; Bastos De Siqueira, M.E.P. Diazepam and nordiazepam in plasma: Liquid-liquid and solid phase extraction in sample pretreatment for high performance liquid chromatography analysis. *Quím Nova* **2006**, 28,5, 773-776.

51. Ooi, C. W.; Tey, B. T.; Hii, S. L.; Kamal, S. M. M.; Lan, J. C. W.; Ariff, A.; Ling, Tau Chuan. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochem* **2009**, 44, 10, 1083-1087.

52. Melo, F. R.; Benevides, N. M.B.; Pereira, M. G.; Holanda, M. L.; Mendes, F. N.P.; Oliveira, S. R.M.; Freitas, A. L.P.; Silva, L. M.C.M. Purificação e caracterização parcial de uma lectina da alga marinha vermelha *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. *Rev. bras. Bot.* **2004**, 27, 2 , 263-269.

53. Medeiros, D. S.; Medeiros, T. L.; Ribeiro, J. K.C.; Monteiro, N. K.V.; Migliolo, Ludovico.; Uchoa, A. F. Vasconcelos, I. M.; Oliveira, A. S. Sales, M. P.; Santos, E. A.. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. *Comp Biochem Phys B*, **2010**, 155, 3, 211-2016.

54. Santana, M.A.; Santos, A.M.C.; Oliveira, M.E.; Oliveira, J.S.; Baba, E.H.; Santoro, M.M.; de Andrade M.H.G. A novel and efficient and low-cost methodology for purification of *Macrotyloma axillare* (Leguminosae) seed lectin. *Int J Biol Macromol*, **2008**, 43, 4, 352-358.

55. Marini, A.; Imelio, N.; Picó, G.; Romanini, D.; Farruggia, B. Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B*, **2011**, 879, 22, 2135-2141.
56. Ruiz-Ruiz, F.; Benavides, J.; Aguilar, O.; & Rito-Palomares; M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. *J Chromatogr A*, **2012**, 1244, 1-13.
57. Babu, B. R.; Rastogi, N.K.; Raghavarao, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chem Eng Process*. 2008, 47, 1, 83-89.
58. Patil, G.; Chethana,S.; Madhusudhan, M.C.; Raghavarao, K.S.M.S. Fractionation and purification of the phycobili proteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technol*, **2008**, 99, 15, 7393-7396.
59. Rito-Palomares, M.; Hernandez, M. Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B* **1998**, 711, 1-2, 81-90.
60. Madhusudhan, M.C.; Raghavarao, K.S.M.S.; Nene Sanjay. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction. *Biochem Eng. J*, **2008**, 38, 3, 414-420.
61. Nandini, K. E.; Rastogi, N. K..Liquid-Liquid Extraction of Lipase Using Aqueous Two-phase System. *Food Bioprocess Technol*, **2011**, 4, 295-303.
62. Gautam, S.; Simon, L.. Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. *Biochem Eng. J*. **2006**, 30,1, 104-108.

63. Nascimento, K. S. **Purification of *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr) by Aqueous Two-phase system.** Tese de doutorado. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior Técnico. Lisboa, Portugal, 2010.

64. Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, **1995**, 199, 109, 2, 347-352.

65. Gabor, F.; Bogner, E.; Weissenboeck, A.; Wirth, M.. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* **2004**, 56, 4, 459-480.

66. Kennedy J.F.; Palva, P. M. G.; Corella, M.T.S.; Cavalcant, M.S.M.; Coelhob, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, **1995**, 26, 3, p. 219-30

67. Imberty, A.; Wimmerova, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garbe, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes and Infect*, **2004**, 6, 2, 221-228.

68. Moura, R. M.; Queiroz, A.F.S.; Fook, J.M.S.L.L.; Dias, A.S.F.; Monteiro, N.K.V.; Ribeiro, J.K.C.; Moura, G.E.D.D.;Macedo, L.L.P.; Santos, E.A.; Sales, M.P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes. *Comp Biochem Phys A*, **2006**, 145, 4, 517-523

69. Latha, V. L.; Rao, R. N.; Nadmplli, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of Dolichos lablab (Indian lablab beans). *Protein Express Purifi.* **2006**, 45, 2, 296-306.

70. Coelho, M. B.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R.. Insecticidal action of Annona coriacea lectin against the flour moth Anagasta kuehniella and the rice moth Corcyra cephalonica (Lepidoptera: Pyralidae). *Comp Biochem Phys A*, **2007**, 146, 3, 406-414.

71. Stohy, M.; Doheim, M.; Badr, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chemistry*, **2007**, 104, 3, 971-979.
72. Santi-Gadelha T.; Gadelha, C. A. A.; Aragão, K. S.; Oliveira, C. C.; Mota, M. R. L., Gomes, R. C.; Pires, A. F.; Toyama, M. H.; Toyama, D. O.; Alencar, N. M. N.; Criddle, D. N.; Assreuy, A. M. S, Cavada, B. S,. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochem Bioph Res Co.* **2006**, 350, 4, 1050-1055.
73. Petrossian, K.; Banner, L. R.; Oppenheimer, S. B. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. *Acta Histochemica*, **2007**, 109, 6, 491-500.
74. International Legume Database & information Service. Disponível em: < <http://www.ildis.org/> > Acesso em: 20 de março de 2016.
75. Figueredo, J. G. **Potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da lectina de sementes de Canavalia boliviana piper: Mecanismos e mediadores envolvidos.** Tese de doutorado. Pós graduação em Bioquímica . Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 2010.
76. Protein Data Bank in Europe. Disponível em: < <https://www.ebi.ac.uk> >. Acesso em: 20 de março de 2016.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Determinar dados de equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG3350 + tartarato de potássio + H₂O, PEG10000 + tartarato de potássio + H₂O e PEG20000 + tartarato de potássio + H₂O, em pH 7 e a 288 K, 298 K e 308 K.
- Particionar a proteína ConBol, obtida a partir da *Canavalia boliviana*.

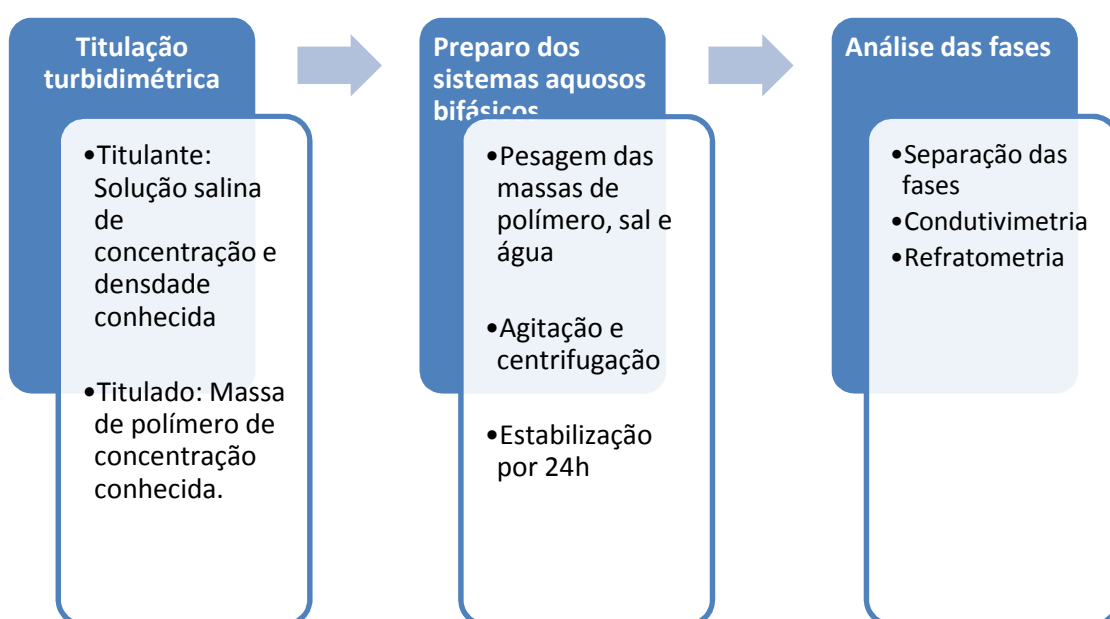
2.2. Específico

- Analisar a influência da temperatura, da massa molar do polímero e do tipo de cátion nas curvas de equilíbrio de fase dos sistemas formados por PEG e tartarato;
- Analisar a composição das fases, calcular o comprimento da linha de amarração (CLA) e a inclinação da linha de amarração (ILA);
- Avaliar a influência da temperatura sobre a inclinação da linha de amarração (ILA);
- Particionar a proteína Conbol, obtida a partir da *Canavalia boliviana* em sistemas formados por PEG 400, PEG 600 e PEG 1500 em tampão fosfato (K₂HPO₄/KH₂PO₄) pH 7;
- Calcular, a partir dos dados cromatográficos, o coeficiente de partição (K_p), a taxa de recuperação da proteína (Y) e a pureza (P_{HPLC})

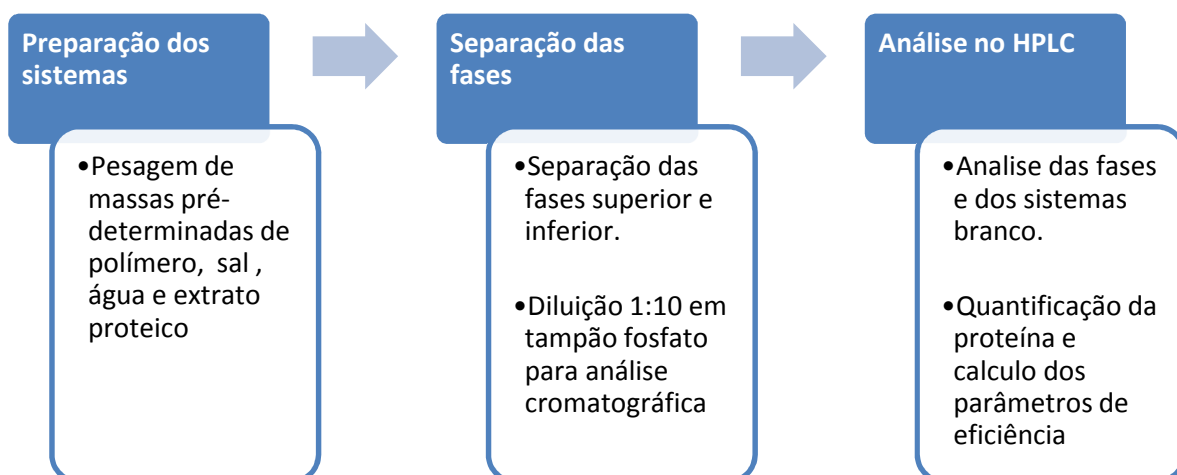
3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL

Nesta sessão serão apresentados de forma resumida os procedimentos adotados na realização deste trabalho. As especificações dos materiais, reagente e a instrumentação utilizada em cada etapa do estudo estarão detalhadas nas sessões 4 e 5 a seguir

3.1 Preparo e análise dos sistemas aquosos bifásicos



3.2 Partição da proteína Conbol em sistemas formados por PEG/tampão



4. ESTUDO DO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO FORMADO POR PEGs DE DIFERENTES MASSAS MOLARES E SAIS DE TARTARATO DE SÓDIO E POTÁSSIO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

4.1 RESUMO

No presente trabalho foram determinados os dados de equilíbrio dos sistemas aquosos formados por PEG3350 + tartarato de potássio + H₂O, PEG 10000 + tartarato de potássio + H₂O e PEG 20000 + tartarato de potássio + H₂O, em pH 7 e a 288,0 K, 298,0 K e 308,0 K. Os resultados mostram que o aumento da massa molar do polímero, assim como o aumento da temperatura, faz com que a curva binodal seja deslocada para valores menores de concentração de polímero e sal.

O efeito dos cátions Na⁺ e K⁺ sobre as curvas bimodais do PEG 3350 e PEG 2000 também foram avaliados. Observou-se que os sistemas constituídos pelo cátion Na⁺, alcançam o equilíbrio com valores de concentração de PEG e sal, ligeiramente menores do que os mesmos sistemas formados pelo cátion K⁺.

Palavras-chaves: Sistemas aquosos bifásicos; diagrama de fases, sais orgânicos, tartarato

4.2 INTRODUÇÃO

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são formados a partir da incompatibilidade entre soluções aquosas de dois polímeros diferentes ou polímeros e sais, sendo estes orgânicos ou inorgânicos. ¹ Quando dois polímeros são misturados ocorre a formação de agregados que levam à formação de duas fases diferentes. Durante a separação das fases ocorre a segregação dos componentes, ou seja, uma fase fica enriquecida com o polímero e a outra com o sal, ou outro polímero utilizado. ²

Na literatura encontram-se sistemas aquosos formados por diferentes materiais tais como polipropilenoglicol/PEG, PEG/Dextrana, ovoalbumina/caseína, PEG/ Na_2SO_4 . Os SABs formados por polímero/sal apresentam vantagens em relação aos sistemas formados por polímero-polímero por apresentarem baixa viscosidade e baixo custo. A viscosidade reduzida é interessante nesses sistemas, pois possibilita a migração do soluto entre as fases. ³

Algumas propriedades físico-químicas influenciam o comportamento do sistema aquoso bifásico, dentre as quais a temperatura, a massa molar do polímero, o tipo de sal empregado e o pH estão entre as mais estudadas.

A partir dos estudos de Albertsson observa-se que, de uma forma geral, o aumento da massa molar faz com que a massa de polímero necessária para que se alcance o ponto crítico de saturação, ou seja, o ponto no qual o sistema deixa de ser monofásico e passa a ser bifásico, seja menor.^{4,5}

Quanto ao efeito da temperatura, diversos estudos mostram que, o aumento desta causa o incremento da área bifásica, deslocando a binodal para a área inferior do diagrama, correspondente a menores quantidades de sal e de polímero.⁶⁻⁹

Os íons influenciam na formação de um sistema bifásico devido à sua interação tanto com o polímero quanto com moléculas de água. Essa capacidade de indução à formação de um equilíbrio bifásico pode ser explicada, com base em uma aproximação termodinâmica, da energia livre de hidratação quanto mais negativa for esta, maior será

a camada de hidratação do íon e menos moléculas de água estarão disponíveis para solubilizar o polímero.¹⁰

Buscando a redução dos impactos ambientais causados por resíduos de processos industriais, os sais inorgânicos utilizados para a construção de sistemas aquosos bifásicos têm sido substituídos por sais orgânicos biodegradáveis tais como os citratos, oxalatos e tartaratos. Quanto a estes últimos, as pesquisas recentes ainda têm tido como foco o desenvolvimento e o estudo das propriedades dos sistemas bifásicos formados por estes sais juntamente com o polietilenoglicol.^{11,12,}

Neste trabalho foram determinados os dados de equilíbrio dos sistemas aquosos formados por PEG3350 + tartarato de potássio + H₂O, PEG 10000 + tartarato de potássio + H₂O e PEG20000 + tartarato de potássio + H₂O, em pH 7 e a 288,0 K, 298,0 K e 308,0 K.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Materiais

Os polímeros utilizados foram comprados da Sigma Aldrich®. O tartarato de potássio e o tartarato de sódio foram comprados da Dinâmica®, possuindo grau de pureza de 99%. Durante todo o procedimento foi utilizada água ultra pura obtida a partir de um ultrapurificador da marca Gehaka®, com condutividade inferior a 0,06 µS/cm.

4.3.2 Procedimento experimental

4.3.2.1 Titulação turbidimétrica

A titulação turbidimétrica foi feita em um tubo de ensaio. A uma massa de aproximadamente 1,0000g de solução polimérica, de concentração pré-determinada, foram adicionados volumes de 25 μ L de solução salina, até que se observasse turbidez no sistema. Posteriormente volumes de 25 μ L de água foram adicionados ao sistema, até que este retornasse ao estado monofásico. Este procedimento é repetido sucessivas vezes até que se obtenha uma curva turbidimétrica, na qual cada ponto corresponde às concentrações de polímero e sal em que o sistema se apresentou turvo.

Foi feita uma titulação turbidimétrica para cada polímero (PEG 3350, 10000 e 20000) e sal (tartarato de potássio e tartarato de sódio) individualmente, nas temperaturas estudadas (288, 298, 308 e 318 K). Um banho ultratermostático (SL152 Solab®) foi utilizado para controlar a temperatura do sistema.

Para efetuar a titulação turbidimétrica foram preparadas soluções estoque de cada polímero e de cada sal. As concentrações dos polímeros variaram de 20 a 40% (m/m) e as de sal de 30 a 44% (m/m).

A massa específica das soluções salinas foi determinada pelo método picnométrico variando de 1,1450 a 1,2461 g/cm³.

4.3.2.2 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Para a construção dos diagramas de fase foram preparados sistemas aquosos bifásicos em tubos de 15 mL, sendo o total de quatro tubos para cada diagrama estudado. Cada sistema foi pesado, separadamente, em uma balança analítica (Shimadzu® com precisão de 0,0001g), até uma massa final de 8,0000g. Todos os sistemas foram agitados em vortex (VS-38 Warmnest®), centrifugados (LS-3 Plus

CELM®) por 15 minutos a 2400 rpm e posteriormente deixados em repouso em um banho termostatzado (SL 152 SOLAB® com precisão de 0,1°C) à temperatura pré-determinada (298,0, 308,0 e 318,0 K) por 24h.

4.3.2.3 Análise das fases dos SABs

Após alcançar o equilíbrio termodinâmico, as fases superior e inferior foram separadas. Sendo a fase superior retirada com o auxílio de uma micropipeta de 1000µL e a fase inferior retirada com uma seringa com agulha. Com as fases separadas foram realizadas a quantificação de cada componente presente nas mesmas, sendo eles o PEG e o sal. As técnicas utilizadas para quantificá-las foram o índice de refração (KRÜSS optronic GmbH) e condutivimetria (MS Tecnoyon Instrumentação), respectivamente.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 .Análise dos efeitos da massa molar do polímero, da temperatura e do tipo de sal sobre os sistemas aquosos bifásicos

O estudo da influência da massa molar do polímero foi feito analisando as curvas binodais obtidas a partir da titulação turbidimétrica dos PEGs de massa molar 3350, 10000 e 20000 g.mol⁻¹ e tartarato de potássio e sódio a 298,0 K.

Como é possível observar nos resultados (Figuras 7 e 8) o aumento da massa molar do polímero faz com que a massa de polímero e sal necessária para a formação de um sistema aquoso bifásico seja menor.

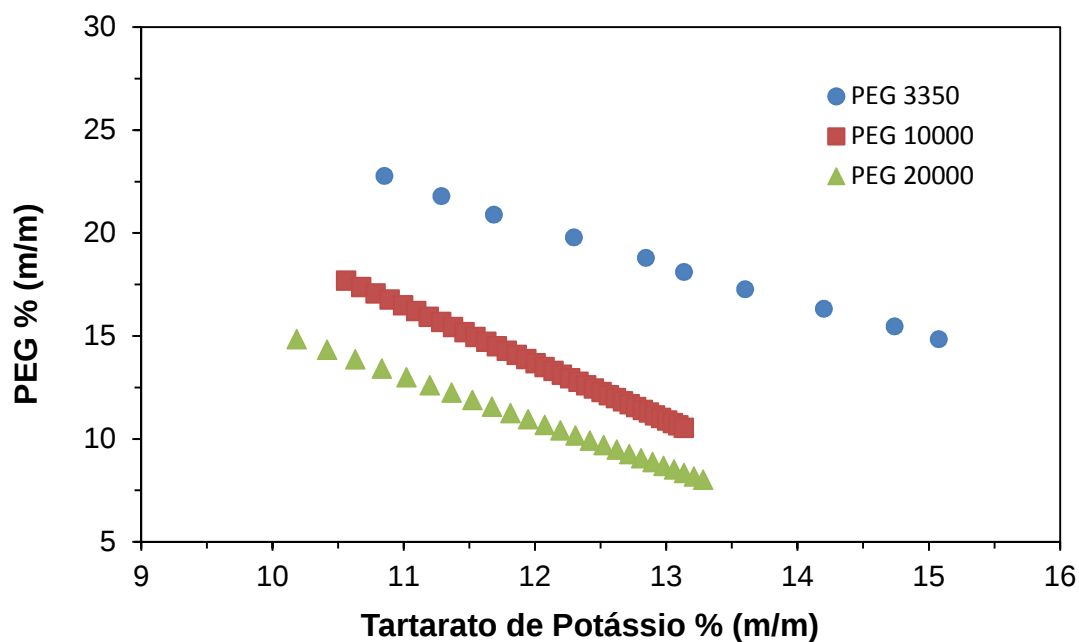


Figura 7: Curvas binodais para PEGs de diferentes massas molares (●) 3350, (■) 10000 (▲) 20000 e sais de tartarato de potássio a 298 K

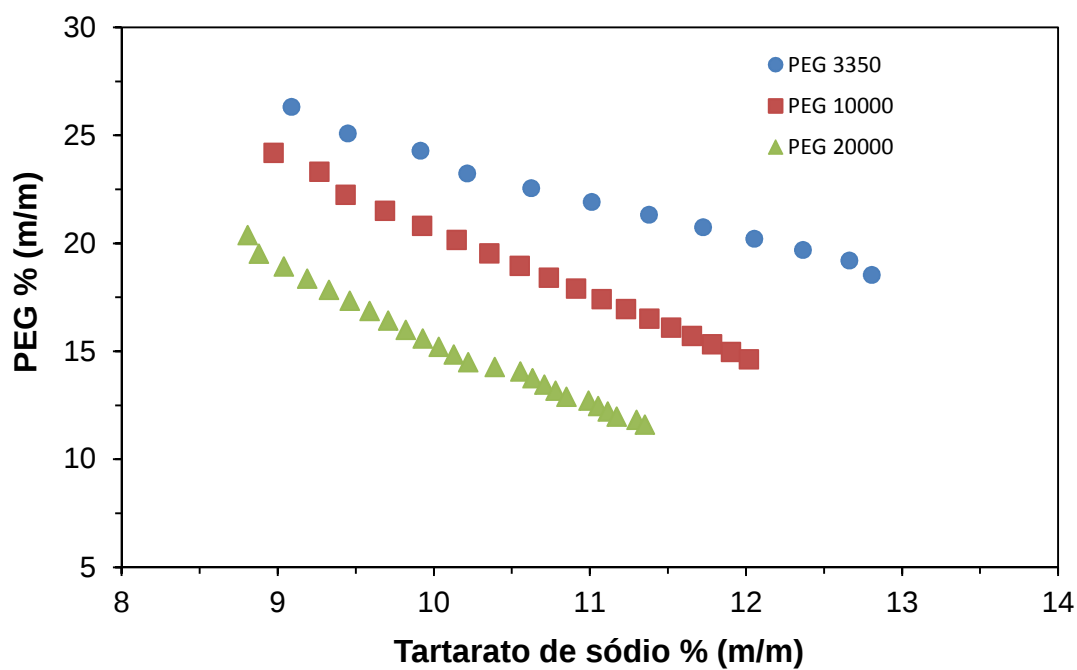


Figura 8: Curvas binodais para PEGs de diferentes massas molares (●) 3350, (■) 10000 (▲) 20000 e sais de tartarato de sódio a 298 K

PEGs com elevada massa molar também possuem um caráter hidrofóbico mais acentuado em relação àqueles de massas molares menores, conseqüentemente, a incompatibilidade entre os componentes formados do sistema bifásico também é maior. Outros resultados similares são encontrados na literatura, como exemplo podemos citar Silva e colaboradores que trabalhando com sistemas formados por PEG 1000 + fosfato e PEG 8000 + fosfato em pH 7 a 298 K observou que a curva binodal do PEG 8000 é deslocada para menores concentrações de sal e polímero em relação à curva do PEG1000 (Figura 9).¹³

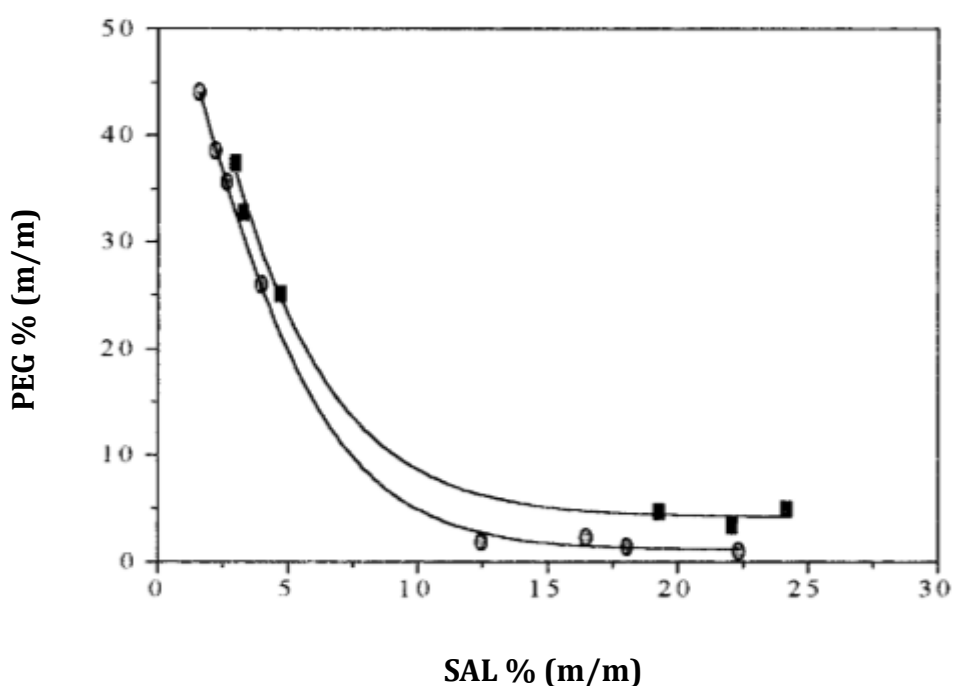


Figura 9: Curvas bimodais a 298 K e pH 7 para os polímeros PEG 1000 (■) e PEG 8000 (●)¹³

Forcinit e colaboradores estudando sistemas formados por PEG 4000, PEG 6000, PEG 10000, PEG 20000 e dextrana, também observou que o aumento da massa molar do polímero faz com que as curvas binodais sejam deslocadas para menores concentrações de polímero e dextrana.¹⁴

A influência do cátion na formação do sistema aquoso bifásico foi observada na construção das curvas bimodais para os PEGs 3350 e 20000 e tartarato de potássio e sódio, como pode ser observado nas Figuras 10 e 11.

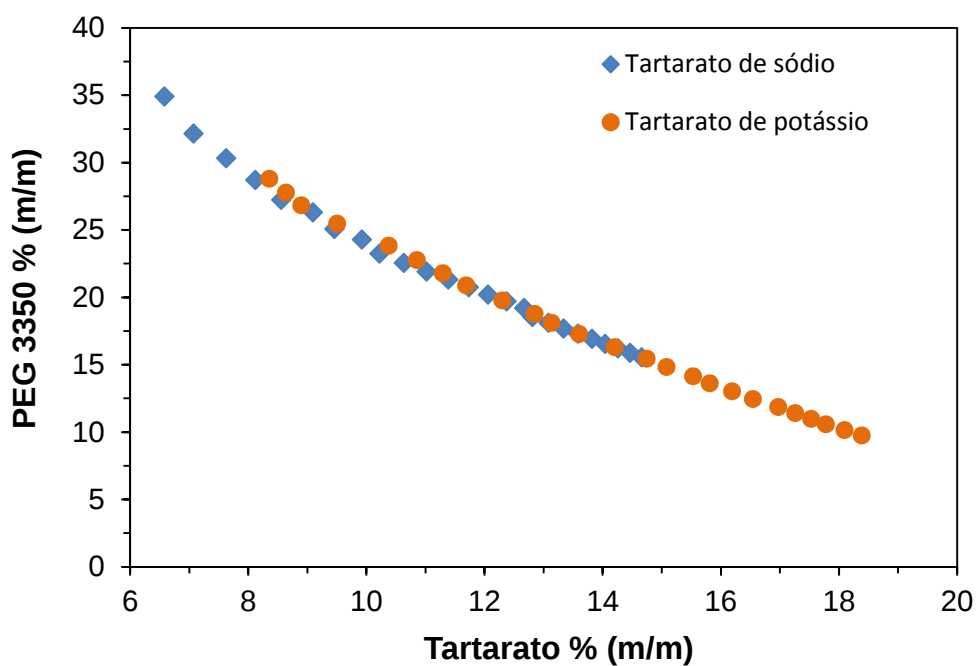


Figura 10: Curvas binodais para PEG 3350 e tartarato de (♦) sódio e (●) potássio

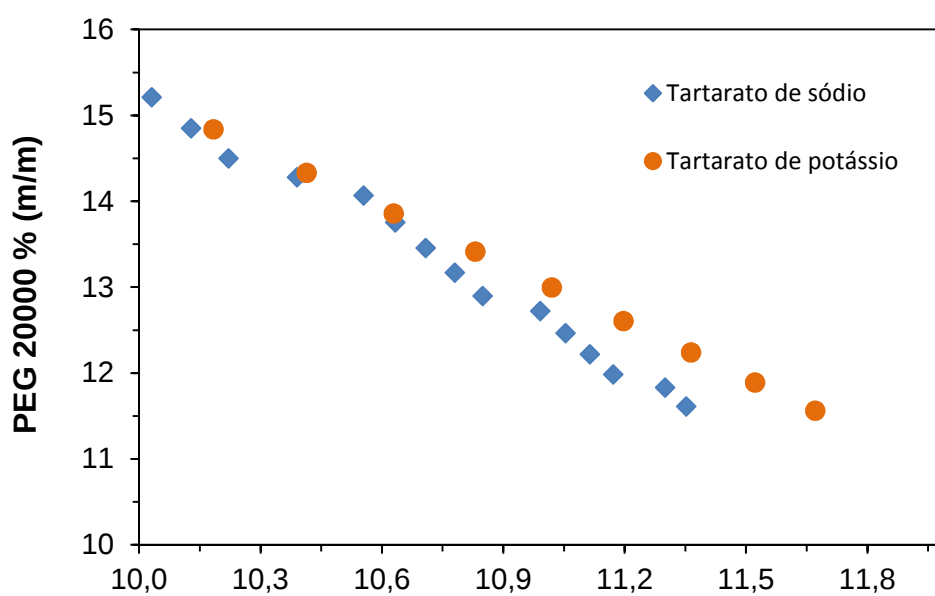


Figura 11: Curvas binodais para PEG 2000 e tartarato de (♦) sódio e (●) potássio.

A diferença entre as binodais é um pouco mais acentuada para o PEG 20000 (na faixa de concentração do sal entre 10,80 e 11,40%) do que para o PEG 3350. Esse deslocamento da curva binodal é causado pelo cátion Na^+ e seu efeito *salting-out* maior do cátion K^+ . Isso significa que é necessária uma quantidade de sódio menor do que a de potássio para que o sistema bifásico seja formado.

Uma possível explicação para esse comportamento é dada a partir da energia livre de hidratação. Quanto mais negativa for essa energia, maior a capacidade do cátion de promover a separação das fases. Na literatura são reportados os valores de $\Delta G_{\text{hid}} = -365 \text{ kJ.mol}^{-1}$ para o sódio e de $\Delta G_{\text{hid}} = -295 \text{ kJ.mol}^{-1}$ para o potássio, o que corrobora os resultados e a justificativa apresentados.¹⁵

O efeito da temperatura foi avaliado nas curvas binodais do PEG 3350 e tartarato de potássio a 298, 308 e 318 K (Figura 12)

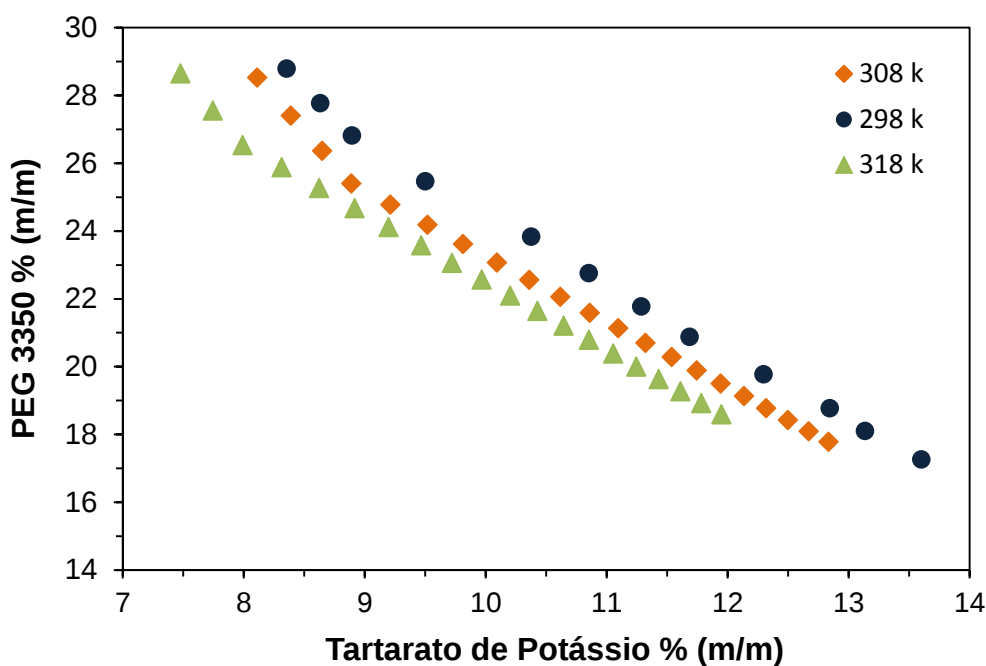
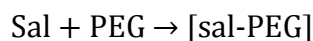


Figura 12: Curvas binodais para o PEG 3350 e tartarato de potássio a 298, 308 e 318K

Observa-se que o aumento da temperatura, faz com que a área bifásica do diagrama seja aumentada.

Para explicar esse comportamento do sistema inicialmente devemos considerar o equilíbrio existente entre o polímero e o sal:



$$k = [\text{sal-PEG}]/[\text{sal}][\text{PEG}] \quad (7)$$

Sendo a interação entre sal e PEG endotérmica, conclui-se que o aumento da temperatura desloca o equilíbrio da direção dos produtos. Assim, com o aumento da interação entre sal e PEG, uma maior quantidade de sal seria necessária para que um sistema bifásico fosse formado, contudo, o comportamento oposto é observado. Visto isso, além do comportamento entálpico, o comportamento entrópico do sistema também deve ser analisado.

O aumento da temperatura aumenta a energia cinética média das moléculas e estas ficam livres para se movimentarem o que leva ao aumento da sua entropia conformacional. No polímero o que se observa é o enovelamento da cadeia, devido à transição das ligações carbono-carbono da forma *trans* para a forma CIS (enovelada). Essa transição faz com que menos sítios ativos estejam disponíveis para interagir com o sal, diminuindo assim a quantidade de sal necessária para a saturação do sistema.¹

4.4.2 Análise das composições do equilíbrio de fase dos sistemas aquosos bifásicos formados por PEG3350 + tartarato de potássio + H₂O, PEG10000 + tartarato de potássio + H₂O e PEG20000 + tartarato de potássio + H₂O, em pH 7 e a 288 K, 298 K e 308 K

A análise dos componentes das fases é feita utilizando-se duas técnicas analíticas básicas: a refratometria – para determinar a concentração do polímero - e a condutivimetria – para determinar a concentração salina. Para tal, considera-se que:

1. O polímero, por ser um composto eletricamente neutro, não interfere na condutividade da solução e;
2. O índice de refração comporta-se de forma linear e aditiva em função da concentração de polímero e sal, o que pode ser descrito na forma da equação 8.

$$IR_{Total} = IR_{H_2O} + IR_{PEG} + IR_{sal} \quad (8)$$

Sendo IR_{H_2O} o índice de refração da água à 298K, IR_{PEG} o índice de refração do polímero e IR_{sal} o índice de refração do sal. O IR_{total} é o resultado da análise da fase.

A determinação da concentração do sal se faz de forma direta a partir da análise da condutivimetria e a correlação do resultado à curva de calibração. Já a determinação da concentração do polímero segue o raciocínio aditivo da equação 7 Deste modo temos:

$$IR_{Total} = IR_{H_2O} + IR_{PEG} + IR_{sal} \quad (8)$$

$$IR_{sal} = ([sal]) \cdot a \quad (9)$$

$$IR_{PEG} = IR_{total} - IR_{sal} - IR_{H_2O} \quad (10)$$

$$[PEG] = IR_{PEG} \cdot b \quad (11)$$

Sendo a o coeficiente angular da curva do índice de refração *versus* a concentração do sal e b o coeficiente angular da curva do índice de refração *versus* a concentração do polímero.

Os dados obtidos a partir da análise das fases dos sistemas aquosos bifásicos estudados encontram-se nas Tabelas 2, 3 e 4

Tabela 1: Dados de equilíbrio do sistema PEG 3350 + tartarato de potássio + H₂O a 288 K, 298 K e 308 K

LA	CLA	Composição global			Fase superior			Fase inferior		
		100 w PEG 3350	100 w _S	100 w _a	100 w PEG 3350	100 w _S	100w _a	100 w PEG 3350	100 w _S	100w _a
288 K										
1	43,46	24,00	15,20	60,80	38,39	5,78	55,79	2,78	30,70	66,53
2	47,80	25,99	15,70	58,30	41,99	4,88	53,07	3,24	32,70	63,89
3	52,09	28,00	15,70	56,30	45,79	3,96	50,22	4,14	35,25	60,62
4	56,14	29,99	16,20	53,80	48,66	3,62	47,71	4,50	38,29	57,26
298 K										
1	45,17	24,05	15,14	60,81	38,86	6,05	55,09	1,35	31,23	67,42
2	48,26	25,98	15,65	58,37	42,19	5,49	52,32	2,29	32,64	65,11
3	50,87	27,97	15,65	56,38	44,59	4,10	50,60	3,38	34,63	61,98
4	53,92	30,00	16,22	53,77	47,39	4,16	48,44	4,29	36,56	59,19
308 K										
1	49,72	24,00	15,20	60,80	42,99	4,69	52,34	0,69	30,81	68,47
2	52,68	26,00	15,70	58,30	45,33	4,61	50,07	1,39	33,67	64,97
3	56,92	28,01	15,70	56,29	48,13	3,87	48,00	1,17	36,04	62,80
4	58,98	30,00	16,19	53,10	49,72	3,71	46,56	2,30	38,79	58,93

Tabela2: Dados de equilíbrio do sistema PEG 10000 + tartarato de potássio + H₂O a 288 K, 298 K e 308 K

		Composição global			Fase superior			Fase inferior		
LA	CLA	100 w PEG10000	100 w _S	100 w _a	100 w PEG10000	100 w _S	100 w _a	100 w PEG 10000	100 w _S	100 w _a
288 K										
1	34,27	18,00	15,00	67,00	30,70	6,91	62,39	1,87	25,44	72,70
2	38,93	20,01	15,99	64,00	33,82	5,97	60,23	2,00	28,41	69,51
3	42,15	22,00	17,00	61,00	36,17	5,39	58,44	2,76	31,09	66,08
4	46,23	24,00	18,00	58,00	39,11	5,03	55,81	3,22	34,18	62,49
298 K										
1	34,48	18,03	14,97	67,00	29,99	7,00	63,02	1,09	25,95	73,05
2	39,71	19,99	15,99	64,02	32,81	6,20	61,00	1,42	29,24	69,35
3	43,31	21,99	16,99	61,02	35,70	5,29	59,00	1,54	32,15	66,30
4	47,76	24,01	17,98	58,01	39,11	3,22	57,68	1,81	35,35	62,86
308 K										
1	35,93	17,98	15,00	67,01	30,75	6,05	63,19	1,14	26,39	72,49
2	41,96	20,00	16,00	64,00	34,05	5,31	60,63	0,09	29,96	70,00
3	46,31	21,02	17,86	61,12	36,33	4,91	58,76	0,07	33,73	66,39
4	50,73	24,00	18,00	58,00	38,64	4,49	56,87	0,08	37,48	62,45

Tabela 3: Dados de equilíbrio do sistema PEG20000 + tartarato de potássio + H₂O a 288K, 298K e 308K

LA	CLA	Composição global			Fase superior			Fase inferior		
		100 w PEG 20000	100 w _S	100w _a	100 w PEG20000	100w _S	100w _a	100 w PEG20000	100w _S	100w _a
288 K										
1	33,99	13,97	15,03	70,99	31,66	5,96	62,38	1,76	22,13	76,11
2	37,07	16,00	15,69	68,30	34,46	5,47	60,08	2,12	23,60	74,30
3	40,62	17,99	16,41	65,60	37,32	4,84	57,83	2,60	25,91	71,47
4	45,08	19,89	17,18	62,70	39,99	4,42	55,58	2,53	29,50	67,94
298 K										
1	33,95	13,98	15,02	70,96	31,58	7,10	61,31	0,95	21,73	77,29
2	38,97	15,99	15,69	68,32	35,12	5,92	58,95	0,76	24,30	75,04
3	42,50	17,99	16,41	65,59	37,72	5,16	57,09	1,14	26,79	71,99
4	46,74	19,89	17,18	62,93	40,46	5,06	54,50	1,08	30,24	68,77
308 K										
1	36,90	13,99	15,00	71,01	34,12	6,32	59,56	0,79	22,17	77,03
2	39,07	16,01	15,70	68,29	35,72	5,74	58,54	1,22	24,06	74,73
3	43,08	18,00	16,40	65,60	38,92	5,07	56,02	1,62	26,64	71,78
4	47,25	19,99	17,29	62,72	40,79	4,91	54,30	1,05	30,46	68,50

O que se observa de uma forma geral nos três sistemas estudados nas respectivas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K é o aumento da concentração do polímero na fase superior. Este aumento, contudo, é pouco expressivo, possivelmente devido à pequena variação da temperatura e a elevada massa molar dos polímeros.

A temperatura, como exposto anteriormente, tem efeito entálpico e entrópico sobre o sistema. Esta reorganização conformacional torna o agregado polimérico mais hidrofóbico e faz com que as moléculas de água migrem espontaneamente para a fase inferior. Em termos numéricos esse comportamento poderia ser expresso como uma maior concentração dos polímeros na fase superior, e a diminuição da concentração de sal na fase inferior do sistema. Contudo a elevada massa molar dos polímeros estudados torna onerosa, do ponto de vista energético, uma reorganização estrutural significativa. Estes resultados podem ser mais bem observados nas Figuras 13, 14 e 15

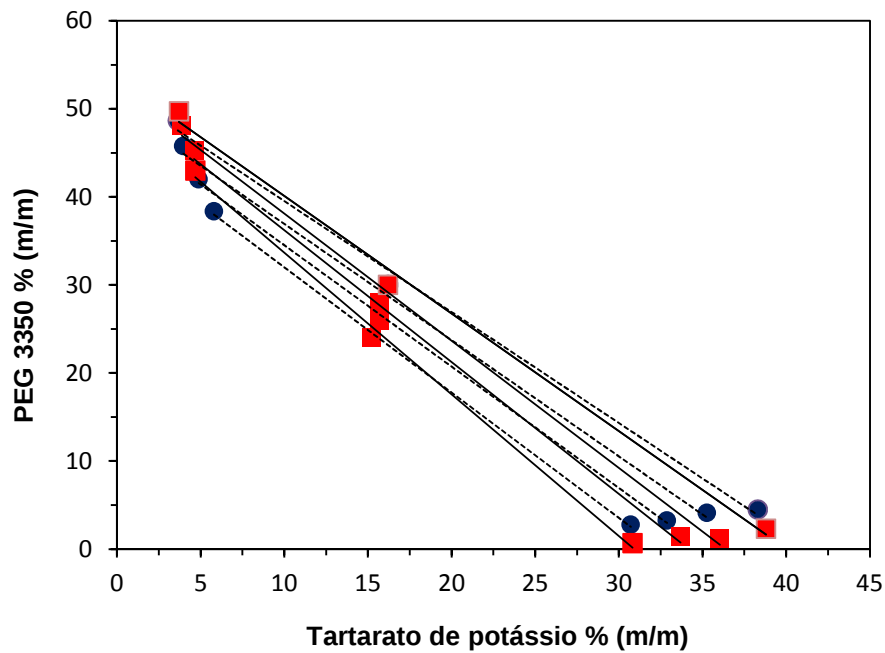


Figura 13: Efeito da temperatura sobre o diagrama de fase do sistema formado por PEG 3350 + tartarato de potássio + H₂O a 288 K (●) e 308 K (■)

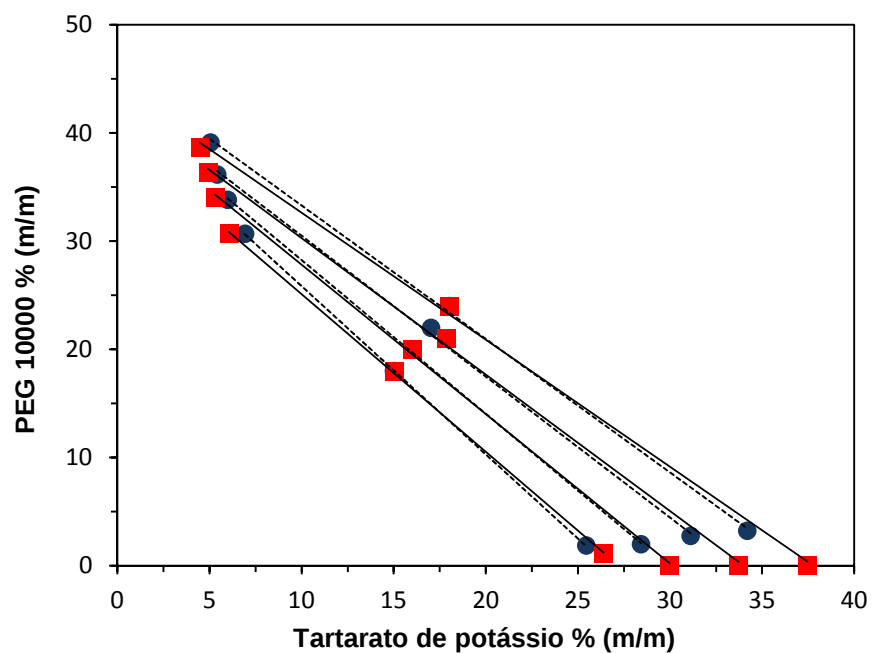


Figura 14: Efeito da temperatura sobre o diagrama de fase do sistema formado por PEG10000 + tartarato de potássio + H₂O a 288 K (●) e 308 K (■)

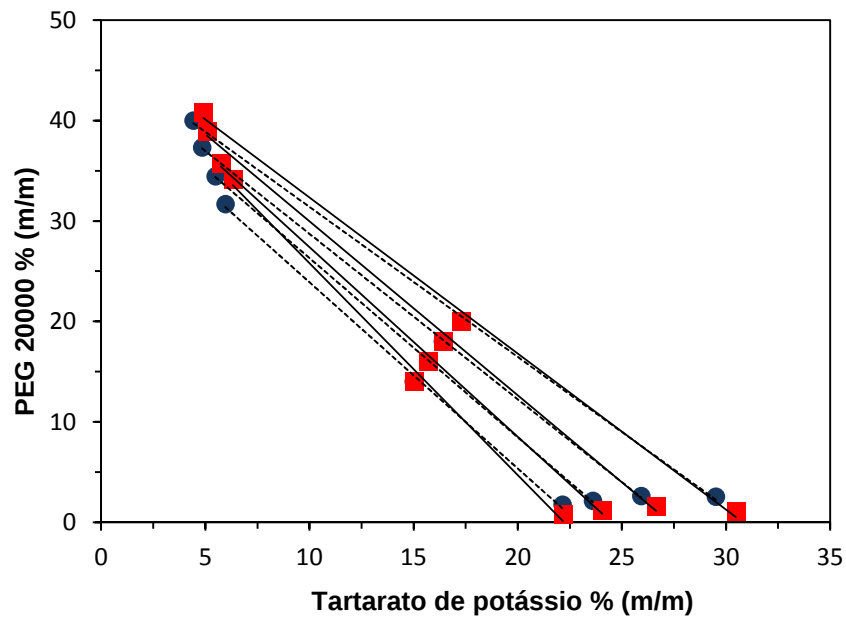


Figura 15: Efeito da temperatura sobre o diagrama de fase do sistema formado por PEG20000 + tartarato de potássio + H₂O a 288 K (●) e 308 K (■)

Outro fator a ser observado é o comportamento da Inclinação da Linha de Amarração (ILA) em relação à temperatura. A ILA é calculada pela Equação 9:

$$ILA = \frac{\Delta C_p}{\Delta C_s} \quad (12)$$

na qual ΔC_p e ΔC_s são as diferenças entre as concentrações de polímero e sal nas fases superiores e inferiores, respectivamente.

De um modo geral, o aumento da temperatura, com consequente expansão da área bifásica, faz com que o valor dessa inclinação, em módulo, aumente. Os valores cálculos para este estudo estão na Tabela 5

Tabela 5: Inclinação da linha de amarração calculada para o PEG 3350, PEG 10000 e PEG 2000 nas temperaturas de 288 K, 298 K e 308 K

c	PEG 3350	PEG 10000	PEG 20000
288 K			
1	-1,43	-1,56	-1,85
2	-1,38	-1,42	-1,78
3	-1,33	-1,30	-1,65
4	-1,27	-1,23	-1,49
298 K			
1	-1,49	-1,52	-2,09
2	-1,47	-1,36	-1,87
3	-1,38	-1,27	-1,69
4	-1,33	-1,16	-1,56
308 K			
1	-1,62	-1,46	-2,10
2	-1,51	-1,38	-1,88
3	-1,46	-1,26	-1,73
4	-1,35	-1,17	-1,56

O incremento nos valores da ILA, em função da temperatura, é pouco expressivo, assim como observado para os valores de composição das fases.

4.5 CONCLUSÃO

Foram obtidos dados de equilíbrio de fases para os sistemas formados por PEG 3350 + tartarato de potássio + H₂O, PEG 10000 + tartarato de potássio + H₂O e PEG 20000 + tartarato de potássio + H₂O, em pH 7 e a 288,0 K, 298,0 K e 308,0 K. Os resultados denotam que houve um aumento da área bifásica indicando que o processo de separação de fases é endotérmico, regido por fatores entálpicos e entrópicos. Contudo, vale ressaltar que a variação da área bifásica, é pouco expressiva, devido provavelmente, à elevada massa molar dos polímeros de estudo.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asenjo, J. A.; & Andrews, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *J. Chem Eng Data* , **2011**, 1218,49, 8826-8835.
2. Zaslavsky B.Y. Aqueous two-phase partitioning. Marcel Decker, New York, 1995.
3. Silvério, S. C.; Rodríguez, O.; Teixeira, J. A.; Macedo, E. A. The Effect of Salts on the Liquid–Liquid Phase Equilibria of PEG600 + Salt Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chem Eng Data*, **2013**, 58, 3528-3535.
4. Albertsson, PA. Partition of Cell Particles and Macromolecules. Stockolm: Almquist & Wiksells, 1960.
5. Padilha,G.; Ferreira, J. F.; Alegre, R. M.;Tambourgi, E. B.. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. *Acta Scientiarum. Technol*, **2011**, 33, 1, 1-4.
6. Yuliang, Li.; Yajing Wu. Experimental Determination of Phase Equilibrium in Aqueous Two- Phase Systems Containing Ionic Liquids and Sodium Salts at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **2015**, 60, 2003–2017.
7. Barrueto, Y.; Muñoz, K.; Garnica, K.; Villalobos, I.; Jimenez Y. P. Aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 4000 and sodium molybdate at different temperatures. *Fluid Phase Equil*, **2015**, 399 , 66–73.
8. Martins,J. P.; Oliveira, F. C.; Coimbra, J. S.; Silva, L. H. M.; Silva, Silva, M. C. H.; Nascimento, B.; Equilibrium Phase Behavior for Ternary Mixtures of Poly(ethylene) Glycol 6000 + Water + Sulfate Salts at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **2008**, 53, 2441–2443.
9. Hasa, H.; Mohsen-Nia, M.; Modarres, H.. Phase separations in aqueous two phase systems containing poli (ethylene glycol) and magnesium sulfate at different temperatures. *J. Chem. Thermod*, **2008**, 40, 573–579.

10. Nascimento, K. S.; Rosa, P. A. J.; Cavada, B. S.; Azevedo, A. M.; & Aires-Barros, M. R. Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology. *Sep Purif Technol*, **2010**, 75, 1, 48-54.
11. Da Silva, M.D.C.H.; Da Silva, L.H.M.; Paggioli, F.J.; Coimbra, J.S.R.; Minim, L.A. Sistema aquoso bifásico: Uma alternativa eficiente para extração de íons. *Quím Nova*, **2006**, 29, 6, 1332-1339.
12. Street, G. Highly Selective Separations in Biotechnology. Springer Science & Business Media, 2012.
13. Silva, M. L. H.; Coimbra, J. S. R.; Meirelles, A. J. A. Equilibrium phase behavior of poly(ethylene glycol) + potassium phosphate + water two-phase systems at various pH and temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **1997**, 42, 398–401.
14. D. Forciniti, D.; Hall, C. K.; Kula, M.-R. Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilib*, **1991**, 61, 243–262.
15. Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R. Liquid–liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib*, **2001**, 181, 95–112.

5. UTILIZAÇÃO DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR PEG 400 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + H_2O , PEG 600 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + H_2O e PEG1500 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + H_2O PARA PARTICIONAR A LECTINA ConBol OBTIDA A PARTIR DA *Canavalia boliviana* em pH 7 a 298 K.

5.1 RESUMO

Foram determinados os coeficientes de partição (K_p), a taxa de recuperação (Y) e a pureza (P_{HPLC}) para a proteína ConBol em sistemas formados por PEG 400 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + H_2O , PEG600 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + H_2O e PEG1500 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + H_2O em pH 7 e 298 K. Os melhores resultados foram obtidos para os sistemas formados por PEG 400, quando comparados aos sistemas formados por PEG 600 e 1500. Isso demonstra que a maior eficiência da partição de um biomaterial é alcançada em sistemas bifásicos formados por polímeros de menor massa molar.

Palavras chave: sistemas aquosos bifásicos, partição de proteínas, *Canavalia boliviana*

5.2 INTRODUÇÃO

Sistemas em que dois ou mais líquidos estão em equilíbrio tem larga aplicação na extração de compostos de interesse tecnológico.¹⁻⁴ Contudo, a metodologia clássica utiliza solventes orgânicos em sua composição, o que faz com a técnica seja ineficiente na extração de compostos biológicos, tais como as proteínas, uma vez que estas podem sofrer um processo de desnaturação, levando à perda de sua atividade biológica.^{5,6}

Neste contexto, os Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) surgem como uma técnica alternativa para extração de biomateriais, uma vez que elimina os problemas decorrentes do uso de solventes.

Os SABs têm sido estudados desde a década de 50 como promissores sistemas de extração líquido-líquido. Na literatura encontram-se tais sistemas sendo aplicados para a purificação de íons, proteínas, anticorpos e partes de DNA e RNA.⁷⁻¹² Estes sistemas são especialmente eficientes na purificação de biomateriais, pois são formados predominantemente por água, o que os torna biocompatíveis; possuem baixas tensões interfaciais, o que facilita o processo de migração do material entre as fases.^{13,14}

Os SABs são fundamentados na incompatibilidade entre soluções aquosas de dois polímeros diferentes, polímeros e sais ou ainda polímeros e líquidos iônicos. Quando dois polímeros são misturados ocorre a formação de agregados que levam à formação de duas fases diferentes. Um fenômeno similar ocorre quando são misturadas uma solução polimérica e uma solução salina de alta concentração.¹⁵⁻¹⁷

Ao se purificar uma proteína alguns parâmetros, tais como a massa molar do polímero, a concentração dos componentes, o pH do meio, a temperatura e o ponto isoelétrico, devem ser observados, uma vez que irão determinar a eficiência e seletividade da separação.^{18,19}

As lectinas são um dos grupos de proteínas que tem sido extraída e purificadas em larga escala utilizando a metodologia dos SABs. Essas proteínas pertencem a uma classe de glicoproteínas de origem não imunológica que se ligam, especifica e reversivelmente, a carboidratos. Podem ser isoladas a partir de vírus, bactérias, animais vertebrados e invertebrados, e plantas. Nas plantas são encontradas principalmente na casca e na

semente correspondendo a cerca de 10% do total de proteínas. Em função desta quantidade, as lectinas provindas de plantas são as mais largamente estudadas, principalmente as da família Leguminosae²⁰⁻²⁴

O interesse da comunidade científica nas lectinas é crescente visto sua ampla atividade biológica de interesse para biotecnologia. Dentre tais atividades já identificadas podemos citar: identificação de grupos sanguíneos, estímulo à mitogênese de células imunes, atividade antitumoral, antiviral, antiinflamatória e analgésica.^{25,26} A lectina obtida a partir da *Canavalia boliviana* (ConBol) apresentou atividade analgésica e ausência de toxicidade, quando ministrada em camundongos por 14 dias na concentração de 5mg/kg.²⁷

Neste trabalho foram avaliadas o coeficiente de partição (Kp) a taxa de recuperação (Y) e a pureza (P_{HPLC}), da proteína ConBol quando particionada em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 400 + KH_2PO_4/K_2HPO_4 + H_2O , PEG 600 + KH_2PO_4/K_2HPO_4 + H_2O e PEG 1500 + KH_2PO_4/K_2HPO_4 + H_2O em pH 7 e 298 K.

5.3 SESSÃO EXPERIMENTAL

5.3.1 Materiais

Os polímeros utilizados foram comprados da Sigma Aldrich®. Os fosfatos foram comprados da Amresco® possuindo grau de pureza de 99%. A proteína ConBol foi cedida pelo grupo de pesquisa do Biomol-Lab da Universidade Federal do Ceará. Durante todo o procedimento foi utilizada água ultra pura obtida a partir de um ultrapurificador da marca Gehaka®, com condutividade inferior a 0,06 $\mu S/cm$

5.3.2 Procedimento experimental

Para cada polímero foram preparados três sistemas e a composição de cada um foi escolhida a partir da literatura.^{21,28,29}

Os ensaios de partição foram feitos em tubos falcon de vidro graduados de 15 mL. Uma solução estoque de polímero e tampão fosfato pH 7 foi preparada e a partir dessa solução foi feita a pesagem das composições de cada sistema. Inicialmente pesa-se a solução salina, posteriormente a água, seguida da proteína e do polímero. Esse sistema é homogeneizado manualmente, centrifugado (LS-3 Plus CELM®) por 10 minutos a 2400 RPM e deixado em repouso em banho termostático (SL152 Solab®) por 24h a 298 K.

Após o período de estabilização as fases são separadas com o auxílio de seringas e cada fase é diluída em tampão fosfato na proporção 1:10. Vale ressaltar que para cada sistema foi feito um sistema “branco”, que não continha o extrato proteico.

5.3.4 Testes de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC

O equipamento utilizado foi o Agilent® modelo G1311C-1260 de bomba quaternária, acoplado a detector UV-vis. A coluna utilizada foi uma TSK gel Super SW3000, da marca Tosho®. O fluxo aplicado na análise foi de 0,35mL/min e a leitura feita a 215 nm.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo de se particionar um extrato proteico em um sistema bifásico é purificar a proteína, fazendo com que esta migre para a fase superior (fase polimérica), e as impurezas permaneçam na fase salina.

Inúmeras propriedades físico-químicas dos sistemas aquosos bifásicos e do biomaterial determinam o valor de K_p . Alguns exemplos dos fatores associados à biomolécula são o tamanho molecular, a conformação estrutural (estruturas secundária, terciária e quaternária), e a presença, ou não, de cargas elétricas. Quanto aos fatores relacionados ao sistema pode-se citar a massa molar do polímero envolvido, a concentração dos componentes, a viscosidade do meio, a presença de ligantes ao longo

da cadeia polimérica, que podem interagir com a biomolécula, o pH e o tipo de sal envolvido na formação do SAB.

Para avaliar a efetividade da partição da ConBol foram calculados alguns parâmetros :

- O coeficiente de partição (K_p) , definido como a razão entre a concentração da proteína na fase superior e a concentração na fase inferior
- O rendimento em função da taxa de recuperação (Y) , definido como a razão entre a massa de proteína na fase superior e a massa total adicionada ao sistema. Expresso em porcentagem.
- Pureza (P_{HPLC}), definida como a razão entre a área do pico da proteína e a área total do cromatograma.

Os parâmetros são calculados a partir das áreas dos cromatogramas em função de uma curva de calibração (Figura 16 e 17) que correlaciona essas áreas à concentração da proteína.

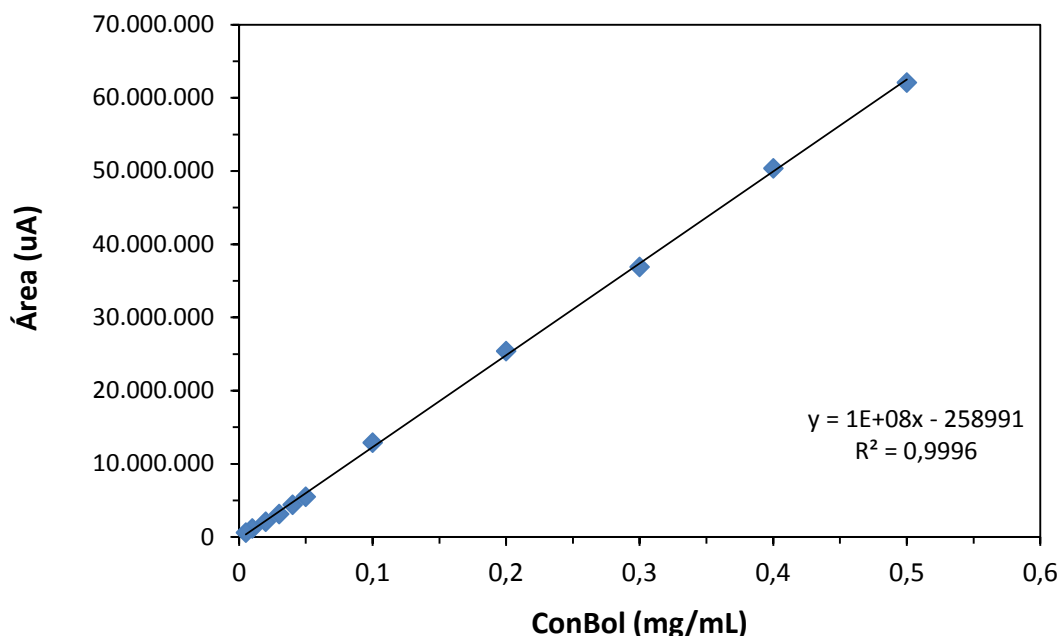


Figura 16: Curva de calibração da proteína ConBol de área do cromatograma (uA) versus concentração da proteína (mg/mL) a 298 K e pH 7 em tampão fosfato KH_2PO_4/K_2HPO_4 .

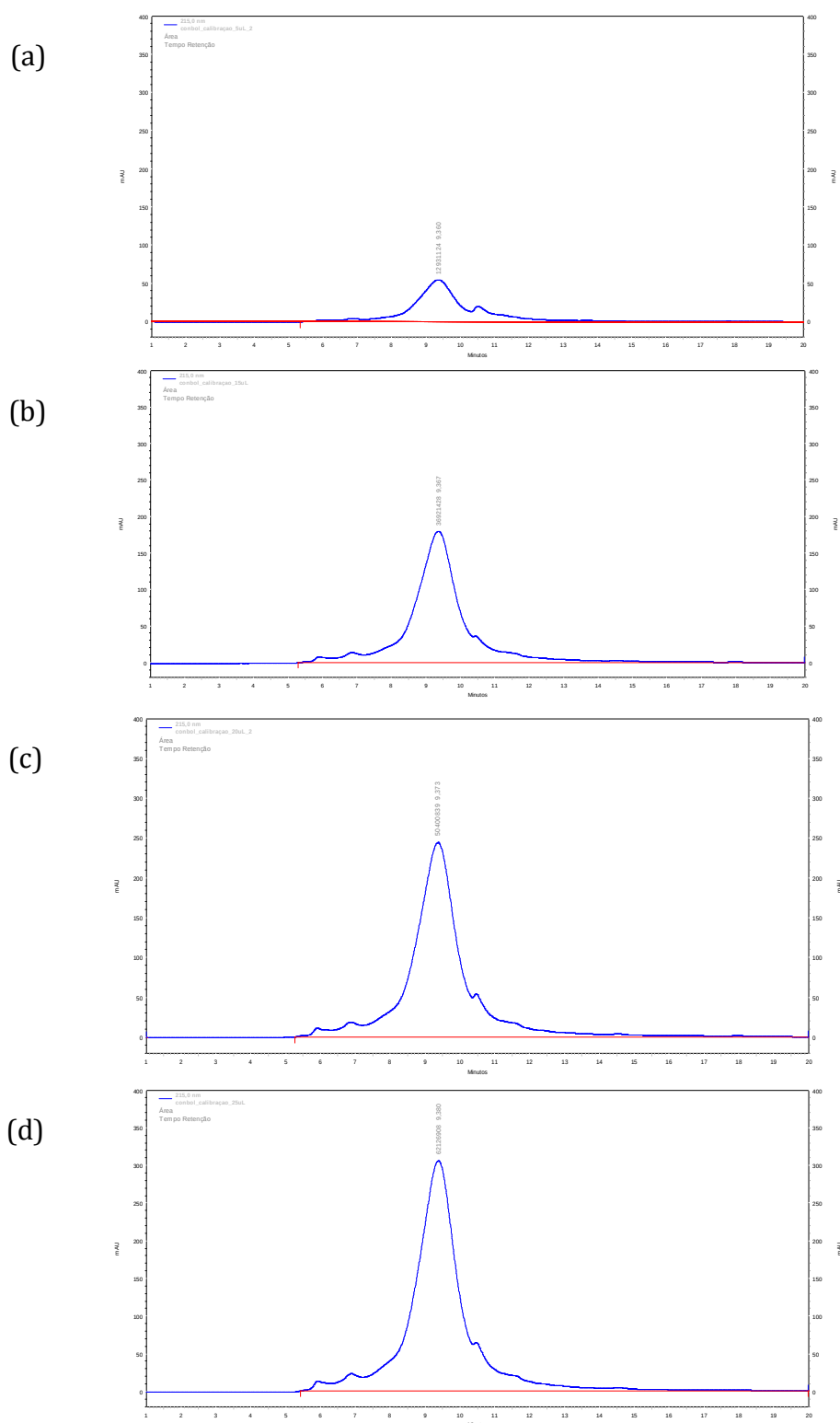


Figura 17: Cromatogramas da curva de calibração da proteína ConBol. (a) injeção de 5 uL, (b) 15 uL, (c) 20uL e (d) 25uL

*As figuras encontram-se ampliadas no anexo 1.

Os resultados obtidos para cada polímero seguem (Figuras 18, 19 e 20):

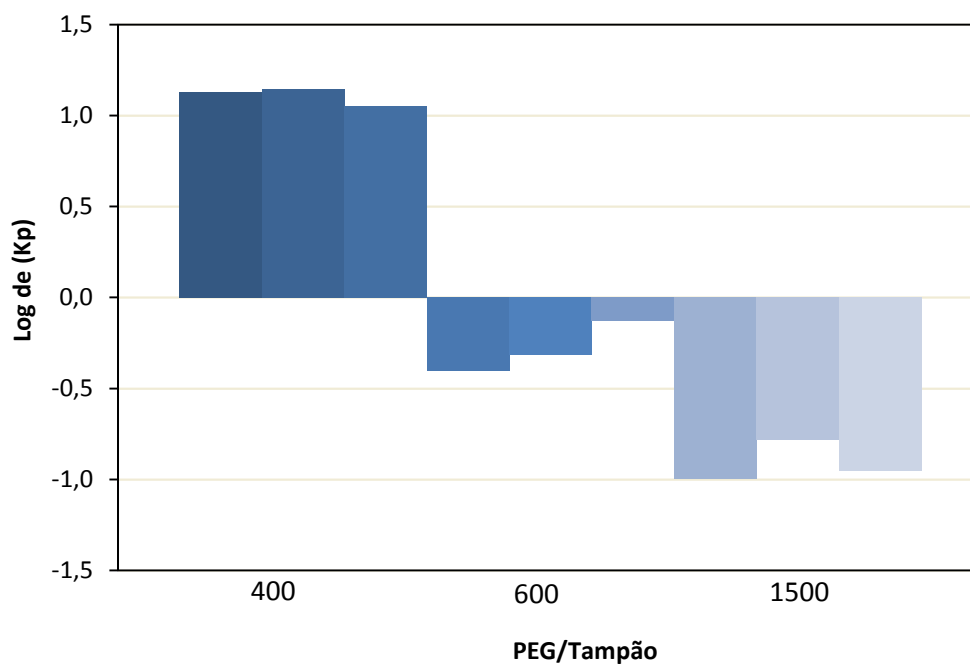


Figura 18: Efeito na massa molar do polímero no coeficiente de partição (Kp)

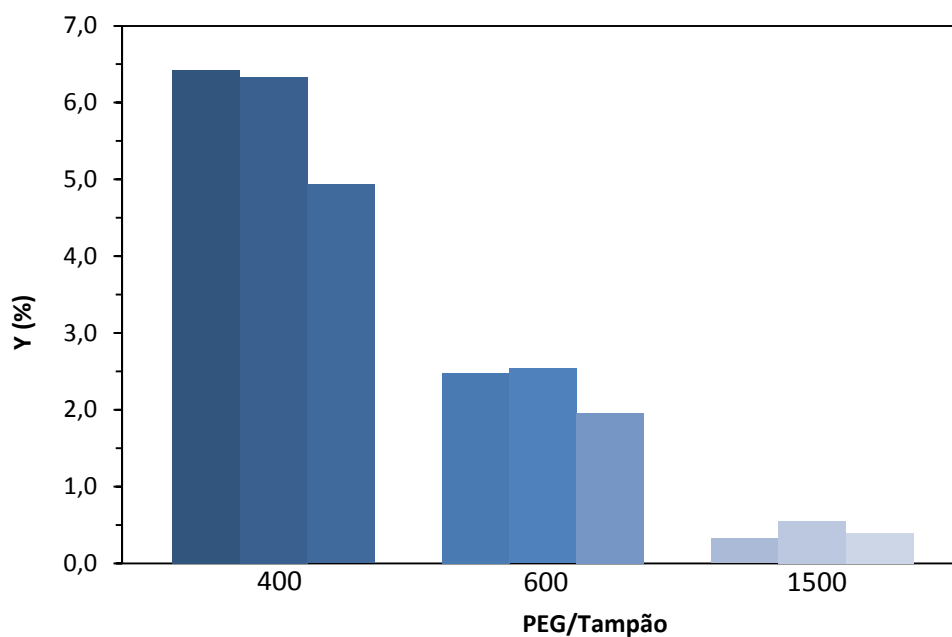


Figura 19: Efeito na massa molar do polímero no rendimento (Y%)

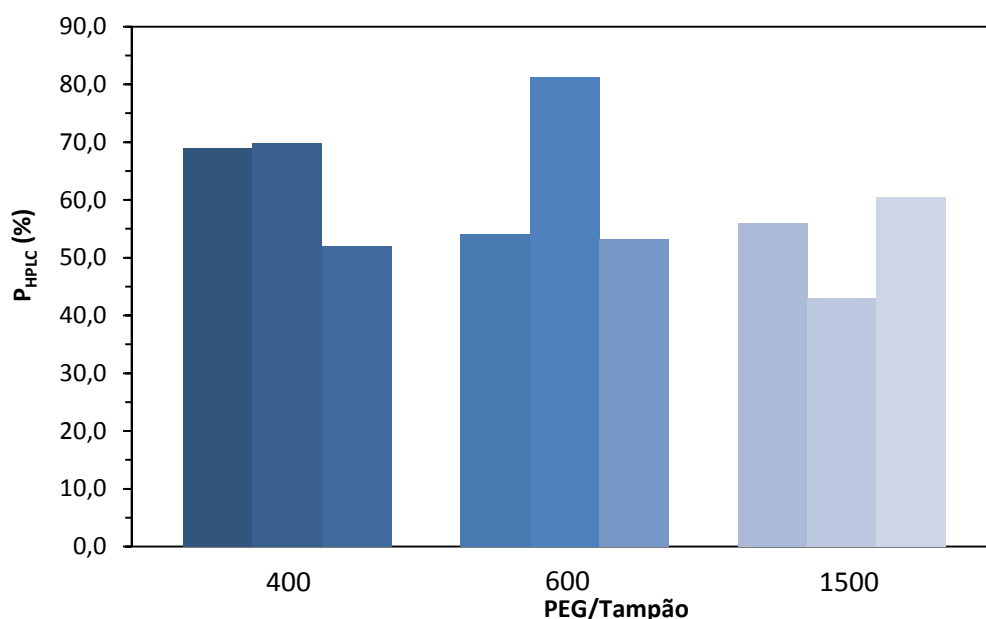


Figura 20: Efeito na massa molar do polímero na pureza (P_{HPLC}) da proteína ConBol

*Para cada polímero são analisadas três composições diferentes de cada sistema.

A partir da análise dos resultados (Figuras 16,17 e 18) conclui-se que o melhor sistema para a partição da proteína é o formado por PEG 400 + $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + H_2O , uma vez que este apresentou o melhor rendimento e os maiores valores de K_p .

Este resultado corrobora estudos da literatura nos quais também é observado que o coeficiente de partição decresce com o aumento da massa molar do polímero. Esse comportamento é decorrente de dois fenômenos. O primeiro devido ao aumento da hidrofobicidade do polímero, o que faz com que a proteína tenha menos afinidade com a fase superior, e o segundo advém do aumento da cadeia polimérica, que diminui o volume de exclusão, o que significa menos espaço disponível para a acomodação da proteína na fase polimérica.^{30,31,32}

Deve-se ressaltar, contudo, que estes valores são baixos, haja vista que a literatura reporta valores de recuperação superiores a 80%. A principal causa da ineficiência do processo foi a precipitação da proteína na interface do sistema.

A precipitação da proteína na interface, como descrito anteriormente, ocorre quando os efeitos da força iônica e do volume de exclusão possuem a mesma intensidade.

A partir dos resultados e dos problemas encontrados, avalia-se que os estudos futuros, que visam à otimização do sistema, devem se concentrar na determinação do ponto isoelétrico da ConBol, em formas de aumentar a força iônica da fase salina, bem como na avaliação do comportamento estrutural da proteína em função do pH.

5.5 CONCLUSÃO

Foram determinados o coeficiente de partição (K_p), a taxa de recuperação (Y) e a pureza (P_{HPLC}) da proteína ConBol em sistemas formados por PEG 400 + KH_2PO_4/K_2HPO_4 + H_2O e PEG 600 + KH_2PO_4/K_2HPO_4 + H_2O .

Diante dos resultados observa-se que o melhor sistema para particionar a proteína ConBol é o formado por PEG 400 + KH_2PO_4/K_2HPO_4 + H_2O , nas concentrações de 16%, 18,8% e 65,2% respectivamente. Este sistema apresentou um coeficiente de partição (K_p) no valor de 13,40, uma taxa de rendimento (Y) de 6,42% e uma taxa de pureza no valor de 69%.

Entretanto, conforme os problemas observados durante os experimentos, faz-se necessário novos estudos com o objetivo de minimizar as falhas e otimizar o processo de partição da ConBol.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

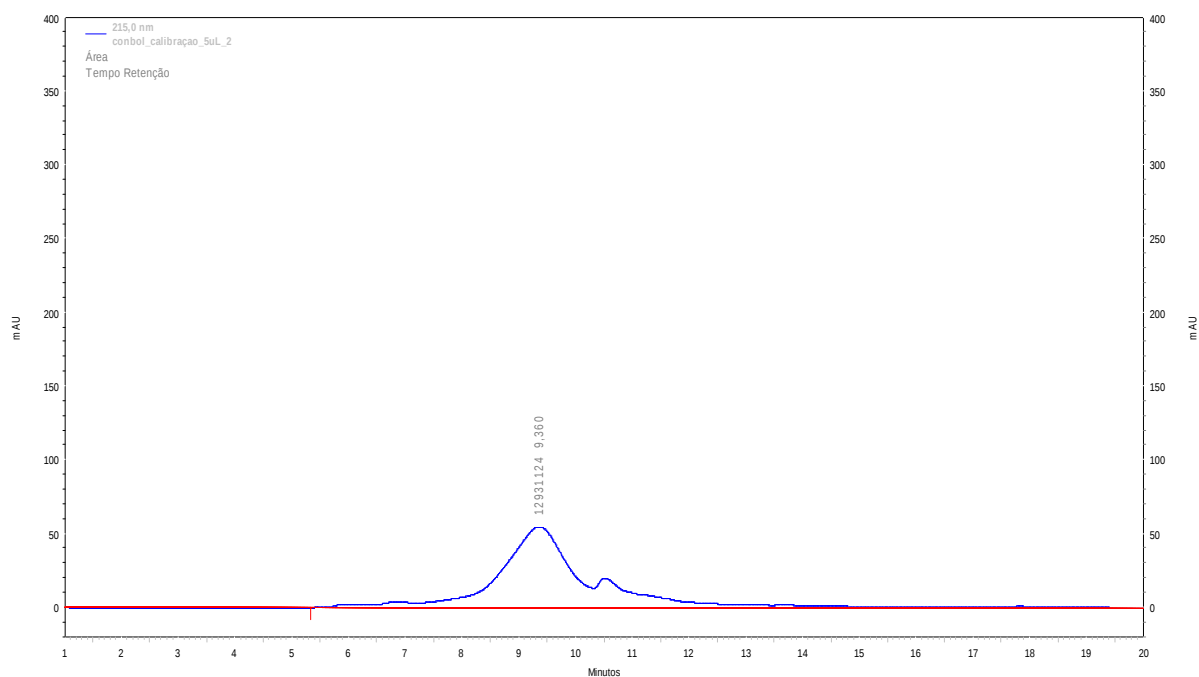
1. Sui, N.;Huang, K.; Liu, H.. Partitioning of rare earths in polymer-based three-liquid-phase system driven by transfer of hydrated PEGs: Understanding change of phase volume ratios. *Colloids Surf. A.*, **2016**, 490, 155–162.
2. Shu, Y.; Gao,M.; Wang, M.; Song, R.;Lu, J.; Chen, X.. Separation of curcuminoids using ionic liquid based aqueous two-phase system coupled with *in situ* dispersive liquid-liquid micro extraction. *Talanta*, **2016**, 149, 6-12.
3. Zheng, Y.; Tong, Y.; Wang,S.; Zhang,H.; Yang, Y. Mechanism of gold (III) extraction using a novel ionic liquid-based aqueous two phase system without additional extractants. *Separ Sci Technol*, **2015**, 154, 123-127.
4. Souza, R. L.; Lima, R. A.; Coutinho, J. A. P.; Soares,C. M. F.; Lima, A. S. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. *Separ Sci Technol*, **2015**, 155, 118-126.
5. Silva L. H. M.; Loh, W. Aqueous two-phase systems: fundamentals and applications for partitioning/purification of proteins. *Quím. Nova*, **2006**, 29 ,6, 1345-1351.
6. Da Silva, M.D.C.H.; Da Silva, L.H.M.; Paggioli, F.J.; Coimbra, J.S.R.; Minim, L.A. Sistema aquoso bifásico: Uma alternativa eficiente para extração de íons. *Quím Nova*, **2006**, 29, 6, 1332-1339.
7. Villegas, P. V.; Aguilar, O.; Palomares, M. R. Study of biomolecules partition coefficients on a novel continuous separator using polymer-salt aqueous two-phase systems. *Separ Sci Technol*, **2011**, 789, 1, 69-75.
8. Gomes, G. A.; Azevedo, A. M.; Aires-Barros, M. R.; Prazeres, M. F. Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate *Separ Sci Technol*, **2009**, 65, 22-3.

9. Trindade, I. P.; Diogo, M. M.; Prazeres, D. M.; & Marcos, J. C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A*, **2012**, 1082, 2, 176- 184.
10. Mohamed Ali, S.; Ling, T. C.; Muniandy, S.; Tan, Y. S., Raman, J.; & Sabaratnam, V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. *Sep Purif Technol*, **2014**, 122, 359-366.
11. Azevedo, A. M.; Gomes, A. G.; Rosa, P. A., Ferreira, I. F.; Pisco, A. M.; & Aires-Barros, M. R. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems *Sep Purif Technol*, 2009, 65, 1, 14-21.
12. Matos, T.; Johansson, H. O.; Queiroz, J. A.; & Bulow, L. Isolation of PCR DNA fragments using aqueous two-phase systems. *Sep Purif Technol*, **2014**, 122, 144-148.
13. Jacinto, M.J.; Soares, R.R.G.; Azevedo, A.M.; Chu, V.; Tover, A.; Conde, J.P.; . Aires-Barros, M.R.. *Sep Purif Technol*, **2015**, 154, 27-35.
14. Asenjo, J. A.; Andrews, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *J Chromatogr A*, **2012**, 1238, 1-10.
15. Albertsson, P. A. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: New York, 1986.
- 16 HATTI-KAUL, R. *Aqueous two-phase Systems: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, 2000.
- 17 . 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). *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 10069–10073.

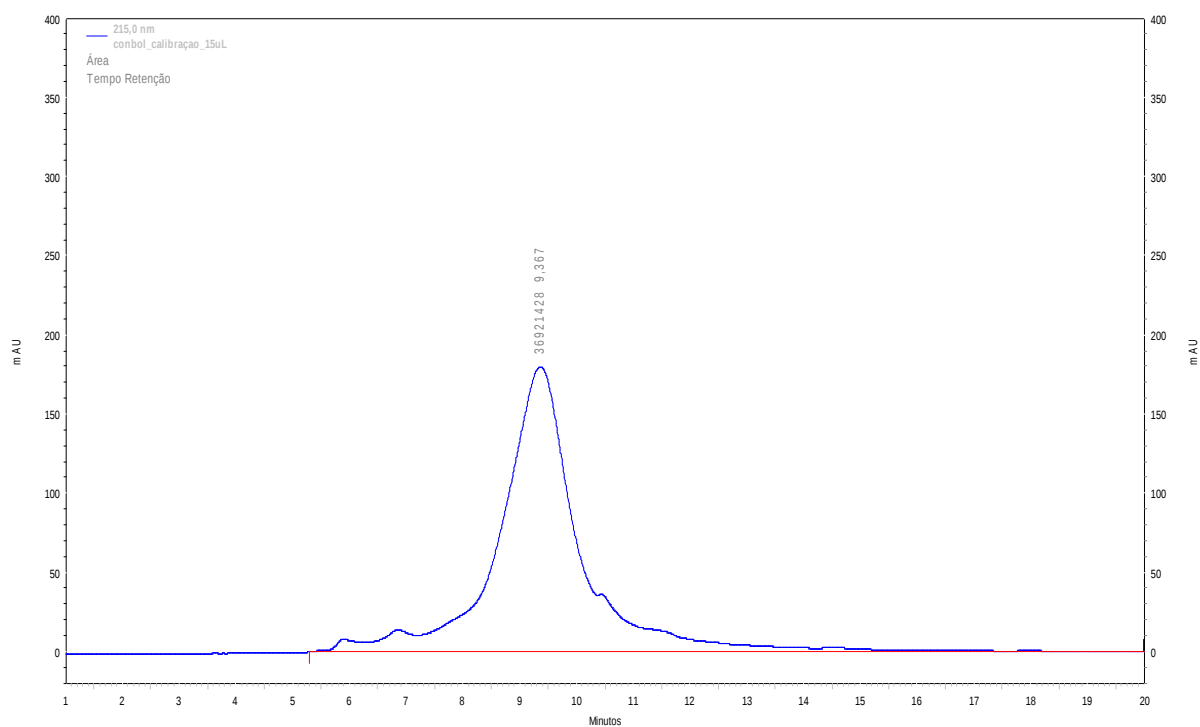
18. Ruiz-Ruiz, F.; Benavides, J.; Aguilar, O.; & Rito-Palomares, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. *J Chromatogr A*, **2012**, 1244, 1-13.
19. Zaslavsky, B. Y. *Aqueous Two-Phase Partitioning, Physical Chemistry and Bio-analytical Applications*; Marcel Dekker: New York, 1995.
20. Nascimento, C. O.; Costa, R. M.; Araújo, R.; Chaves, M. E.; Coelho, L. C.; Paiva, P. M.; Carneiro-da-Cunha, M. G. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* bark using AOT in isooctane reversed micelles. *Process Biochem*, **2008**, 43, 7, 779-782.
21. Nascimento, K. S., Rosa, P. A. J., , Cavada, B. S., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology. *Sep Purif Technol*, **2010**, 75, 1, 48-54.
22. Nascimento, C. O.; Soares, P. A. G.; Porto, T. S.; Costa, R.M.P.B.; Lima. C. A.; Filho, J. L.L.; Coelho, L. C. B.B.; Correia, M. T. S.; Cunha, M. G. C.; Porto, A. L. F. Aqueous two-phase system: New strategies for separation and purification of lectin from Crude extract of *Cratylia mollis* seeds. *Sep Purif Technol*, **2013**, 116, 154-161.
23. Porto, C. S.; Porto, T. S.; Nascimento, K. S.; Teixeira, E. H.; Cavada, B. S.; Lima-Filho, J. L.; & Porto, A. L. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. *Biochem Eng J*, **2011**, 53, 2, 165-171.
24. Sell, A. M.; Costa, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. *Acta Scientiarum*, **2000**, 22, 2, 297-303.
25. Legnani, W. Mistletoe in conventional oncological practice: exemplary cases. *Integrative cancer therapies*, **2008**, 7, 3 , 162-171.
26. Tullis, R. H.; Duffin, R. P.; Handley, H. H.; Sodhi, P; Menin, J.; Joyce, J. A.; Kher, V. Reduction of Hepatitis C Virus Using Lectin Affinity Plasmapheresis in Dialysis Patients. *Blood Purif*, **2009**, 27, 64-69.

27. Figueiredo, J.G.; da Silveira Bitencourt, F.; Beserra, I.G.; Teixeira, C. S.; Luz, P. B.; Bezerra, E. H.; Mota, M. R.; Assreuy, A. M.; de Queiroz Cunha, F.; Cavada, B. S.; de Alenca, N.M.. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. *N-S Arch Pharmacol*, **2009**, 380, 5, 407-414.
28. Padilha,G.; Ferreira, J. F.; Alegre, R. M.;Tambourgi, E. B.. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. *Acta Scientiarum. Technol*, **2011**, 33, 1, 1-4.
29. Souza, E. C.; Coimbra, J. S. R.; Oliveira, E. B.; Bonono, R. C. F.. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. . *J Chromatogr B*, **2014**, 973, 84-88.
30. Marcos, J.C.; Fonseca, L.P.; Ramalho, M.T.; Cabral, J.M.S.. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)–sodium citrate aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **1999**, 734, 1, 15-22.
31. Miranda. M. V.; Cascone, O.. Partition behaviour of horseradish peroxidase isoenzymes in aqueous two-phase poly(ethyleneglycol)/phosphate systems. *Biotechnol Tech*, **1994**, 8, 4, 275-280.
32. Ivanova,V.; Yankov, D.; Kabaivanova, L.; Pashkoulov, D. Simultaneous biosynthesis and purification of two extracellular *Bacillus* hydrolases in aqueous two-phase systems. *Microbiol Res*, **2001**, 156,1 ,19-30.

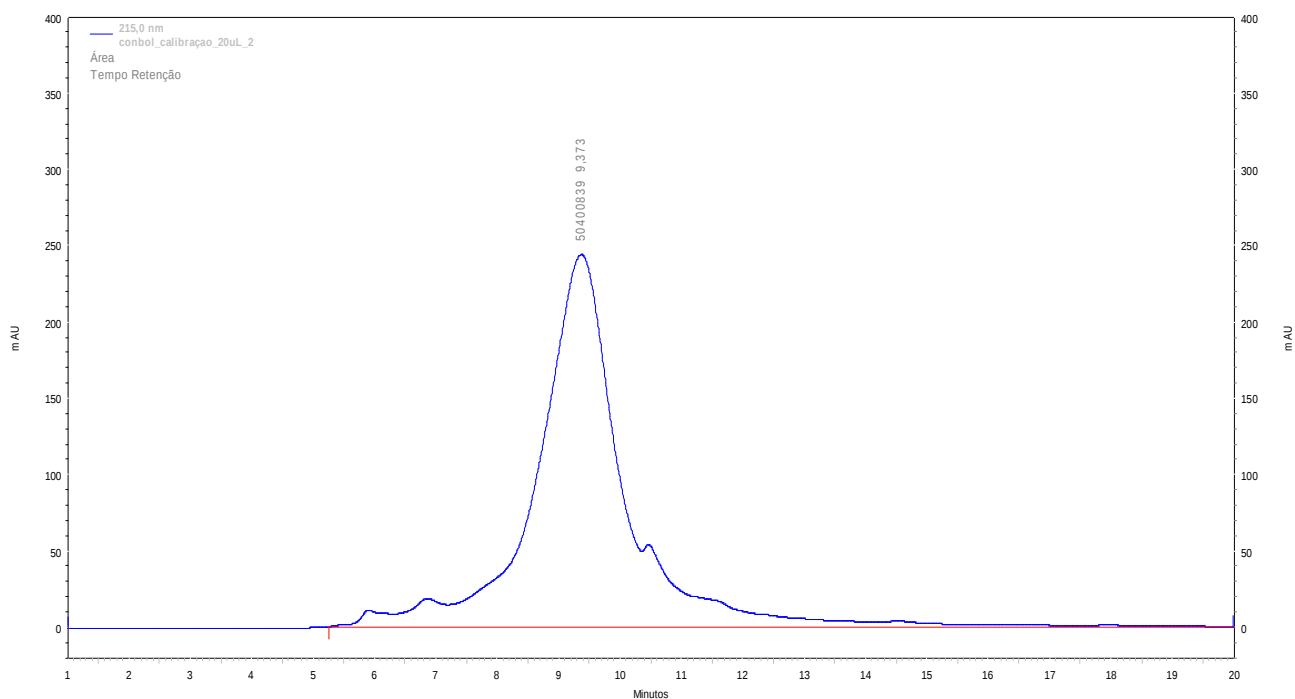
Anexo 1



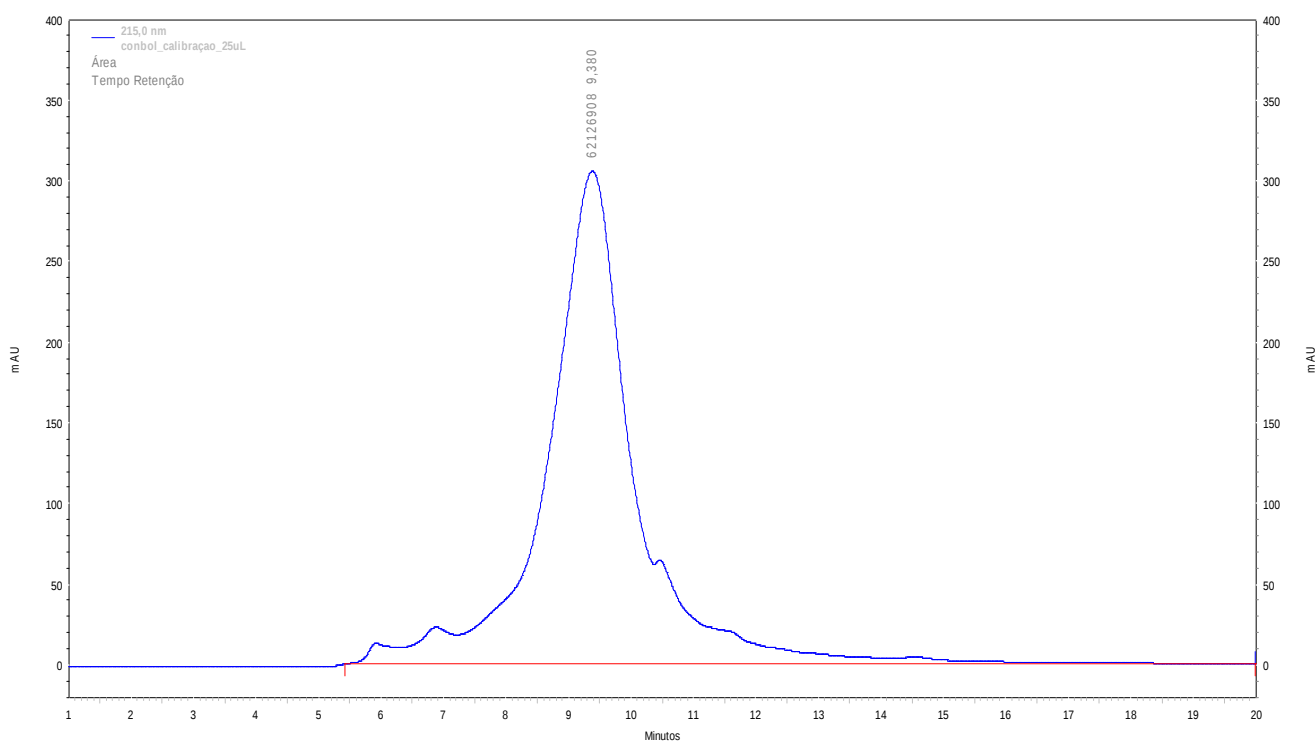
Cromatograma da injeção de 5 uL da solução da proteína ConBol utilizada na construção da curva de calibração



Cromatograma da injeção de 15 uL da solução da proteína ConBol utilizada na construção da curva de calibração



Cromatograma da injeção de 20 uL da solução da proteína ConBol utilizada na construção da curva de calibração



Cromatograma da injeção de 25 uL da solução da proteína ConBol utilizada na construção da curva de calibração