

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

**Estudo do equilíbrio líquido – líquido em sistemas aquosos
bifásicos formados por polietilenoglicol (1500, 3350 e
6000), sais de fosfato e água em diferentes temperaturas**

Angélica Siqueira da Silva

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2014**

Angélica Siqueira da Silva

Estudo do equilíbrio líquido – líquido em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (1500, 3350 e 6000), sais de fosfato e água em diferentes temperaturas

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, na área de Físico - Química.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Fuzer Mesquita

VITÓRIA

2014

Estudo do equilíbrio líquido – líquido em sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (1500, 3350 e 6000), sais de fosfato e água em diferentes temperaturas

Angélica Siqueira da Silva

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 12/12/2014 por:

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

Prof^a. Dra. Arilza de Oliveira Porto
Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Kelany Santiago do Nascimento
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Pedro Takahashi
Universidade Federal do Espírito Santo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Dezembro de 2014

Aos meus pais, Miquéias e Hilda, que muito contribuíram para o meu sucesso, ao meu filho, Sidrack, que mesmo tão jovem, me apoiou nessa lida. E ao meu grande amor, Marcio, o incentivador dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Deus, que me concedeu essa oportunidade, que me manteve forte, e que me mostrou o verdadeiro sentido de ser Mestre. Obrigada meu Pai Celeste, por ouvir minhas orações.

Aos meus pais, que em suas orações, jamais se esqueceram de mim, pelo amor incondicional, pela confiança, pelo apoio e principalmente, paciência. Amo vocês.

Aos meus irmãos, Marcelo, Denise e Patrícia Célia, por compartilhar dessa alegria comigo. Amo muito cada um.

Ao meu filho que, mesmo na minha ausência, orava por mim, e torcia pela minha vitória, por sentir orgulho de ver a mamãe no laboratório. Você é minha maior riqueza e a maior conquista.

Ao meu esposo, Marcio, que me apoiou nos momentos mais difíceis, suportando meus desabafos e lamúrias. Quantas vezes você ficou sem a deliciosa jantinha? Mas manteve-se ao meu lado nessa caminhada e se tornou, acima de tudo, um grande companheiro e amigo. Meu amor é teu, meu gato.

À minha grande amiga e irmã Edna, que se faz presente em todos os momentos da minha vida, em todos mesmo, que apesar de me chamar de “anjinho preto”, tem sido o verdadeiro anjo na minha vida. Com você aprendi o sentido de ‘amiga’.

Ao meu orientador, Anderson, que acreditou no meu potencial, me deu forças, palavras de incentivo, e conselhos que foram cruciais para minhas decisões. E que não me mostrou impossibilidades, mas a possibilidade de aprender, mesmo diante das adversidades. Definitivamente foi Deus quem te colocou em meu caminho. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você representou para mim.

À Kelany, pelos inúmeros conselhos e ensinamentos. Suas respostas às minhas dúvidas, fizeram muita diferença.

Aos Diego Nunes e Pedro Henrique, com vocês aprendi muito, muito mesmo. Disponibilizar o mês de janeiro para me ensinar? Só vocês! Especialmente Diego que esteve presente até o fim dessa jornada.

À Roberta Rossi, que sempre compartilhou de momentos difíceis e também alegres. Que mostrou uma amizade sincera e sempre disposta a ajudar. Ainda vamos comemorar muito essa passagem, Robertita.

Aos colegas do LQA, Amanda e André, Leandro, aluno de IC, obrigada pelos momentos de desabaços, choros, risos e cooperação mútua.

Aos demais colegas que se fizeram presentes nessa longa e árdua caminhada, Roberta Cissa, Carliani, vocês fazem diferença no laboratório.

Ao órgão de fomento, Capes, pelo apoio financeiro

Não posso deixar de agradecer ao governo do Estado por me proporcionar a oportunidade de estudar com dedicação exclusiva, através da licença.

À professora Dr^a Arilza de Oliveira Porto (UFMG), ao professor Dr. Pedro Takahashi (UFES) e a Dr^a Kelany Santiago do Nascimento que, como membros da banca, contribuíram com importantes e enriquecedoras sugestões.

A todos, mesmo que de forma indireta, de alguma forma contribuíram para que mais um sonho se tornasse realidade.

Deus abençoe ricamente cada um de vocês.

“A mais bela recompensa para quem persistiu a vida toda tentando entender um pouco da verdade é que os outros realmente compreendam seu trabalho e fiquem satisfeitos com ele.”

Carta de Einstein a um estudante.

“O sofrimento aperfeiçoa o caráter e amadurece a fé.”

Pr. Walter S’antana Júnior.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de componentes formadores de SABs.....	15
Tabela 2 - Exemplo de grupos de SABs e seus constituintes.....	25
Tabela 3 - Dados de equilíbrio para o sistema PEG 1500(w_2) + sal(w_1) + água a 10 ,25 e 40°C.....	33
Tabela 4 - Dados de equilíbrio para o sistema PEG 3350(w_2) + sal(w_1) + água a 10, 25 e 40°C.....	33
Tabela 5 - Dados de equilíbrio para o sistema PEG 6000(w_2) + sal(w_1) + água(w_A) a 10 ,25 e 40°C.....	34
Tabela 6 - Concentração da água (% m/m) presentes nas fases superiores e inferiores.....	35
Tabela 7 - Influência da temperatura sobre a inclinação da linha de amarração.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama ternário para sistemas aquosos bifásicos obtido à pressão e temperatura constantes.....	16
Figura 2 - Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares.....	17
Figura 3 - Diagrama de fase comparando uma propriedade extensiva, volume, em uma mesma linha de amarração.....	18
Figura 4 - Diagrama de fase de sistema Dex-PVP-água em diferentes temperaturas.....	20
Figura 5 - Diagrama de fases para sistemas aquosos bifásicos formados por a) PEG-(NH ₄) ₂ SO ₄ -água e b) PEG-dextrana 70-água, com PEGs de diferentes massas molares	21
Figura 6 - Composições químicas associadas a um ponto de mistura de um sistema.....	22
Figura 7 - Representação plana parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.....	24
Figura 8 - Capacidade de retenção de água das moléculas de PEG (1500, 3350 e 6000) nas temperaturas de 10, 25 e 40°C.....	36
Figura 9 - Diagrama de fase do sistemas PEG 1500 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (▲) 40°C e (●) 25°C.....	38
Figura 10 - Diagrama de fase do sistemas PEG 1500 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (■) 10°C e (●) 25°C.....	39
Figura 11 - Diagrama de fase dos sistemas PEG 1500 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (■) 10°C e (▲) 40°C.....	39
Figura 12 - Diagrama de fase do sistemas PEG 3350 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (▲) 40°C e (●) 25°C.....	40
Figura 13 - Diagrama de fase do sistemas PEG 3350 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (■) 10°C e (●) 25°C.....	40
Figura 14 - Diagrama de fase dos sistemas PEG 3350 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (■) 10°C e (▲) 40°C.....	41
Figura 15 - Diagrama de fase do sistemas PEG 6000 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (▲) 40°C e (●) 25°C.....	41

Figura 16 - Diagrama de fase do sistemas PEG 6000 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (■) 10°C e (●) 25°C.....	42
Figura 17 - Diagrama de fase dos sistemas PEG 6000 + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à (■) 10°C e (▲) 40°C.....	42
Figura 18 - Efeito da massa molar nos diagramas de fases para os sistemas de PEG 1500 (■), 3350 (Δ) e 6000 (●) + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à 25°C.....	43
Figura 19 - Efeito da massa molar nos diagramas de fases para os sistemas de PEG 1500 (■), 3350 (Δ) e 6000 (●) + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à 10°C.....	44
Figura 20 - Efeito da massa molar nos diagramas de fases para os sistemas de PEG 1500 (■), 3350 (Δ) e 6000 (●) + NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ + água à 40°C.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ConBr : *Canavalia Brasiliensis*

CLA : Comprimento da linha de amarração

Dex : Dextrana

ELL : Extração líquido-líquido

ILA : Inclinação da linha de amarração

PEO : Poli(etileno óxido)

PEG : Poli(etileno glicol)

PPO : Poli(propileno óxido)

PVA : Poliacetato de vinila

PVP : Polivinilpirrolidona

SAB : Sistemas aquoso bifásico

TLL : *tie line lenght*

TSP : *thermoseparating polymer*

STL : *slope of the tie line*

LISTA DE SÍMBOLOS

C_p^S : Concentração do polímero na fase superior em % m/m

C_p^I : Concentração do polímero na fase inferior em % m/m

C_s^S : Concentração do sal na fase superior em % m/m

C_s^I : Concentração do sal na fase inferior em % m/m

ΔC_p : Variação da concentração do polímero entre as fases

ΔC_s : Variação da concentração do sal entre as fases

pH : Potencial hidrogeniônico

ΔG_{mix} : Variação da energia livre de Gibbs na mistura

ΔH_{mix} : Variação da entalpia na mistura

ΔS_{mix} : Variação da entropia na mistura

[PEO] : Concentração do polímero em % m/m

[H₂O] : Concentração de água em % m/m

[Sal] : Concentração do sal em % m/m

n_D = índice de refração da fase

$n_{\text{água}}$ = índice de refração da água

n_{sal} = índice de refração do sal

RESUMO

No presente trabalho, foram estudados os dados de equilíbrio de fases dos sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (1500, 3350 e 6000) + fosfato monobásico e dibásico de sódio (pH 7) + água. Estudou-se o efeito da variação da temperatura (10, 25 e 40°C) bem como da massa molar sobre os dados de equilíbrio. Para o PEG 3350 observou-se um aumento da área bifásica com diminuição da temperatura, mostrando que a formação do sistema aquoso bifásico é exotérmico. Para o PEG 1500 e 6000 houve aumento da área bifásica à 10 e 40°C se comparado à temperatura de 25°C. Em todas as temperaturas em estudo, o aumento da massa molar contribuiu para o aumento da área bifásica. Fato este que foi explicado pelo aumento do caráter hidrofóbico com o aumento da massa do polietilenoglicol.

Palavras-chaves: Sistemas aquosos bifásicos, diagrama de fase, polietilenoglicol.

ABSTRACT

In this work, data from phase equilibrium of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol (1500,3350 and 6000) + phosphate monobasic and dibasic (pH 7) + water were studied . It was studied the effect of varying the temperature (10, 25 and 40 ° C) and molecular weight the equilibrium data . For PEG 3350 was observed an increase of the biphasic area with decreasing temperature, showing that the formation of the aqueous two-phase systems is exothermic. To the polyethyleneglycol 1500 and 6000 was biphasic increase in area 10 and 40 °C compared to 25 °C. At all temperatures studied, the increase in molar mass contributed to the increase of the biphasic area. This fact explained by the increased hydrophobic character with increasing polyethylene glycol weight.

Keywords: Aqueous two-phase systems, phase diagram, polyethylene glycol.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. A História dos sistemas aquosos bifásicos.....	13
1.2. Descoberta de novos sistemas aquosos bifásicos.....	14
1.3. Fatores que influenciam na formação dos sistemas aquosos bifásicos.....	16
1.4. A aplicação dos SABs e sua aplicação.....	22
1.5. Componentes presentes nos SABs.....	24
1.5.1. Polietilenoglicol.....	24
1.5.2. Sais.....	25
1.6. SABs: uma alternativa ambientalmente amigável.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.1. Materiais utilizados.....	28
3.2. Metodologia.....	28
3.2.1. Obtenção dos diagramas de fase.....	28
3.2.2. Titulação turbidimétrica.....	28
3.2.3. Preparo dos SABs.....	29
3.2.4. Análise das fases dos SABs.....	29
I – Quantificação do sal.....	30
II – Quantificação dos PEGs.....	30
III – Quantificação da água.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Influência da temperatura.....	37
4.2. Influência da massa molar.....	43
5. CONCLUSÃO.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
7. ANEXOS.....	55

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) estão inseridos na categoria de equilíbrio líquido-líquido, assim como os sistemas orgânicos bifásicos (SOBs). A obtenção dos SABs ocorre quando misturam-se soluções aquosas de dois polímeros quimicamente diferentes, tais como, dextrana e polietilenoglicol, de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de sódio, e ainda, de um líquido iônico e um sal, [B_{mim}]BF₄/fosfato de potássio.^{1,2,3} Quando essa mistura estiver em alguns estados termodinâmicos específicos, observa-se a formação espontânea de um sistema aquoso bifásico em que cada uma das fases está enriquecida com um dos componentes.³ Esses sistemas têm sido eficientemente aplicados na extração e /ou purificação de diversos compostos de grande utilidade na biotecnologia.⁴

Para a partição de biopartículas, os SABs tornam-se favoráveis, pois, em sua maioria, as fases são formadas majoritariamente por água, o que fornece um ambiente ameno para esse tipo de material, evitando assim, mudanças em sua estrutura e a perda de atividade biológica.^{5,6,7} Razão pela qual eles têm se tornado uma poderosa técnica de extração e análise de material biológico, a saber, células, membranas, proteínas, organelas celulares, vírus e outras biomoléculas.^{8,9}

Estudos relacionados à aplicação dos SABs são recentes, porém, eles foram descobertos há mais cem anos.

1.1 A história dos sistemas aquosos bifásicos

De acordo com o microbiologista, Beijerinck, apud Walter et al. (1985)¹⁰, soluções aquosas de gelatina e ágar (ou amido) eram capazes de formar sistemas líquido bifásicos. Sendo a fase inferior constituída por ágar (ou amido) e a superior por gelatina.

Ostwald e Hertel, apud Loh e Silva (2006)¹¹, em 1936, verificaram que amidos de diferentes fontes (arroz, milho), com diferentes frações de amilose e amilopectina, eram capazes de produzir diferentes diagramas de fases.

No final da década de 40, Dobry e Boyer, apud Walter et al. (1985)¹⁰, objetivando verificar a generalidade do fenômeno de separação de fase em sistemas contendo macromoléculas, estudaram a miscibilidade de um grande número de

pares de polímeros dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Eles puderam constatar que dos 35 pares estudados, apenas quatro não formavam duas fases, concluindo que a incompatibilidade entre as macromoléculas era um fenômeno geral.

Apesar de estudos e trabalhos realizados a respeito desses sistemas, foi apenas no final da década de 50 que Albertsson mostrou à comunidade científica o grande potencial desses sistemas aplicados à partição/purificação de materiais biológicos.¹² Após vários experimentos frustrados, Albertsson misturou um sedimento de hidroxiapatita, contendo partículas de cloroplasto fortemente adsorvida, em um tampão de fosfato de potássio 1mol/L, com solução aquosa de PEG, que foi mantida em repouso por um período de tempo. Ele pôde observar uma intensa coloração verde do cloroplasto, que antes era fortemente associado à hidroxiapatita, na parte líquida acima do tampão, e a hidroxiapatita tornou-se branca e completamente isenta de cloroplasto. Esse foi o primeiro experimento em que os SABs foi usado para a partição de partículas celulares.¹⁰

Os SABs também têm se mostrado eficiente na aplicação de extração de outros tipos de analitos, tais como compostos inorgânicos e orgânicos^{13,14}, e a partir da metade dos anos 80, na extração de íons.¹⁵ A pesquisa na área dos SABs segue 3 tendências (i) descoberta de novos SABs; (ii) descoberta de forças que regem a formação desses sistemas e (iii) aplicação dos SABs.

1.2 Descoberta de novos sistemas aquosos bifásicos

A primeira tendência de pesquisa em SABs busca novos componentes para formação desses sistemas. A solução aquosa formada de PEG e dextrana é o sistema de polímero mais estudado além de ser o mais utilizado em escala industrial.¹⁶

A Tabela 1 mostra alguns exemplos de sistemas formados por polímero + polímero e polímero + sal.¹⁷ Essa busca por novos componentes formadores de SABs tem feito surgir diversos trabalhos que visam conseguir polímeros de baixo custo para a substituição da dextrana, de modo que os gastos, sejam reduzidos, e a eficiência no processo de purificação seja aumentada.^{18,19}

Os sistemas PEG/sais apresentam vantagens em relação aos sistemas compostos por polímeros-polímeros-água por serem mais baratos, exigirem menor

tempo de separação de fases e por terem propriedades físicas favoráveis à operação em larga escala. Dentre as propriedades pode-se destacar a elevada seletividade, diferenças de densidade e viscosidade entre as fases, o que torna adequado para o trabalho com equipamentos de extrações disponíveis no mercado. Assim, os sistemas PEG e sal têm sido usados para a extração de biomoléculas, de íons. A separação das fases é atingida mais rapidamente em virtude da maior densidade da fase salina em relação à fase polimérica, o que favorece o uso de sistemas polímeros-sal em aplicações industriais.^{20,21}

Tabela 1: Exemplos de componentes formadores de SABs¹⁷

Polímero	Polímero
Polietileno glicol	Dextrana (Dex) Ficoll Hidroxipropil-amino Polivinil álcool Polivinil pirrolidona Maltodextrina
Polipropileno glicol	Polietileno glicol(PEG)
Polímero	Sal
PEG-copolímero	(NH ₄) ₂ SO ₄ NH ₂ CO ₂ NH ₄ Na ₂ HPO ₄ K ₂ CO ₃ K ₃ PO ₄ K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ Na ₂ SO ₃ FeSO ₄

Dessa forma, sistemas formados por PEG-sal, tem sido altamente investigados devido às grandes vantagens se comparado aos sistemas formado por PEG-Dextrana. Prova disso é a gama de trabalhos que reportam estudo do comportamento de diagramas de fase frente à utilização PEGs de diferentes massas molares.

1.3. Fatores que influenciam na formação dos sistemas aquosos bifásicos

A segunda tendência visa descobrir forças que regem a formação e a partição de soluto nesses sistemas. No entanto, obter um sistema aquoso bifásico otimizado para a extração de um soluto ainda restringe-se a uma abordagem de tentativa e erro. Um dos aspectos que dificulta alcançarmos um modelo geral para a formação do SAB é a quantidade e diferença na natureza dos componentes que geram esses sistemas. Outra dificuldade relacionada à compreensão dos fatores que governam a formação e partição nos SAB's é, além da sua dependência da temperatura, a ausência de dados termodinâmicos referentes à variação de entalpia, entropia, volume e capacidade calorífica dos processos de mistura dos componentes formadores dos SAB's. Quando se obtém um diagrama de fase, podem-se extrair inúmeras informações a seu respeito, sendo todas relacionadas à minimização da energia livre. Como exemplo, através do diagrama, sabemos em qual composição global o sistema se encontra homogêneo ou bifásico sendo a separação entre essas duas regiões demarcada pela binodal.³

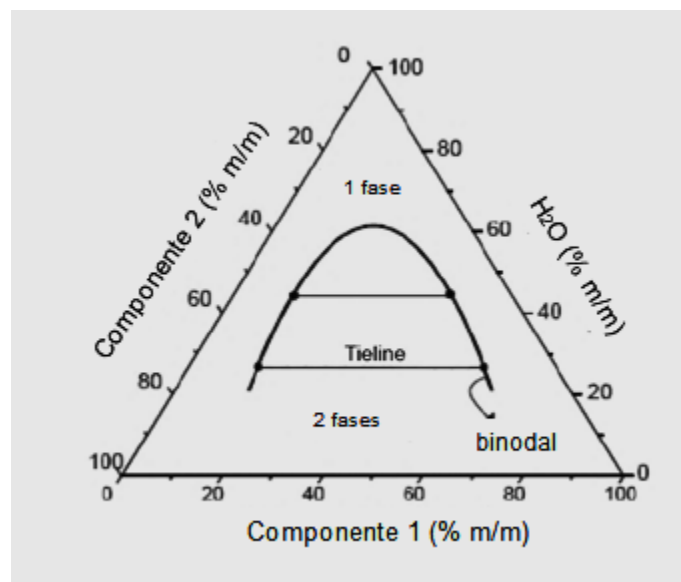


Figura 1: Diagrama ternário para sistemas aquosos bifásicos obtido à pressão e temperatura constantes¹

No diagrama de fase a composição de cada constituinte de um sistema é definida em termos de porcentagem massa/massa, % (m/m), podendo ser representada em um diagrama de fases triangular ou retangular(Figuras 1 e 2).¹¹

No diagrama triangular, o componente 1, o componente 2 e o solvente (água), são representados pelos vértices do triângulo equilátero, Figura 1. Pontos dentro da área triangular representam a mistura dos três componentes. A porcentagem de cada componente na mistura é lida ao longo da linha perpendicular ao lado oposto do vértice correspondente. A soma das coordenadas de qualquer ponto no diagrama é sempre 100%. Toda composição de mistura é representado por pontos abaixo da linha binodal ocasionam a separação das fases e acima da mesma, fornece um sistema aparentemente, homogêneo, ou seja, uma única fase.³

Geralmente, a composição química das duas fases em equilíbrio termodinâmico é representada por diagrama de fases de coordenadas retangulares, Figura 2.²² Em relação ao estudo de partição, essa representação é uma importante ferramenta¹¹ e para sistemas aquosos bifásicos com elevado teor de água, o diagrama que expressa apenas duas concentrações tem sido a mais utilizada.²³

O eixo da abscissa representa a concentração do sal e a ordenada, a concentração do polímero, que estão presente no sistema. Assim, nesse diagrama, pode-se identificar em quais composições o sistema é homogêneo ou heterogêneo, e as duas regiões são separadas pela linha binodal, APC, Figura 2. Nele estão representados as linhas de amarração, ABC, que unem o ponto da composição global (B) às concentrações dos componentes na fase superior(A) e às concentrações dos componentes da fase inferior(C).

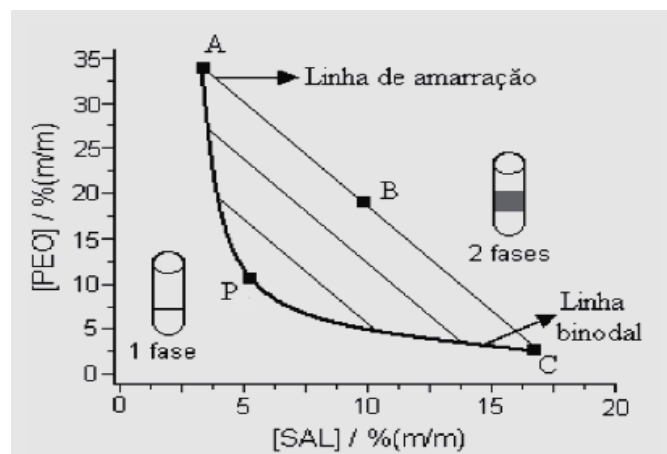


Figura 2: Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares obtido à pressão e temperatura constante.²²

Ao longo de uma mesma linha de amarração estão representados pontos que mostram composições globais que fornecerão fases superiores e inferiores com propriedades intensivas idênticas, mas diferentes propriedades extensivas²², Figura 3.

Os métodos para a construção da linha binodal são a titulação turbidimétrica e a análise das fases. No primeiro, e menos exato, também conhecida como ponto de nuvem, parte-se de uma solução estoque de um polímero, de concentração conhecida, sendo a ela adicionados gotas de uma solução estoque de sal (ou outro polímero), misturando, até o aparecimento da turbidez. Esse momento indica que o sistema separou de fases.

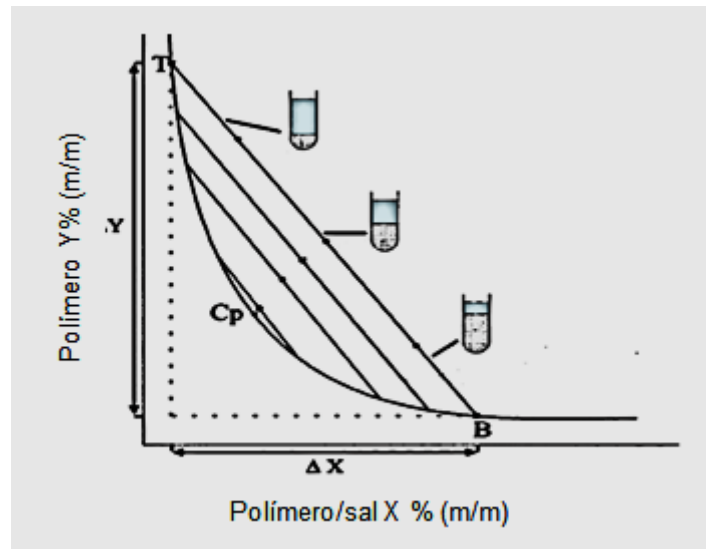


Figura 3: Diagrama de fase comparando uma propriedade extensiva, volume, em uma mesma linha de amarração.²⁴

No segundo método, e mais utilizado, a construção da linha binodal ocorre com a determinação da composição das fases superior e inferior de vários sistemas com composições globais variadas, obtendo os pontos A e C (Figura 2) de modo que a união entre esses dois pontos seja a linha de amarração.²⁵ Esse método, ainda possibilita o cálculo de um importante parâmetro termodinâmico que é o comprimento da linha de amarração (CLA) TLL, do inglês *tie line length*, de acordo com (1)²⁶

$$CLA = \left[(C_p^S - C_p^I)^2 + (C_s^S - C_s^I)^2 \right]^{1/2} \quad (1)$$

De modo que C indica as frações em massa, os sobrescritos S e I , referem-se às fases superior e inferior e os subscrito p e s , ao polímero e sal, respectivamente.²⁷ Frequentemente, o CLA é usado para expressar o efeito da composição do sistema na partição de um biomaterial além de medir as propriedades intensivas entre as fases.³¹ Quanto maior o valor do CLA , maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases.²⁸

Uma outra importante característica do diagrama de fase é a inclinação da linha de amarração, ILA (STL, do inglês *slope of the tie line*) que pode ser calculada de acordo com(2).²⁴

$$ILA = \frac{C_p^S - C_p^I}{C_s^S - C_s^I} = \frac{\Delta C_p}{\Delta C_s} \quad (2)$$

de modo que ΔC_p e ΔC_s indicam a variação da concentração do polímero e do sal, respectivamente, nas fases. Nascimento et al. (2011)²⁹ investigaram o efeito da temperatura nos diagramas de sistemas formado por UCON – sal analisando a ILA e mostraram um aumento da temperatura e da ILA para cada composição avaliada. Isso também foi observado para outros sistemas.^{30,31} Albertsson (1986)¹ concluiu de que os valores da ILA em sistemas poliméricos aquosos, normalmente são constante, ou seja, as linhas são paralelas uma com as outras, considerando o mesmo diagrama de fases.

Mediante à mudança dos diagramas de fase frente a esses parâmetros termodinâmicos são necessários estudos experimentais com os SABs. Esses estudos mostram que no processo de separação de fases a região bifásica é fortemente afetada por fatores tais como temperatura, massa molar do polímero, pH e tipo de sal utilizado.^{31,32,33} O presente trabalho tem por objetivo analisar apenas o efeito da temperatura e da massa molar.

- Efeito da temperatura sobre o diagrama de fase: estudos mostram que o aumento da temperatura pode provocar o aumento da área bifásica em diagramas do tipo polímero e sal.³⁴ Sendo assim, separam-se de fase mais facilmente em elevadas temperaturas e com baixas concentrações dos componentes. No entanto, o efeito da temperatura modifica-se de sistema para sistema e depende do tipo de polímero utilizado.^{24,31} Zaslavsky (1995)²⁴

mostra que um sistema contendo dois polímeros distintos se diferem de sistemas contendo apenas um polímero, ou seja, a concentração de polímeros para a separação de fases aumenta com o aumento da temperatura (Figura 4).²⁴

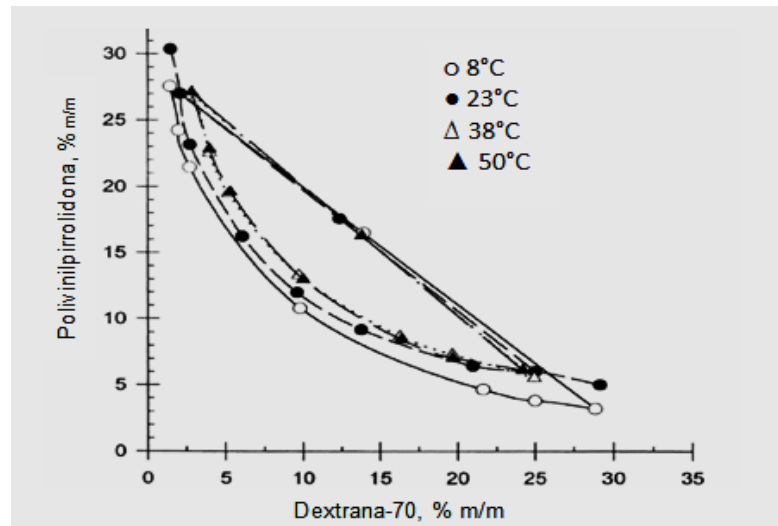


Figura 4: Diagrama de fase de sistema Dex-PVP-água em diferentes temperaturas²⁴

Considerando sistemas formados por um polímero e um sal Silva e Loh (2000)³⁵ reportaram que na interação entre os íons do sal e o polímero, para formação do SAB, ocorre a absorção de energia, ou seja, esta interação é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura favorece a formação dos produtos e aumenta a intensidade da interação sal-PEG. O aumento da temperatura também pode transferir água da fase superior para a fase inferior e, dessa forma, o volume das fases se altera. O aumento da temperatura causa o aumento da hidrofobicidade da fase polimérica e, assim, há exclusão de moléculas de água de solvatação do polímero, de modo a transportá-las para fase mais hidrofílica. A temperatura também afeta a inclinação da linha de amarração. Este fato é consequência da transferência de moléculas de água³⁶

- Efeito da massa molar do polímero: Albertsson observou que o aumento da massa molar do polímero promovia um aumento da área bifásica no diagrama de fase (Figura 5).^{24,37} Desde então muitos trabalhos têm sido publicados objetivando analisar o comportamento dos diagramas de fase frente a polímeros de massas molares diferentes.^{32,38-41,73}

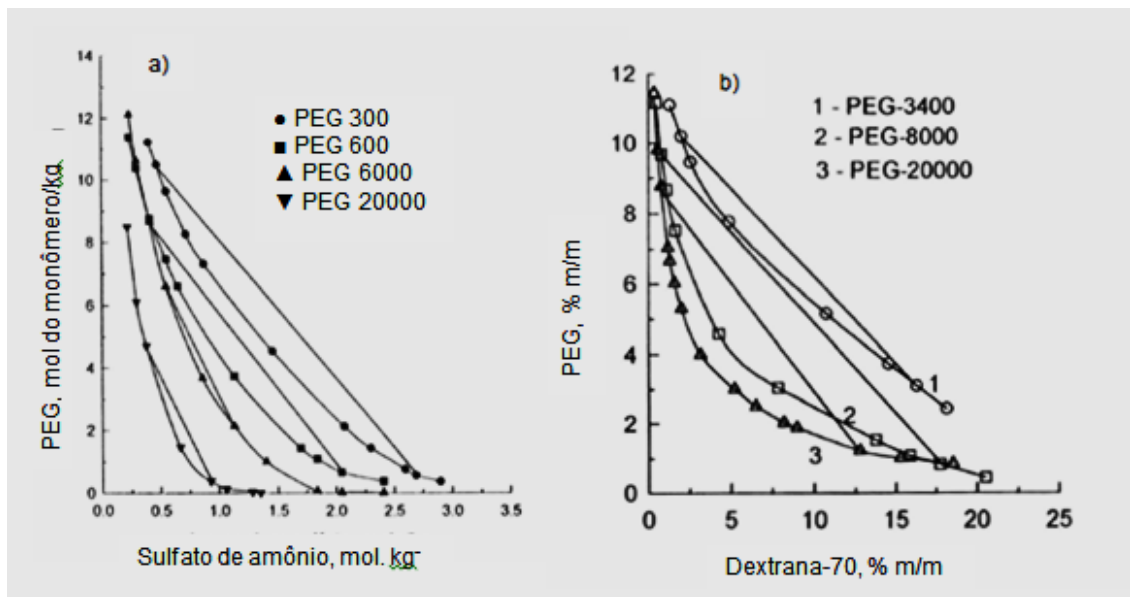


Figura 5: diagrama de fases para sistemas aquosos bifásicos formados por a) PEG-(NH₄)₂SO₄-água e b) PEG-dextrana 70-água, com PEGs de diferentes massas moleculares²⁴

A compreensão desses efeitos sobre os diagramas torna-se importante sobretudo para a aplicação dos SABs à partição. Assim, para a construção dos diagramas é fundamental a coleta de inúmeros dados experimentais, mas para minimizar os gastos, empregam-se modelos matemáticos termodinâmicos para predição do equilíbrio de fases em sistemas multicomponentes.⁴² Alguns modelos são baseados na teoria de expansão osmótica do virial e na teoria de rede. O modelo de rede, incorporando o conceito de energia de interação na forma de pares, pode dar uma representação mais satisfatória para os SABs do tipo polímero-polímero. O modelo de Flory-Huggins e o modelo UNIQUAC (**UNI**versal **QUA**sichemical **ACT**ivity **C**oefficient) foram usados para correlacionar dados de uma vasta variedade de SABs formados por polímero-polímero.⁴³ Kang e Snadler (1987)⁴⁴ descreveram o comportamento das fases do SAB composto por PEG + Dex + água, empregando esse modelo, o qual incorpora o efeito de polidispersão do polímero sobre o comportamento do sistema.

Na pesquisa sobre os SABs, a maioria das investigações segue os princípios de físico-química de polímeros, mais especificamente da estrutura da teoria de Flory-Huggins.³⁵ Nesta teoria, um conjunto de equações analíticas simples, estão sendo utilizadas para identificar as forças motrizes dominantes no processo de separação

de fases e partição de solutos, tais como proteínas, na presença e ausência de eletrólitos adicionados em toda uma classe geral de sistemas aquosos bifásicos.⁴⁵

Do ponto de vista da termodinâmica, a mistura de dois componentes formará uma solução se a variação da energia livre de Gibbs de mistura (ΔG_{mix}) for negativo, do contrário, o sistema separará em duas fases (3).²⁴

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S_{mix} < 0 \quad (3)$$

em que, ΔH_{mix} e ΔS_{mix} são a entalpia e a entropia da mistura, respectivamente e T é a temperatura absoluta.²⁴

1.4. A formação dos sistemas aquosos bifásicos e sua aplicação

A formação do SAB dependerá das interações intermoleculares, expressa em termos de energia livre, entre os constituintes. Tais interações são responsáveis por todas as propriedades físico-químicas presentes nas fases, como por exemplo, a distribuição dos componentes na mistura, a relação entre os volumes das fases, o coeficiente de partição, dentre outros.¹¹

Para um SAB produzido a partir de uma determinada composição global, geralmente definida em termos de porcentagem massa/massa, % (m/m), observa-se que uma das fases formadas será rica em polímero e a outra, rica em sal. Ambas predomina a água (Figura 6).²² Albertsson percebeu que, devido a um ambiente favorável, esses sistemas poderiam ser aplicados à partição/purificação de biomateriais, tais como proteínas, vírus, ácido nucléico e outras biomoléculas.

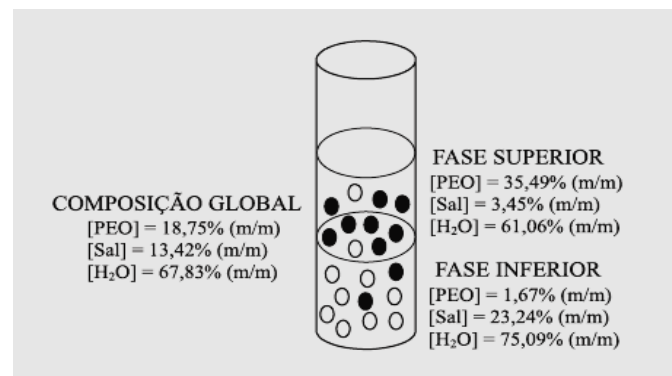


Figura 6: Composições químicas associadas a um ponto de mistura de um sistema.²²

Dessa forma eliminou-se dois problemas relacionados à aplicação dos sistemas água-solvente orgânico na purificação de biomateriais: a desnaturação e/ou efeito da precipitação e a partição extrema da proteína para uma das fases.^{10,25}

Nessa tendência o objetivo é aplicar os SABs conhecidos para a purificação/extração de novos solutos, considerando que esses sistemas possuem um excelente potencial quando aplicados a biosseparação, separação de moléculas menores, íons metálicos e compostos orgânicos.⁴⁶⁻⁴⁸

Diederich et al.(2013)⁴⁹ realizaram a purificação da proteína avidina do ovo da galinha branca, proteína esta que tem grandes aplicações nas indústrias farmacêuticas. As proteínas constituem basicamente 10% (m/m) do ovo, sendo que dessa fração total, ocorrem predominantemente, ovalbumina (54%), ovotransferrina (12-13%), ovomucóide (11%) e lisozima (3,5%), mas apenas 0,5% é avidina. Assim os sistemas aquosos bifásicos poderia representar uma alternativa à separação cromatográfica da proteína avidina de ovos brancos.

A extração líquido-líquido usando SABs é uma ferramenta promissora. Uma vez que cada uma, das duas fases coexistentes, contém predominantemente água, as proteínas podem ser dissolvidas nestes sistemas, mantendo a sua conformação nativa e atividade biológica. Na verdade, a presença de polímeros podem ainda melhorar a estabilidade da proteína contra denaturação térmica.²⁵ A exemplo disso, Ferreira et al. (2013)⁵⁰ reportam a partição de 15 diferentes proteínas em SABs formado por PEG – Na₂SO₄ (sulfato de sódio) e avaliam a partição sob efeito da adição de dois diferentes sais.

Muitos trabalhos recentes têm sido publicados mostrando o potencial dos SABs para purificação de proteínas devido a importância dessas na área de biotecnologia. Nascimento et al. (2010)⁵¹ utilizaram com êxito os SABs, baseado em PEG-citrato de sódio, para particionar a lectina ConBr do extrato de *Canavalia brasiliensis*, proteína essa com grandes aplicações biotecnológicas.

É importante ressaltar que esses sistemas são utilizados não somente para a partição de biomateriais mas também de íons metálicos.^{22,52} Embora os primeiros trabalhos sobre os sistemas aquosos bifásicos tenham sido publicados a partir de 1896, por Beijerinck¹⁰, somente em 1984 surgiu a primeira pesquisa envolvendo a aplicação dos SAB para extração de metais.⁵³

1.5. Componentes presentes nos SABs

1.5.1. Polietilenoglicol (PEG)

Esse polímero, também conhecido como poli(óxido) etileno (PEO) é um polímero sintético, hidrofílico e não iônico, sua estrutura parcial está representada na Figura 7. Ele é a base para as indústrias de plástico, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes. A maioria dos polímeros sintéticos é composta por moléculas que contêm centenas ou milhares de grupos de átomos interligados chamados unidades. A macromolécula de PEG é formada por apenas um tipo de unidade repetida e, por isso, é chamada homopolímero; quando é formada por mais de um tipo de unidade repetida é chamada copolímero ⁵⁴

O polietilenoglicol é altamente solúvel em água e sua forte hidratação é devido a um ajuste muito favorável dos monômeros de óxido de etileno dentro da estrutura da água. Uma característica importante das soluções de PEO é que a hidratação das unidades de EO é fortemente dependente da temperatura. Como consequência, a solubilidade do PEO em água pode ser ajustada pela variação de temperatura, providenciando uma maneira alternativa (além da variação na concentração) para variar sua auto-agregação. ⁵⁵

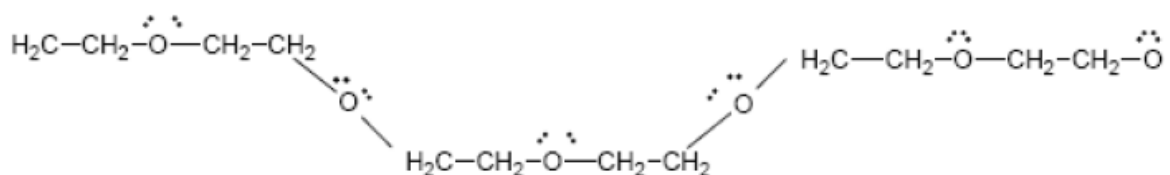


Figura 7: Representação plana parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.

Devido ao baixo custo e baixa toxicidade, o que o mantém dentro dos princípios da química verde, em relação a outros polímeros, o polietilenoglicol é o mais utilizado na extração de biomoléculas e íons. ³⁶

1.5.2. Sais

Para o preparo dos SABs, os sais utilizados são, normalmente, sulfato de sódio, sulfato de lítio, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico.⁵⁶ Alguns exemplo desses sistemas com diferentes sais em sua constituição são mostrados na Tabela 2.⁵⁷

Tabela 2 : Exemplo de grupos de SABs e seus constituintes

GRUPO DOS SABs	CONSTITUINTES
Polímero-polímero	PEG/Dextrana PEG/ PVA PEG/ Poli ácido acrílico
Polímero-sal inorgânico	PEG/ fosfato de potássio PEG/sulfato de magnésio PEG/tartarato de sódio

1.6 SABs: uma alternativa ambientalmente amigável

A maior preocupação de órgãos de regulamentações ambientais é a minimização de descarte de resíduos que sejam nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, e isso faz com que esses órgãos se tornem cada vez mais rígidos. Assim, o número de pesquisas acadêmicas e industriais voltadas para o desenvolvimento de metodologias que sejam menos poluentes, mais seguras e economicamente viáveis, é cada vez mais crescente.⁵⁸

Dessa forma os SABs são uma alternativa promissora para substituir as tradicionais extrações líquido – líquido, por se basear nos princípios da química verde. Como mencionado anteriormente, esses sistemas são constituído, majoritariamente por água (ver Figura 6) e os demais constituintes (polímeros e sais) não são tóxicos ou inflamáveis.⁵⁹

Raghavarao et al. (2003)⁶⁰ indicaram que este aspecto pode ser a chave para justificar o emprego de SAB em lugar de técnicas mais baratas, pois as

considerações ambientais podem inverter esta perspectiva. Em geral, as substâncias utilizadas são biologicamente inertes (polímeros sintéticos) ou biodegradáveis, no caso dos carboidratos. Em sistemas formado por polímero + sal + água, o processo de reciclagem do sal é tão dispendioso quanto a destilação de solventes orgânicos, porém o risco é menor por não serem voláteis.

Os polímeros ditos termossensíveis (TSP, do inglês *thermoseparating polymer*) exibem uma característica interessante: existe uma temperatura, chamada temperatura de ponto de névem (*cloud point temperature*) abaixo da qual o sistema água + polímero apresenta miscibilidade total, ou seja, são completamente miscíveis em qualquer proporção e o sistema será, conseqüentemente, monofásico. Entretanto, acima desta temperatura, ocorre a formação de uma fase rica em polímero e outra rica em água. À medida que se eleva a temperatura, a separação intensifica-se, chegando a um ponto em que coexistirão uma fase de polímero e outra de água praticamente puros. Este tipo de sistema também é empregado em extração líquido-líquido de substâncias sensíveis ao meio e apresentam excelentes possibilidades de reciclagem do polímero.⁶¹ Johansson et al. (1998)⁴⁵ indicam este tipo de sistema para situações em que a substância a ser purificada deve ser extraída de uma fase aquosa a uma dada temperatura e em seguida deve retornar a outra fase aquosa a uma outra temperatura para reciclagem do polímero.

2. Objetivo

2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho tem por objetivo a construção de diagrama de fases dos sistemas compostos por PEG – sal – água para analisar o comportamento dos mesmo mediante a variação da temperatura e da massa molar.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar dados de equilíbrio de fases formado por polietilenoglicol – sal – água, variando a massa molar do polímero (1500 , 3350 e 6000g.mol⁻¹) e a temperatura (10, 25 e 40°C);
- Obter 4 linhas de amarração para cada sistema;
- Calcular o comprimento e a inclinação da linha de amarração.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Materiais utilizados

Polietilenoglicóis comprado da Sigma-Aldrich® com massas molares médias de 1500, 3350 e 6000 g.mol⁻¹. Sais de fosfato de sódio monobásico anidro (NaH₂PO₄), massa molar 119,98 g.mol⁻¹, e fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄), massa molar 141,96 g.mol⁻¹, ambos da marca AMRESCO®. O pH do tampão neutro foi de 7,00 com razão em massa NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ de 2,602. Todos os experimentos foram feitos com água deionizada e/ou de osmose reversa de baixa condutividade (1,00 μS.cm⁻¹).

3.2. Metodologia

3.2.1. Obtenção do diagrama de fases

3.2.2. Titulação turbidimétrica

As curvas binodais foram construídas a partir da mistura de cada polímero (PEG 1500, 3350 e 6000), solução tampão e água, em cada temperatura (10, 25 e 40°C) através do método de titulação turbidimétrica. Este método consiste em titular uma solução de PEG com uma solução tampão, até que a mistura final das soluções tornem-se turva. Inicialmente, preparou-se soluções estoque dos PEGs 3350 e 6000 à 50% (m/m) e do PEG 1500 à 60% (m/m), e soluções estoque do tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7, à 30% (m/m). Em seguida, foi pesado em um tubo de ensaio cerca de 1,0 grama da solução estoque do PEG. Esse foi inserido em um banho termostatizado (Quimis®) na temperatura de análise (10, 25 e 40°C) e com o auxílio de uma micropipeta foi adicionando 25μL da solução estoque de tampão, até que a mistura turvasse. Essa mistura, após um curto repouso, verificou-se que havia a formação de duas fases. Após esse turvamento, adicionou-se 100 μL de água para que o sistema voltasse a ser homogêneo. As quantidades de tampão e água adicionados foram anotados, em cada ponto de turvamento, de modo que as

concentrações de polímero, tampão e água fossem determinados. A titulação foi repetida até a obtenção de pontos suficiente para a formação da curva binodal. As densidades da água, nas respectivas temperaturas, foram obtidas no *handbook* de físico-química e a densidade da solução de sal medida por meio do método picnométrico. Com as curvas pseudobinodais construídas, foram selecionados pontos de mistura na região bifásica para a quantificação dos pontos que compõem as linhas de amarração. Os pontos escolhidos foram submetidos à análise das composições das fases.^{11,30,62}

3.2.3. Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Para a construção dos diagramas de fase foram preparados sistemas aquosos bifásicos em tubos de 15 mL. Cada sistema foi pesado, separadamente, em uma balança analítica (RADWAG, modelo: AS220/C/2 com precisão de 0,0001 g) até uma massa final de 10,0000 g. Esse procedimento foi realizado com cada PEG (1500, 3350 e 6000). Todos os sistemas foram agitados, para a mistura dos componentes, e deixados em repouso, por 24 horas, em um banho termostaticado nas temperaturas de 10, 25 e 40 °C para a separação de duas fases transparentes, até que o equilíbrio termodinâmico fosse atingido.

3.2.4. 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 1000 µL, e a fase inferior retirada com uma seringa com agulha. Com as fases separadas foi realizada a quantificação de cada componente presente nas mesmas, sendo eles o PEG, através do índice de refração, o tampão, por condutivimetria, e a água, pela diferença entre as composições.⁶³

I. Quantificação do Sal

O tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7, foi quantificado a partir da condutimetria (Condutímetro GEHAKA, modelo: CG 2000 com eletrodo sensor de condutividade com uma constante de célula $K = 1,0$ e modelo: SCC04) juntamente com a construção das curvas analíticas de condutividade específica em função da concentração da solução padrão. Foram diluídas amostras adequadamente, a fim de que a influência da cadeia polimérica sobre os íons do tampão fosse eliminada, uma vez que o polímero não conduz corrente elétrica. Com as curvas analíticas devidamente construída, as fases, superior e inferior foram separadas e diluídas, as medidas de condutividade foram realizadas em triplicata. Neste caso considerou-se que as soluções salinas, tanto em água como em soluções poliméricas diluídas, mostram a mesma condutividade.

II. Quantificação do PEG

O polímero foi quantificado nas fases a partir da técnica de refratometria (A. KRÜSS optronic GmbH). Inicialmente foi construída uma curva analítica de índices de refração (IR) em função da concentração de soluções padrão do PEG e do tampão. É importante lembrar que nesta curva analítica foi considerado somente o incremento de IR em função da concentração da solução do polímero. Ou seja, a cada valor de IR encontrado, foi descontado o valor de 1,33250 referente ao valor da água destilada na temperatura de análise (25 °C). A contribuição do sal e da água será subtraída do valor total do índice de refração das fases, pela expressão:⁶⁴

$$n_D = a_0 + a_1 w_1 + a_2 w_2 \quad (4)$$

onde a_0 , a_1 e a_2 são parâmetros para o índice de refração da água, do sal e do PEG, respectivamente.

III. Quantificação da água

A quantidade de água presente em cada fase foi determinada pela diferença entre as composições em massa de cada componente em relação à porcentagem em massa total (w_{total}), Equação 5

$$w_{\text{água}} = w_{total} - w_{sal} - w_{PEG} \quad (5)$$

na qual $w_{total} = 1,00$.

A medida do índice de refração do polímero e a condutividade elétrica do sal foram feitas no Laboratório de Pesquisa em Físico-Química do grupo de Macromoléculas e Surfactantes da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As composições das fases, expressa em porcentagem em massa (% m/m) para os sistemas aquosos bifásicos (SABs) formados a partir da mistura de soluções aquosas de PEG (1500,3350 e 6000 g/mol) e do tampão $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,00), sob as temperaturas de 10, 25 e 40 °C, são mostrados nas Tabelas 3 a 5 abaixo, juntamente com os valores do comprimento da linha de amarração, CLA (inglês *tie line length*- TLL).

Após a quantificação dos polímeros pelo índice de refração e do sal por condutividade, os dados foram tabelados (Tabelas 3 a 5). Dessa forma, foi possível observar que esses sistemas possuem a água como o constituinte majoritário em ambas as fases (Tabela 6), esse resultado também pode ser encontrado para SABs formado por dois polímeros imiscíveis.^{1,25} Isso torna os sistemas em estudo, ideais para a partição/purificação de biomateriais. Nascimento et al. (2013)⁶⁶ utilizou sistemas de PEG de três diferentes massas molares como estratégia de separação e purificação da lectina. Além da quantidade da água ser favorável à partição de biomateriais, esses sistemas possuem baixa tensão interfacial, o que permite que esse tipo de soluto seja particionado sem que o mesmo perca sua atividade biológica.⁴⁵

As linhas de amarração (L.A) foram obtidas através da regressão linear correspondente às concentrações da composição global, da fase superior e da fase inferior, em cada temperatura (10, 25 e 40°C). O que se nota é que o CLA aumenta com o aumento da composição global. Esse comportamento está de acordo com resultados reportados para outros SABs formado por PEG.^{51,65}

Tabela 3: Dados de equilíbrio para o sistema PEG 1500 (ω_2) + sal (ω_1) + água a 10,25 e 40 °C.

		Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior		
		Sal	PEG	Sal	PEG	Sal	PEG	
PEG	L	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	TLL
A								
10	1	8,47	15,57	2,98	24,22	15,71	0,39	27,02
	2	8,80	17,49	2,45	28,13	18,09	1,04	31,28
	3	9,13	19,66	1,97	30,68	20,47	0,50	35,40
	4	9,67	21,34	1,39	33,43	22,50	0,49	39,12
25	1	9,99	18,42	1,92	31,09	19,09	0,49	35,09
	2	10,77	19,57	1,55	33,71	20,48	0,45	38,27
	3	11,64	20,75	1,25	36,01	21,53	1,46	40,06
40	1	8,30	15,19	2,82	26,81	14,75	0,39	28,99
	2	8,80	17,02	2,02	30,04	16,54	0,12	33,26
	3	9,40	18,61	1,79	34,55	17,47	0,33	37,64
	4	9,95	20,09	1,38	37,10	19,33	0,40	40,85

Tabela 4: Dados de equilíbrio para o sistema PEG 3350 (ω_2) + sal (ω_1) + água a 10, 25 e 40°C.

		Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior		
		Sal	PEG	Sal	PEG	Sal	PEG	
T(°C)	L	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	TLL
A								
10	1	7,87	14,57	2,83	24,16	14,2	0,79	26,09
	2	8,50	15,78	2,36	26,99	15,47	1,77	28,42
	3	9,07	16,94	1,80	29,63	16,49	1,41	31,81
	4	9,71	18,05	1,49	31,65	19,71	1,27	35,42
25	1	7,85	14,69	2,65	25,17	13,99	0,50	27,15
	2	8,45	15,93	2,14	29,14	14,63	0,68	31,08
	3	9,10	16,80	1,91	31,05	16,03	0,15	33,97
	4	10,11	17,40	1,39	34,56	17,65	0,25	37,97
40	1	8,68	18,17	1,53	34,15	15,63	0,28	36,69
	2	9,05	19,25	1,33	36,23	16,45	1,24	38,12
	3	9,50	20,26	1,07	39,51	18,33	1,27	41,95
	4	10,15	22,30	0,89	41,88	20,66	1,91	44,59

Tabela 5: Dados de equilíbrio para o sistema PEG 6000 (ω_2) + sal (ω_1) + água a 10,25 e 40 °C.

		Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior		
		Sal	PEG	Sal	PEG	Sal	PEG	
PEG	L	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	($100\omega_1$)	($100\omega_2$)	TLL
A								
10	1	7,00	12,22	3,65	18,99	11,33	0,16	20,34
	2	7,40	13,36	3,03	22,29	12,80	0,16	24,19
	3	7,73	14,77	2,30	26,06	14,05	0,07	28,52
	4	8,17	16,43	2,01	28,12	15,02	0,29	30,72
25	1	7,94	12,41	2,65	25,38	12,26	0,86	26,34
	2	8,45	13,44	2,17	28,14	13,48	0,31	30,04
	3	9,07	14,80	1,79	31,31	14,89	0,44	33,54
	4	9,98	16,47	1,26	35,80	16,88	0,49	38,60
40	1	7,06	12,20	2,23	25,36	11,49	0,13	26,87
	2	7,35	13,41	2,06	27,47	11,84	0,42	28,77
	3	7,68	14,79	1,82	30,05	12,64	0,47	31,49
	4	8,08	16,22	1,48	32,75	13,63	0,61	34,36

A Tabela 6 mostra o concentração da água (% m/m) obtido pela Equação 5.

$$W_{\text{água}} = W_{\text{total}} - W_{\text{sal}} - W_{\text{PEG}}$$

Tabela 6: Concentração da água (% m/m) presentes nas fases superiores e inferiores

Temperatura	L. A	PEGs					
		1500		3350		6000	
		FS	FI	FS	FI	FS	FI
10°C	1	72,80	83,90	73,01	84,78	77,35	88,51
	2	69,42	80,88	70,65	82,75	74,67	87,04
	3	67,35	79,03	68,57	82,09	71,64	85,87
	4	65,18	77,02	66,85	79,02	69,87	84,69
25°C	1	66,97	80,42	72,17	85,51	71,97	86,88
	2	64,71	79,07	68,71	84,69	69,69	86,22
	3	62,72	76,90	67,04	83,82	66,90	84,67
	4	-	-	64,05	82,09	62,93	82,63
40°C	1	70,38	84,86	64,32	84,08	72,41	88,38
	2	67,94	83,34	62,44	82,31	70,47	87,74
	3	63,66	82,20	59,42	80,40	68,13	86,89
	4	61,52	80,27	57,23	77,43	65,76	85,76

A Figura 8 faz uma comparação da capacidade de retenção de água entre as moléculas de PEG (1500, 3350 e 6000) nas três temperaturas analisadas.

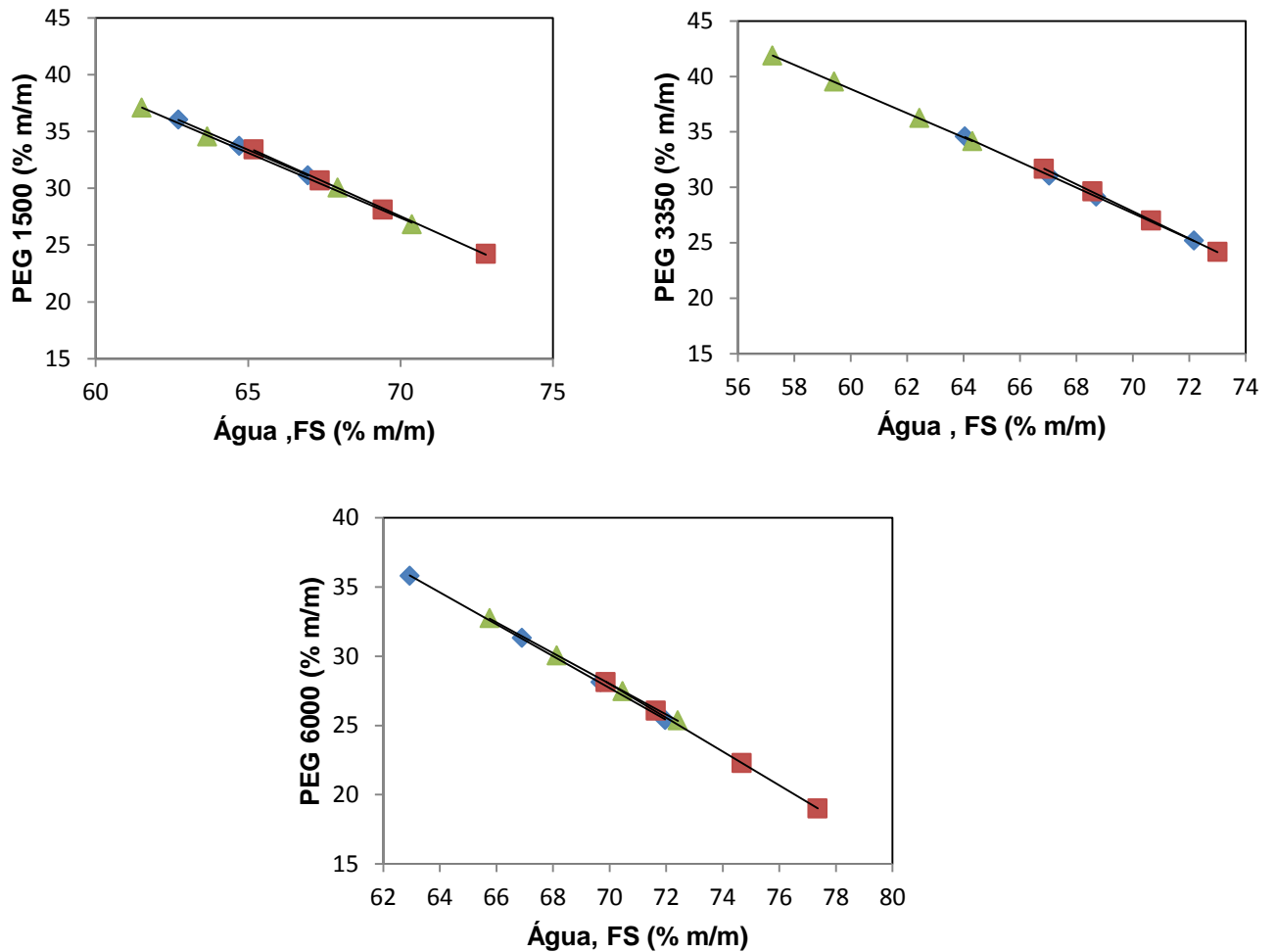


Figura 8 : Capacidade de retenção de água das moléculas de PEG (1500, 3350 e 6000) nas temperaturas de 10°C (■), 25°C (◆) e 40°C (▲)

Em elevadas temperaturas, ocorre transferência de moléculas de água da fase superior, rica em PEG, para a fase inferior. Isso ocorre devido ao aumento da proporção hidrofóbica da molécula com o aumento da temperatura o que proporciona uma menor retenção de moléculas de água nessa fase, pois haverá menor interação entre as moléculas de água e a parte hidrofóbica da macromolécula.⁶⁷

4.1. Influência da temperatura sobre os diagramas de fase

O efeito da temperatura na composição do equilíbrio de fase foi analisado através da inclinação da linha de amarração, ILA (do inglês *slopes of the tie-line*). A ILA foi calculado de acordo com a Equação 2^{24,68} e os resultados reportados na tabela 7 .

Tabela 7: Influência da temperatura sobre a inclinação da linha de amarração

Tie Line	Temperatura / °C		
	10	25	40
PEG 1500+ Fosfato + água			
1	-1,87	-1,78	-2,21
2	-1,73	-1,76	-2,06
3	-1,63	-1,70	-2,18
4	-1,56	-----	-2,04
PEG 3350+ Fosfato + água			
1	-2,02	-2,18	-2,40
2	-1,92	-2,28	-2,31
3	-1,92	-2,19	-2,22
4	-1,67	-2,11	-2,02
PEG 6000+ Fosfato + água			
1	-2,45	-2,55	-2,72
2	-2,27	-2,46	-2,77
3	-2,21	-2,36	-2,73
4	-2,14	-2,26	-2,65

Como pode ser visto, tanto o comprimento da linha de amarração como a inclinação, aumentam com o aumento da temperatura para cada composição global avaliada. Esse comportamento foi observado em outros sistemas PEG-sal²⁴ e copolímeros^{29,30}. Carvalho et. al. (2007)⁶⁹ analisou a influência da temperatura no comportamento do sistema PEG 4000 + fosfato de potássio e verificou que o aumento da ILA foi menos pronunciado com o aumento da temperatura.

Uma possível explicação para a mudança dos valores da ILA é a transferência de água da fase superior para a fase inferior, desse modo aumentando a concentração de PEG na fase superior e diminuindo a concentração do tampão na

fase inferior.³⁰ Esses valores de ILA são resultados das interações entre todos os componentes que compõe os SABs, que promove a partição de cada um desses componentes entre as fases para minimizar energia livre do sistema.⁷⁰

O efeito da temperatura sobre o diagrama de fase de cada PEG 1500 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água pode ser visto nas Figuras (9 a 17) abaixo.

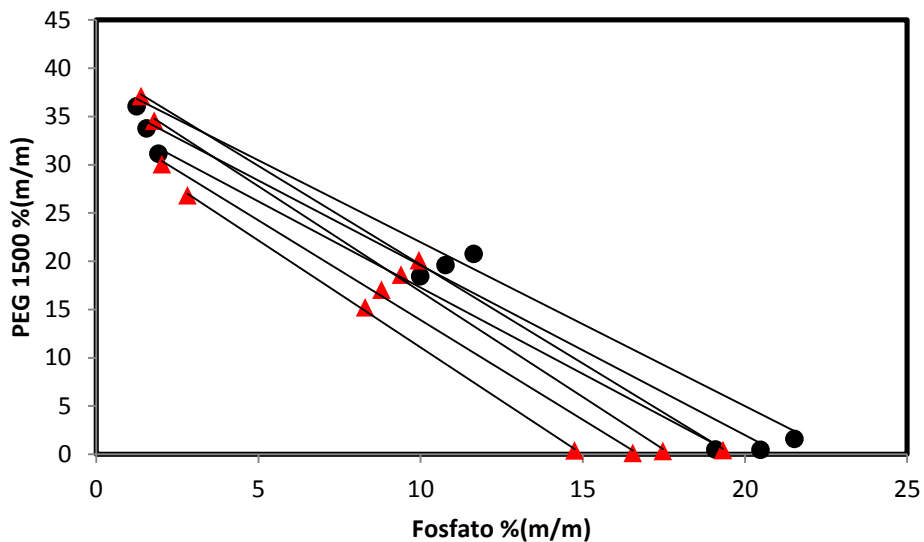


Figura 9 : Diagrama de fase do sistemas PEG 1500 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à (▲) 40°C e (●) 25°C

Na Figura 9 vemos que a área bifásica se expande com aumento da temperatura, enquanto que na Figura 10 mostra a redução da área bifásica com o aumento da temperatura. A Figura 11 mostra que, para um aumento da temperatura, a concentração do PEG aumenta na fase superior e houve um a redução da concentração do tampão na fase inferior. Esse efeito também foi observado por Santos et al. (2012)²⁸ ao investigar sistemas formado por PEG 1500 + tiosulfato + H_2O e Oliveira et al. (2008)³¹ quando estudou o sistema de PEG 4000 + sulfato de zinco.

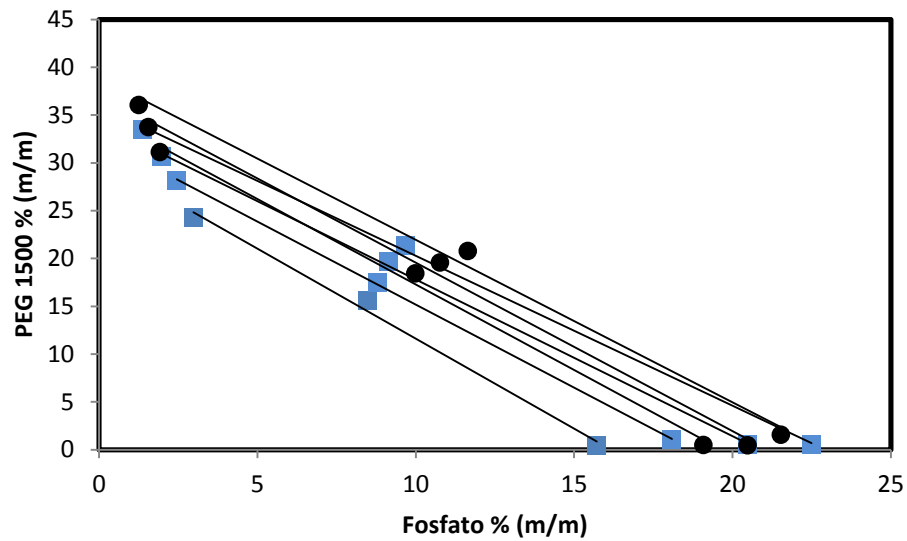


Figura 10 : Diagrama de fase do sistemas PEG 1500 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à (■) 10°C e (●) 25°C

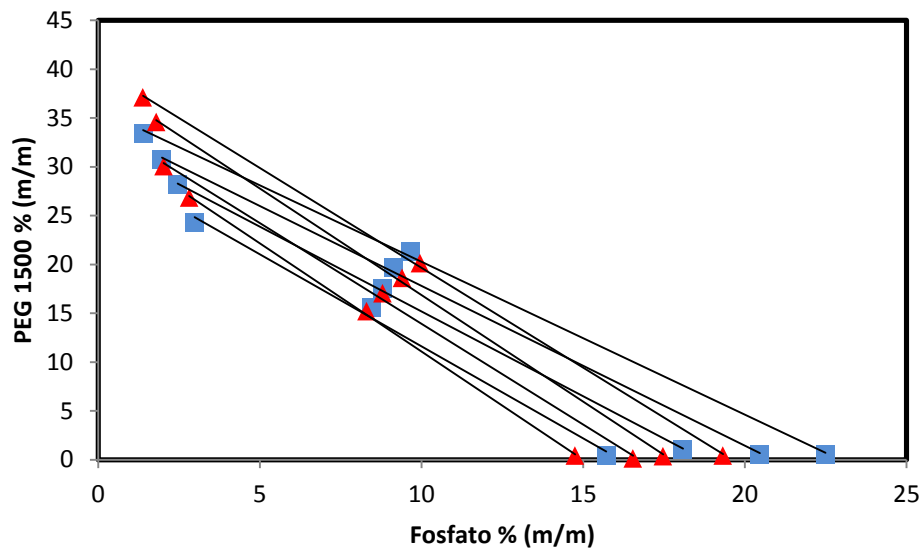


Figura 11 : Diagrama de fase dos sistemas PEG 1500 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à (■) 10°C e (▲) 40°C

As Figuras a seguir mostram o efeito da temperatura nos diagramas dos PEGs 3350 e 6000 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água. As Figuras 12 e 14 mostram que para o PEG 3350 a área bifásica se expande quando a temperatura é reduzida.

Enquanto que na Figura 12, o aumento na temperatura gerou um insignificante aumento da área bifásica.

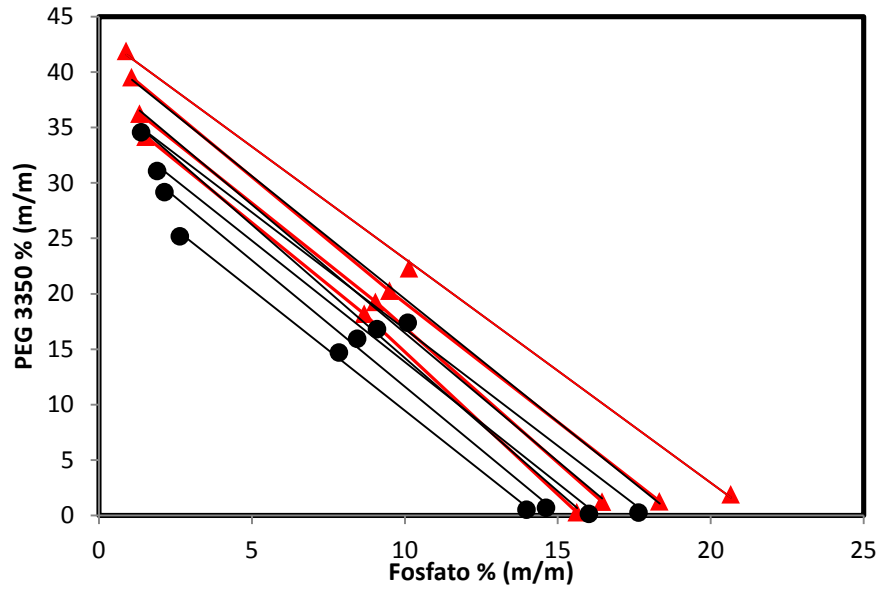


Figura 12: Diagrama de fase do sistemas PEG 3350 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à (\blacktriangle) 40°C e (\bullet) 25°C

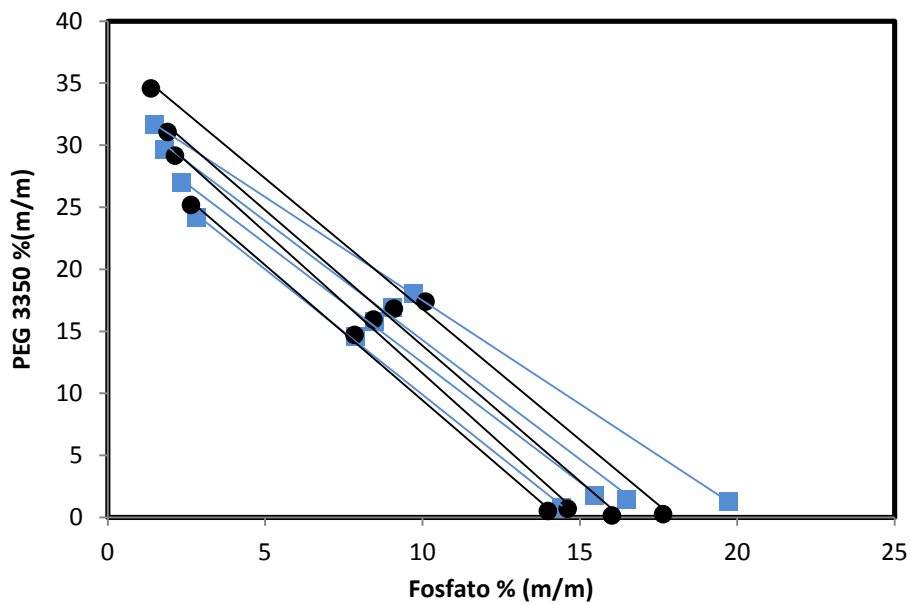


Figura 13 : Diagrama de fase do sistemas PEG 3350 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à (\blacksquare) 10°C e (\bullet) 25°C

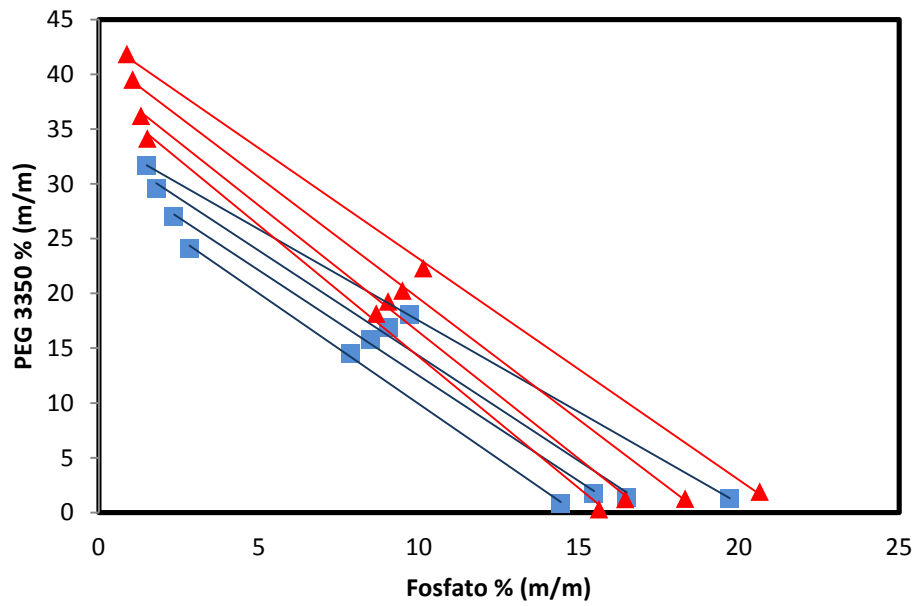


Figura 14 : Diagrama de fase dos sistemas PEG 3350 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à (■) 10°C e (▲) 40°C

Nas Figuras 15 a 17 mostram os sistemas formado pelo PEG 6000 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$.

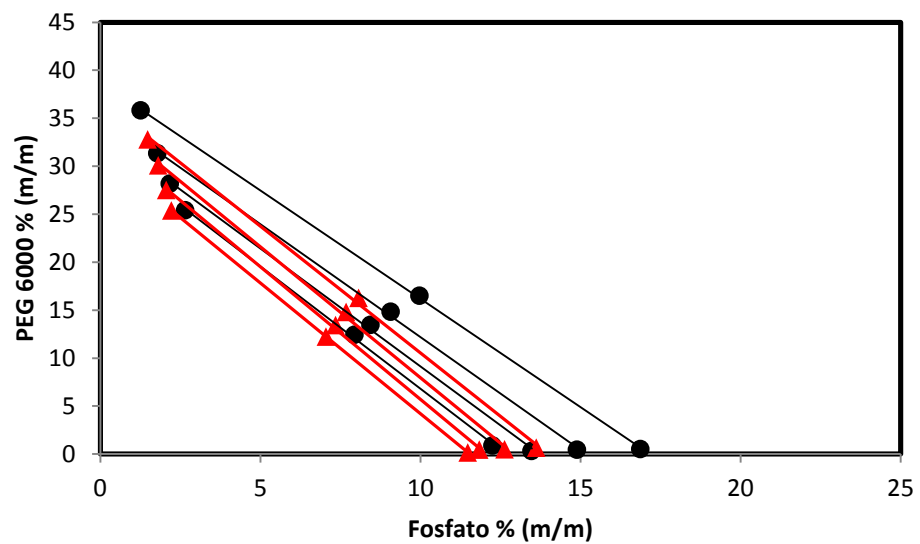


Figura 15 : Diagrama de fase do sistemas PEG 6000 + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à (▲) 40°C e (●) 25°C

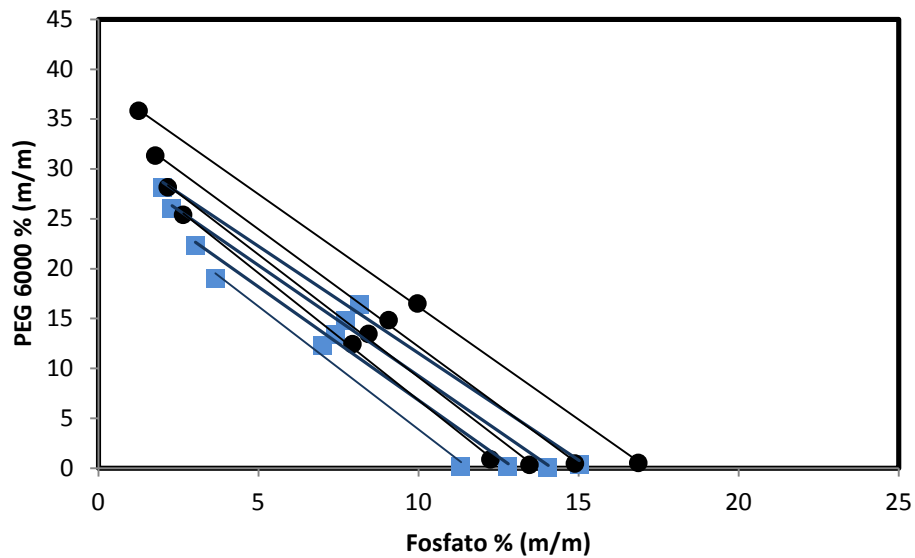


Figura 16: Diagrama de fase do sistemas PEG 6000 + NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ + água à (■) 10°C e (●) 25°C

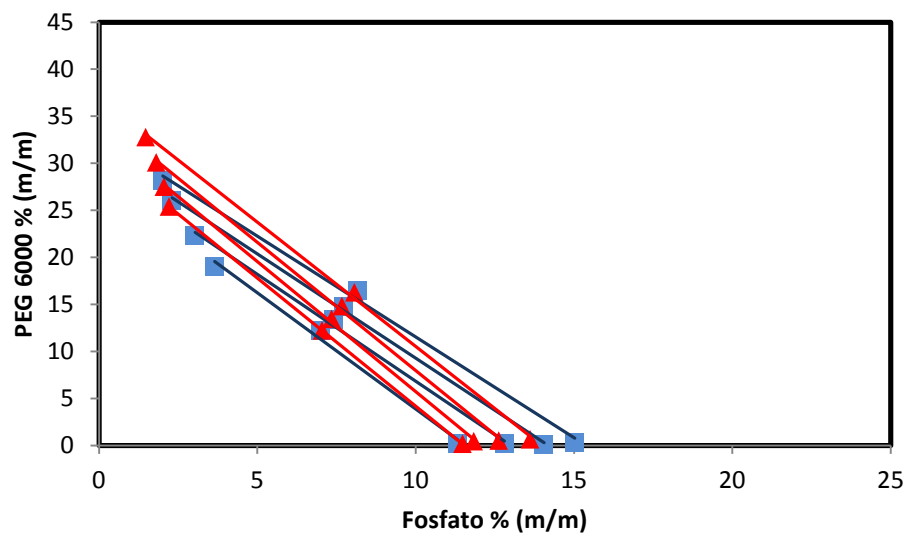


Figura 17: Diagrama de fase dos sistemas PEG 6000 + NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ + água à (■) 10°C e (▲) 40°C

Na figura 15 há uma pequena expansão da área bifásica com o aumento da temperatura para o sistema com o PEG 6000. Isso ocorre porque a interação sal-PEG na formação do SAB é endotérmica, ou seja, a formação do SAB é favorecida pelo aumento da temperatura. Prova disso, foi o uso da técnica de calorimétrica por

Silva e Loh (2000)³⁵ em que obtiveram as medidas de entalpia de transferência (ΔH_{tr}) para alguns sais de sistemas água e PEG. Esse modelo está disposto no tópico 7 (Anexos) Na Figura 16 esse comportamento é oposto pois há uma diminuição da área bifásica com o aumento da temperatura.

Em relação á Figura 17 percebeu-se um suave aumento da área bifásica com a diminuição da temperatura. Tal comportamento também é observado por Zafarani-Moattar and Sadeghi.⁷¹

É importante ressaltar que a contribuição entálpica para os três PEGs investigados nesse trabalho foi maior quando comparado aos sistemas formado por copolímeros bloco. Isso foi observado por Nascimento (2003)⁶⁷ que estudou o efeito da temperatura para sistemas formados por copolímeros (L35 e F68) e PEGs (1500 e 8000) com sais de fosfato. Nesse estudo ela concluiu que a variação da temperatura não influenciava fortemente na variação da região bifásica para os copolímero.

4.2. Influência da massa Molar do PEG sobre o diagrama de fase

O efeito da massa molar sobre os diagramas de fases estão demonstrados nas Figuras 18-20.

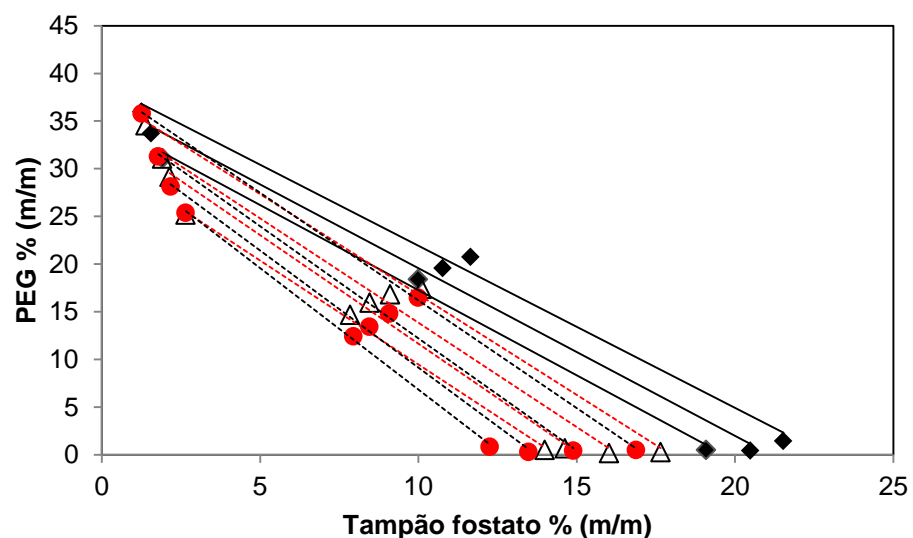


Figura 18 : Efeito da massa molar nos diagramas de fases para os sistemas de PEG 1500 (■), 3350 (Δ) e 6000 (●) + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à 25°C

Pode-se perceber que o aumento da massa molar resultou em um aumento da região bifásica em todas as temperaturas (10, 25 e 40°C). Ou seja, alta massa molar do PEG requer uma baixa concentração dos constituintes para promover a separação de fase. Esse fato é relatado na literatura por vários trabalhos.^{33,39,41,72} O efeito da massa molar do polímero pode ser devido a uma extensão da camada de hidratação.²⁴

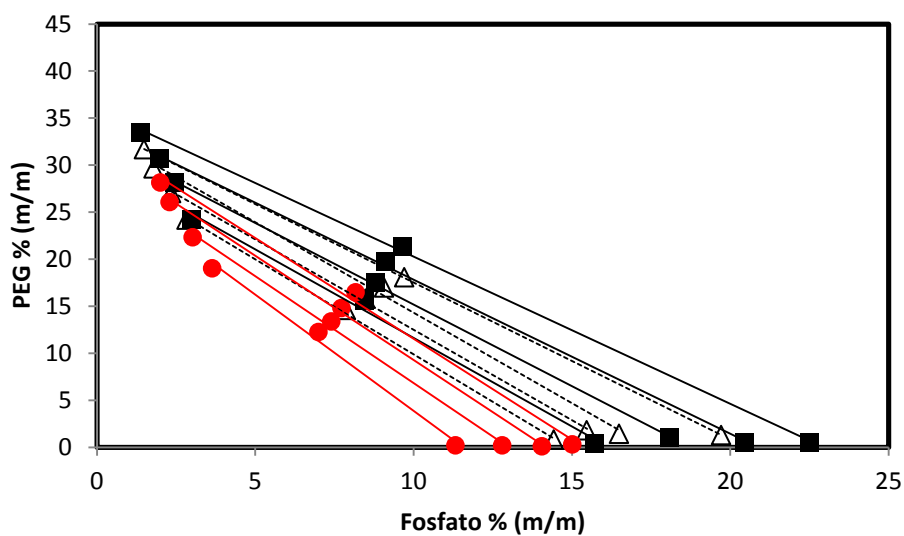


Figura 19: Efeito da massa molar nos diagramas de fases para os sistemas de PEG 1500 (■), 3350 (△) e 6000 (●) + NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ + água à 10°C

Alvarenga et al. (2014)⁷³ estudaram o comportamento do equilíbrio de fase dos PEGs 1500 e 4000 + sulfito de sódio + água em diferentes temperaturas e observaram os mesmos resultados citado anteriormente. E completam afirmando que esse efeito pode ser causado pelo aumento do caráter hidrofóbico do PEG com alta massa molar se comparado com PEG de baixa massa molar. Isso por que o aumento da hidrofobicidade acarretará na incompatibilidade entre os componentes dos sistema. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores.⁴⁰

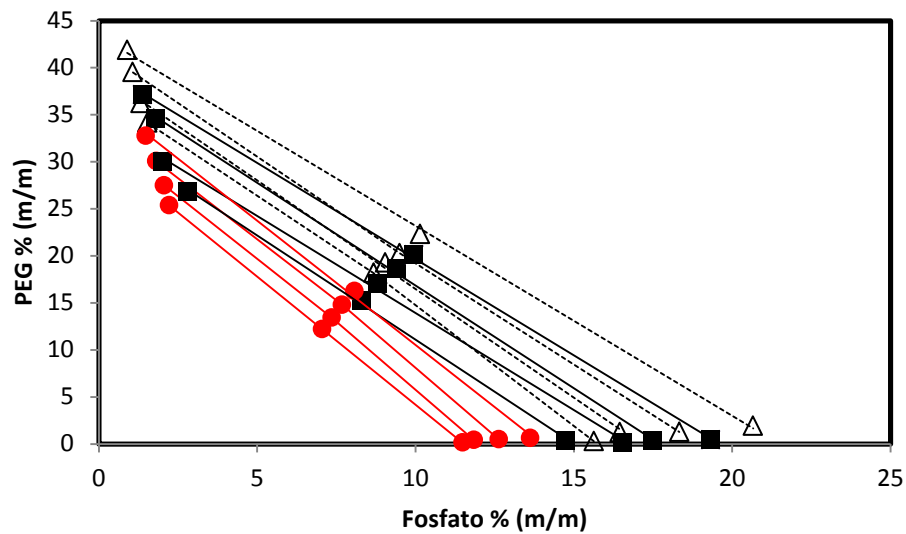


Figura 20 : Efeito da massa molar nos diagramas de fases para os sistemas de PEG 1500 (■), 3350 (Δ) e 6000 (●) + $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + água à 40°C

Um modelo proposto por Guan (1994)⁷⁴ explica o efeito da massa molar sobre os diagramas de fase. Este modelo é baseado na geometria estatística de que o volume eficaz excluído pode ser determinado. Esse volume é o espaço disponível numa rede de um componente (PEG) para o outro componente (sal). O valor desse volume eficaz excluído é afetado pelo tamanho, forma, interações intermoleculares entre os componentes formadores dos SABs. Quanto maior a massa molar do PEG, maior será o valor desse volume. Os valores mais elevados do volume eficaz de exclusão são refletidas nos diagramas de fase por uma mudança na posição da curva binodal em direção à origem, o que corresponde a um aumento da região de duas fases, e, portanto, uma menor concentração de polímero é necessário para formar sistemas de duas fases. Este resultado está de acordo com o reportado em literatura para outros sistemas.⁷⁵

5. CONCLUSÃO

De acordo com os sistemas formados por PEG e sais de fosfato, o aumento da temperatura proporcionou uma melhor transferência de água das fases superiores para as fases inferiores em todos os PEGs e nas três temperaturas. Foi comprovado também o ambiente favorável para tais sistemas serem utilizados para a partição, pois suas fases são formadas majoritariamente por água. Além disso, foi possível observar o efeito da temperatura sobre esses sistemas, mesmo que esse efeito tenha ocorrido de forma suave.

Sob o efeito da massa molar, os diagramas de fases também mostraram sua variação. Ficou claro que o aumento da massa molar, aumenta as unidades hidrofóbicas desses polímeros, gerando diagramas com maiores áreas bifásicas e conseqüentemente, menores concentrações dos constituintes para a separação das fases.

6. Referências Bibliográficas

1. ALBERTESSON, P.A. *Partition of cell Particles and Macromolecules*. 3rd. ed. New York: Wiley. 1986.
2. LI, Y; ZHANG, M; LU, Q and SU, H. Phase behaviour for aqueous two-phase systems containing the ionic liquid 1-butylpyridinium tetrafluoroborate/1-butyl-4-methylpyridinium tetrafluoroborate and organic salts (sodium tartrate/ammonium citrate/trisodium citrate) at different temperatures. *J. Chem. Thermodynamics*. **66**, 80-87, 2013.
3. da SILVA, L.H.M. Uso da calorimetria em estudos físico-químicos de processos responsáveis pela formação de sistemas líquidos bifásicos contendo poli(óxido de etileno). Tese de doutorado, Campinas, SP, 2001.
4. PESSOA, A; KOLIKIAN, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos, Manole: São Paulo. 2005.
5. HAGHTALAB, A; MOKHTARANI, B; MAURER, G. Experimental Results and Thermodynamic Modeling of the Partitioning of Lysozyme, Bovine Serum Albumin, and α -Amylase in Aqueous Two-Phase Systems of PEG and (K_2HPO_4 or Na_2SO_4). *J. of Chem. and Eng. Data*, **48**, 1170-1177, 2003.
6. KEPKA, C; RHODIN, J; LEMMENS, R; TJERNELD, F; GUSTAVSSON, P.-E. Extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system *J. Chrom. A*, **1024**, 95-104, 2004.
7. REH, G; NERLI, B; PICÓ, G. Isolation of alpha-1-antitrypsin from human plasma by partitioning in aqueous biphasic systems of polyethyleneglycol-phosphate. *J. Chrom. B*, **780**, 389-396, 2002.
8. TUBIO, G., NERLI, B., PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. *J. Chrom. B*, **799**, 293-301, 2004.
9. BASKIR, J.N; HATTON, T. A; SUTE, U. W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. *Biotechnology and Bioengineering*, **34**, 541-558, 1989.

10. WALTER, H; BROOKS, D; FISHER, D. Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses and applications to biotechnology. United Kingdom Edition. London: Academic Press Inc. Ltda.1985.
11. da SILVA, L. H. M; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Quim. Nova.***29**, 1345-1351, 2006.
12. ALBERTSSON, P. A. Chromatography and partition of cells and cell fragments. *Nature.***177**, 771-774, 1956.
13. Esmanhoto, E; Kilikian, B. V. ATPS applied to extraction of small molecules – polycetides – and simultaneous clarification of culture media with filamentous microorganisms. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci*, **807**, 139-143, 2004.
14. Rito-Palomares, M. The practical application of aqueous two-phase processes for the recovery of biological products. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 535-543, 2002.
15. Griffin, S. T.; Spear, S. K.; Rogers, R. D. Effects of speciation on partitioning of iodine in aqueous biphasic systems and onto ABEC resins. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **807**, 151, 2004.
16. SVENSSON, M; JOABSSON, F; LINSE, P; TJERNELD, F. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer - Effects of temperature, salts and surfactants. *J. Chrom A*, **761**, 91-101, 1997.
17. MACHADO, F. L. C. Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietileno glicol maltodextrina-água. Tese de mestrado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 1999
18. da SILVA, L.H.M; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous mixtures of maltodextrin with polypropylene glycol, *Carbohydrate Polymers*, **46**, 267-274, 2001.
19. 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 systems based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol. *J. Chrom. B*, **743**, 79-84, 2000.

20. HUSTED, H; CORNER K.H; KULA, M.R. Partition in aqueous two-phase systems. *Trends Biotech*, **3**, 139-144, 1985.
21. SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*, **187-188**, 489, 2001.
22. da SILVA, M. C. H; da SILVA, L. H. M; PAGGIOLI, F. J; COIMBRA, J. S. R; MINIM, L. A. Sistemas aquosos bifásicos: Uma alternativa eficiente para extração de íons. *Quim. Nova*, **29**, 1332-1339, 2006.
23. da SILVA, L. H. M. Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: polímero/polímero e polímero/sal. Tese de doutorado, Campinas, SP, 2000.
24. ZASLAVSKY, B. Y. Aqueous two-phases partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications. New York: Marcel Dekker, Inc. 1995.
25. ALBERTESSON, P. A. *Partition of cell Particles and Macromolecules*. 2nd. ed. New York: Wiley. 1986
26. HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase Systems: Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press. 2000. 13 p.
27. KALAIVANI, S; REGUPATHI, I. Partitioning studies of α -lactalbumin in environmental friendly poly (ethylene glycol)—citrate salt aqueous two phase systems. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**, 1475–1483. 2013.
28. SANTOS, I. J. B; de CARVALHO, R. M. M; da SILVA, M. C. H; da SILVA, L. H. M. Phase Diagram, Densities, and the Refractive Index of New Aqueous Two-Phase System Formed by PEO1500 + Thiosulfate + H₂O at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data.* **57**, 274-279, 2012.
29. NASCIMENTO, K. S; YELO, S; CAVADA, B. S; AZEVEDO, A. M; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid equilibrium data for aqueous two-phase systems composed of ethylene oxide propylene oxide copolymers. *J. Chem. Eng. Data.* **56**, 190-194, 2011.
30. da SILVA, L. H. M; da SILVA, M. C. H; MESQUITA, A. F; do NASCIMENTO, K. S; COIMBRA, J. S. R; MINIM, L. A. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + salt + water two-phase systems at different temperatures and pH. *J. Chem. Eng. Data.* **50**, 1457-1461, 2005.
31. de OLIVEIRA, R. M; COIMBRA, J. S. R; FRANCISCO, K. R; MINIM, L. A; da SILVA, L. H. M; PEREIRA, J. A. M. Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-

- Phase Systems Containing Poly(ethylene) Glycol 4000 and Zinc Sulfate at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **53**, 919-922, 2008
32. GHAHREMANI, R; RAHIMPOUR, F. Equilibrium Phase Behavior of Aqueous Two-Phase Systems Containing Ethylene Oxide–Propylene Oxide of Different Molecular Weight (2500, 12000) and Sodium Citrate Salt at Various Temperatures and pH. *J. Chem. Eng. Data*, **59**, 218-224, 2014.
33. ZHANG, W; HU, Y; WANG, Y; 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. *Thermochimica Acta*, **560**, 47-54, 2013.
34. RAJA, S; MURTY, V. R. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly(Ethylene Glycol) 6000 +Sodium Succinate + Water System at Different Temperatures. *The ScientificWorld Journal*. **2013**, 1-7,2013.
35. da SILVA, L. H. M; LOH, W. Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly (ethylene oxide) and electrolytes (or dextran). *J. Phys. Chem. B*, **104**, 10069-10073, 2000.
36. MARTINS, J. P; DE OLIVEIRA, F. C; COIMBRA, J. S. R; DA SILVA, L. H. M; DA SILVA, M. C. H; DO NASCIMENTO, I. S. B. Equilibrium phase behavior for ternary mixtures of poly(ethylene) glycol 6000 + water + sulfate salts at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **53**, p. 2441-2443. 2008.
37. ALBERTSSON, P-Å. Partition of Cell Particles and Macromolecules. Stockholm: Almqvist & Wiksells, 231 p. 1960
38. PADILHA, G. S; FERREIRA, J. F; ALEGRE, R. M; TAMBOURGI, E. B. Efeitos do pH e da massa molar do polímero do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos. *Maringá*, **33**, 1-4, 2011.
39. 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*, **59**, 850-859, 2014.
40. TUBIO, G; PELLEGRINI, L; NERLI, B. B; PICÓ, G. A. Liquid-liquid Equilibria of aqueous two – phase systems containing Poly(ethylene glycols) of different Molecular Weight and sodium citrate. *J. Chem. Eng. Data*. **51**, 209-212, 2006.
41. SILVÉRIO, S.C; WEGRZUN, A; LLADOSA, E; ROGRIGUEZ, O; MACEDO, E. A. Effect of Aqueous Two-Phase System Constituents in Different

- Poly(ethylene glycol)–Salt Phase Diagrams. *J. Chem. Eng. Data*, **57**, 1203–1208, 2012.
42. COIMBRA, J. S. R; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D; MINIM, L. A; MEIRELLES, A. J. A. Uso dos Sistemas Aquosos Bifásicos na Extração Líquido-Líquido. Viçosa: UFV, 2003. 15p.
 43. LI, M; ZHU, Q. Z; WU, Y; LIN, D. Measurement of phase diagrams for new aqueous two-phase systems and prediction by a generalized multicomponent osmotic virial equation. *Chemical Engineering Science*, **53**, 2755-2767, 1998.
 44. KANG, C.H; SANDLER, S. I. Phase behavior of aqueous two-polymer systems. *Fluid Phase Equil.*, **38**, 245-272, 1987.
 45. JOHANSSON, H.-O., KARLSTRÖM, G., TJERNELD, F., HAYNES, C. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *J.Chrom B*, **711**, 3–17, 1998.
 46. ROGERS, R.D, WILLAUER, H.D., GRIFFIN, S.T., HUDDLESTON, J.G. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems. *Journal Chrom. B*, **711**, 255-263, 1998.
 47. ROGERS, R.D., GRIFFIN, S.T. Partitioning of mercury in aqueous biphasic systems and on ABEC™ resins *J. Chrom. B*, **711**, 277-283, 1998.
 48. MADEIRA, P. P; BESSA, A; TEIXEIRA, M. A; RIBEIRO, L. A; AIRES-BARROS, R; RODRIGUES, A. E; ZASLAVSKY, B. Y. Study of organic compounds–water interactions by partition in aqueous two-phase systems *Journal of Chromatography A*, 1322 (2013) 97– 104
 49. DIEDERICH, P; AMRHEIN, S; HAMMERLING, F; HUBBUCH, J. Evaluation of PEG/phosphate aqueous two-phase systems for the purification of the chicken egg white protein avidin by using high-through put techniques. *Chem. Eng. Science*, **104**, 945–956, 2013
 50. FERREIRA, L; MADEIRA, P. P; MIKHEEVA, L; UVERSKY, V. N; ZASLAVSKY, B. Y. Effect of salt additives on protein partition in polyethylene glycol–sodium sulfate aqueous two-phase systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1834**, 2859-2866, 2013.
 51. NASCIMENTO, K. S; AZEVEDO, A. M; CAVADA, B. S; AIRES-BARROS, M. R. 'Partitioning of *Canavalia brasiliensis* Lectin in Polyethylene Glycol - Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems'. *Separation Science and Technology*, **45**, 2180-2186, 2010.

52. BULGARIU, L; BULGARIU, D. Extraction of metal ions in aqueous polyethylene glycol–inorganic salt two-phase systems in the presence of inorganic extractants: Correlation between extraction behaviour and stability constants of extracted species. *Journal of Chromatography A*, **1196–1197**, 117–124. 2008.
53. ZVAROVA, T. I; SHKINEV, V. M; VOROB'eva, G. A; SPIVAKOV, Y. A. liquid-liquid extraction in the absence of usual organic solvents: Applications of two-phase aqueous systems based on a water-soluble polymer. *Mikrochim. Acta*, **3**, 449, 1984
54. MURRELL, J. N.; JENKINS, A. D. Properties of Liquids and Solutions, Second Edition. NewYork: J. Wiley,. 1994, 303 p.
55. LOH, W. Block copolymer micelles. Encyclopedia of Colloid and Surface Science. A. Hubbard (Ed.).Marcel Dekker, 2001
56. NASCIMENTO, I. S. B. Partição da Glutenina de Farinha de Trigo Especial em Sistemas Aquosos Bifásicos. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008. 21 p.
57. CARDOSO, G. B. Desenvolvimento de novos sistemas aquosos bifásicos compostos por acetonitrila para extração de vanilina. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processo - PEP da Universidade de Tiradentes, Aracaju - SE, 2013. 9 p
58. NAMEROFF, T. J; GARANT, R. J; ALBERT, M. B. Adoption of green chemistry: an analysis based on US patents. *Res. Policy*, **33**, 959-974, 2004.
59. LENARDÃO, E. J; FREITAG, R. A; DABDOUB, M. J; BATISTA, A. C. F; SILVEIRA, C. C. “Green Chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades do ensino e pesquisa. *Quim. Nova*, **26**, 123-129, 2003.
60. RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S. Aqueous two-phase extraction – an environmentally benign technique. *Clean Tech. Environ. Policy* , **5** , 136-141, 2003.
61. FILHO, E. S. M. Sistemas aquosos bifásicos : Uma alternativa para purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos. *Ciência & Tecnologia*, **1**, 33-41, 2010.

62. VIRTUOSO, L. S; SILVA, L. M. S; MALAQUIAS, B. S; VELLO, K. A. S. F; CINDRA, C. P. R; da SILVA, L. H. M; MESQUITA, A. F; da SILVA, M. C. H; CARVALHO, R. M. M. E. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperature. *J. Chem. Eng. Data*, **55**, 3847-3852, 2010.
63. ZHANG, S; LI, N; ZHENG, L; LI, Z; GAO, Y; YU, L. Aggregation behavior of pluronic triblock copolymer in 1-butyl-3-methylimidazolium type ionic liquids., *J Phys Chem B*, **112**, 10228-10233, 2008.
64. CHELUGET, E. L. Equilibrium in aqueous liquid-liquid salts systems. Thesis of doctor of philosophy. Department of Chemical Engineering McGill University Montreal, Canada, 1993.
65. VIRTUOSO, L. S; VELLO, K. A.S.F; OLIVEIRA, A. A; JUNQUEIRA, C. M; MESQUITA, A. F; LEMES, N. H. T; CARVALHO, R. M. M; da SILVA, M. C. H; da SILVA, L. H. M. Measurement and modeling of phase equilibrium in aqueous two-phase systems: L35 + sodium citrate + water, L35 + sodium tartrate + water, and L35 + sodium hydrogen sulfite + water at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data*. **57**, 462-468, 2012.
66. 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 systems: new strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. *Separation and Purification Technology*, **116**, 154-161, 2013.
67. NASCIMENTO, K. S. Estudo do equilíbrio líquido-líquido dos sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros triblocos e sais de fosfato. Tese de mestrado. Programa de pós graduação em Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003.
68. ROGRIGUES, G. D; da SILVA, M. C. H; da SILVA, L. H. M; PAGGIOLI, F. J; MINIM, L. A; COIMBRA, J. S. R. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. *Separation and Purification Technology*, **62**, 687-693, 2008.
69. CARVALHO, C. P; COIMBRA, J. S. R; COSTA, I. A. F; MINIM, L. A; da SILVA, L. H. M; MAFFIA, M. C. Equilibrium data for PEG 4000 + salt + water systems from (278,15 to 318,15) K. *J. Chem. Eng. Data*. **52**, 351-356, 2007.

70. SADEGHI, R. A modified segment-based nonrandom two-liquid model for the calculation of vapor-liquid equilibrium of aqueous polymer-salt solutions. *Chemical Engineering Science*, **61**, 7786-7794, 2006.
71. 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 Equilibria*, **181**, 950-112, 2001.
72. MACHADO, F. L. C; COIMBRA, J. S. R; ZUNIGA, A. D. G; COSTA, A. R; MARTINS, J. P. Equilibrium Data of Aqueous Two-Phase Systems Composed of Poly(ethylene glycol) and Maltodextrin. *J. Chem. Eng. Data*, **57**, 1984-1990, 2012.
73. ALVARENGA, B. G; VIRTUOSO, L. S.; LEMES, N. H. T; da SILVA, L. A; MESQUITA, A. F; NASCIMENTO, K. S; da SILVA, M. C. H; da SILVA, L. H. M. J. Measurement and Correlation of the Phase Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Composed of Polyethylene(glycol) 1500 or 4000 + Sodium Sulfite + Water at Different Temperatures *Chem. Eng. Data*, **59**, 382-390, 2014.
74. GUAN, Y; TREFFRY, T. E; LILLEY, T. H. Application of statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems. *J. Chrom. A*, **668**, 31-45, 1994.
75. ZAFARANI-MOATTAR, M. T; JAFARI, P. Phase diagrams for liquid-liquid and liquid-solid equilibrium of the ternary polyethylene glycol + di-sodium hydrogen citrate + water system. *Fluid Phase Equilibria*, **337**, 224-233, 2013.

7. ANEXOS

7.1 Curvas analíticas

A Figura 1A abaixo refere-se à curva analítica construída para a quantificação do sais de fosfato nas fases de cada sistema.

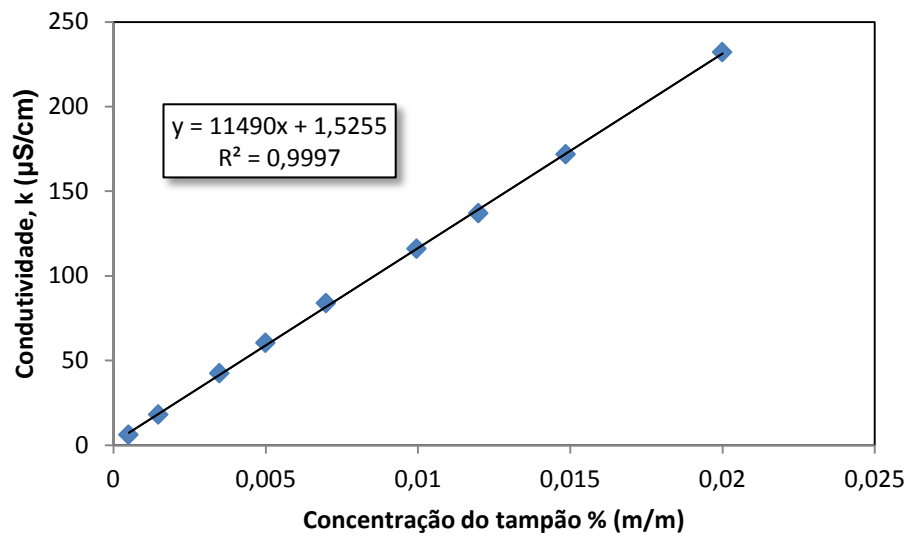


Figura 1A : Curva analítica dos $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7 pelo método de condutivimetria.

Para a quantificação dos polímero, também foram construídas curvas analíticas para cada PEG (Figuras 2A, 3A e 4A) pelo método de índice de refração.

Nesses três últimos gráficos foi descontado o valor do índice de refração da água à 25°C que é 1,3325.

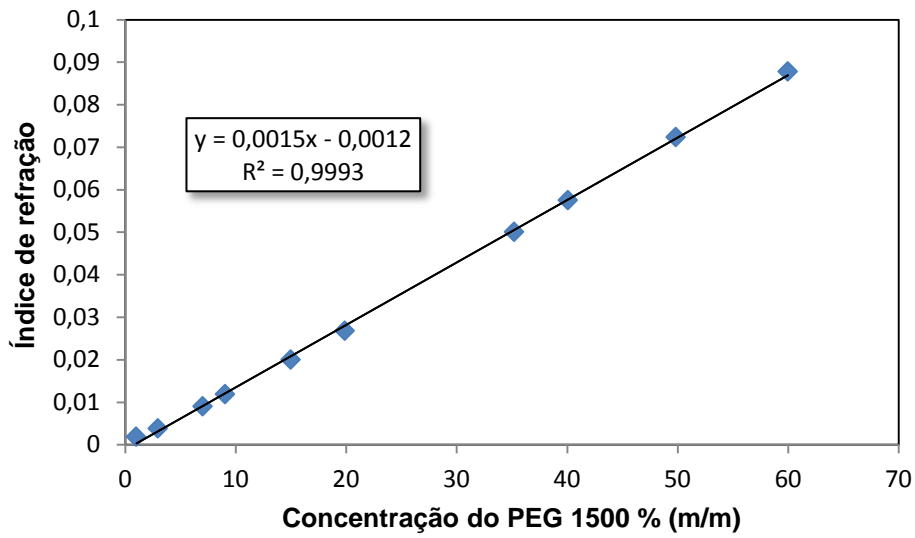


Figura 2A : Curva analítica construída para o PEG 1500 à 25°C.

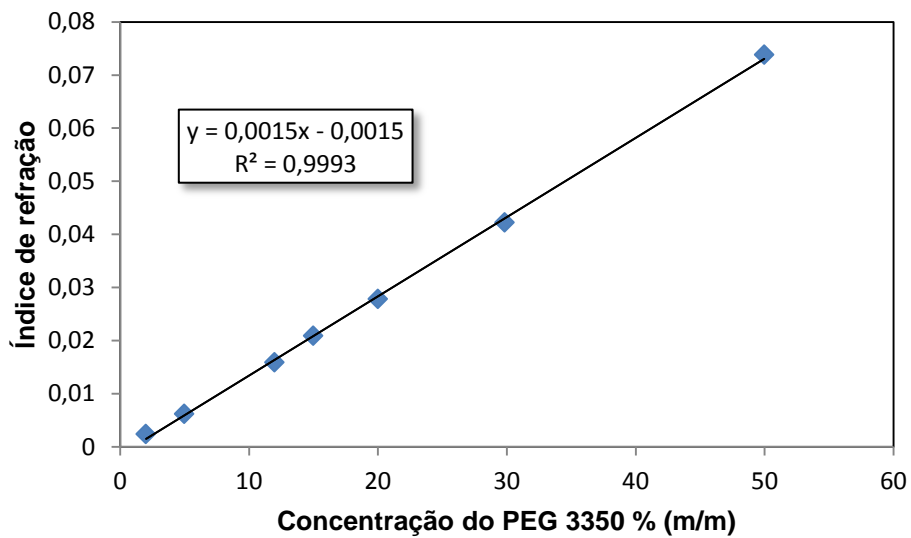


Figura 3A : Curva analítica construída para o PEG 3350 à 25°C.

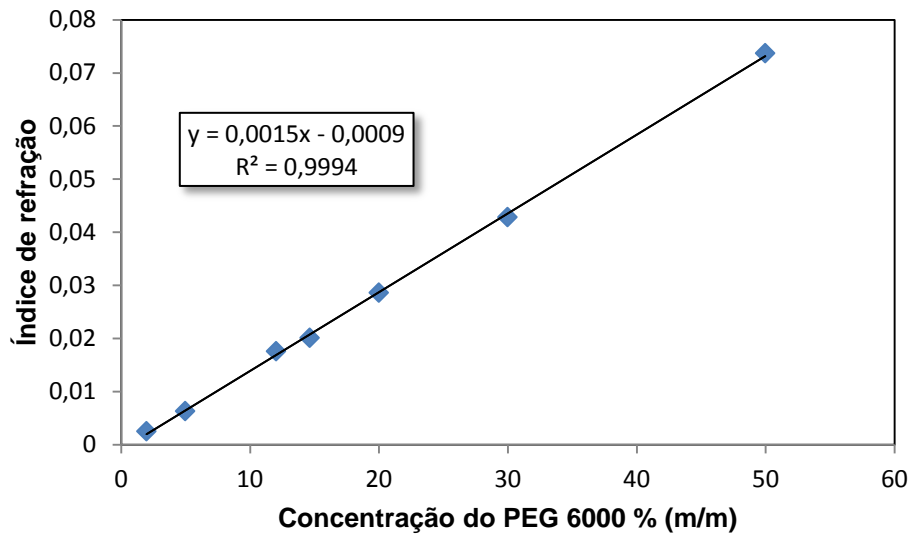


Figura 4A : Curva analítica construída para o PEG 6000 à 25°C

7.2 Proposta de um mecanismo para a formação dos SABs

De acordo com Silva (2000)²³ a adição de um sal a uma solução de polímero, ocorre a interação entre o cátion e a macromolécula (Figura 5A), fazendo com que moléculas de água, antes solvatando os íons e as unidades EO, sejam liberadas e conseqüentemente, aumentando a entropia do sistema, contribuindo para um sistema homogêneo.

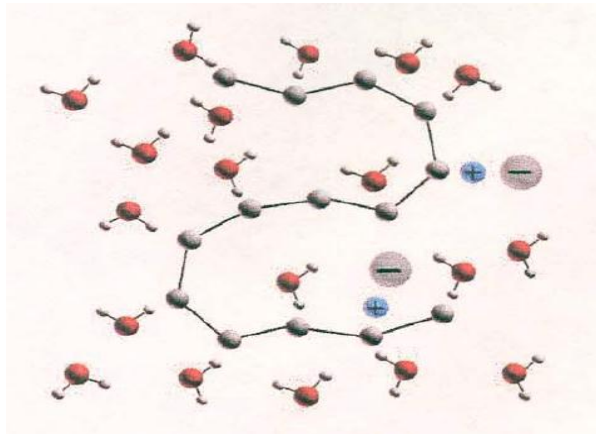


Figura 5A: Representação da interação íon-PEG

A medida que mais eletrólito é adicionado o processo de interação PEG-íon continua (Figura 6A). A entropia da mistura PEG e íon é maior do que se na mesma solução não houvesse interação.

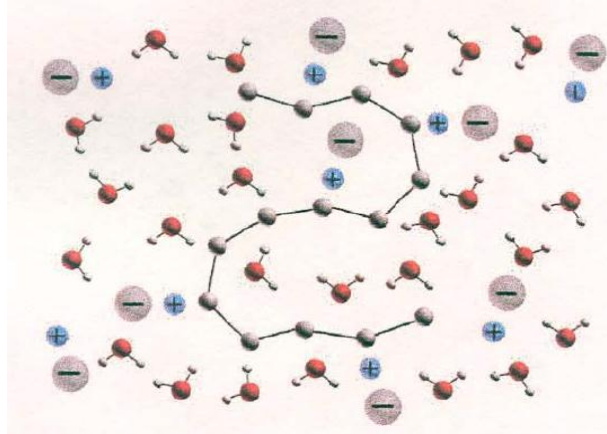


Figura 6A: Interação PEG-íon onde há maior número de íons interagindo com a macromolécula

Se um maior número de moléculas de água é liberada devido a essas interações, há um aumento na entropia do sistema. Esta interação não ocorrerá excessivamente, pois com uma densidade máxima de cargas elétricas ao longo da cadeia, haverá o aparecimento de forças repulsivas de curto alcance, que desestabiliza o sistema. É aí que ocorre o ponto de saturação, não necessariamente físico (espacial) mas preferencialmente energético (aumenta-se muito a energia do micro-sistemas PEG-íon).

A Figura 7A tenta expressar essa ideia evidenciando a existência de sítios espacialmente livres, mas energeticamente impedidos de serem ocupados. Neste caso, a adição de mais eletrólito leva seus íons a se concentrarem em regiões distantes da cadeia polimérica, reagrupando as moléculas de água ao seu redor e diminuindo o ganho entrópico.

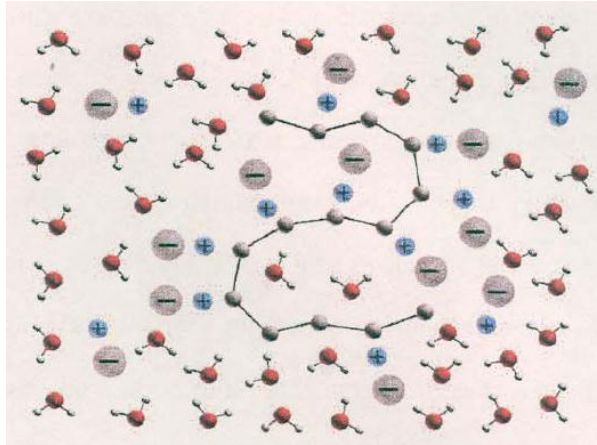


Figura 7A: Interação PEG-íon onde não pode mais ocorrer interação (saturação)

Como o aumento da entropia se torna energeticamente inviável, o sistema não consegue se manter homogêneo e nem minimizar a energia livre. Essa é a situação de instabilidade termodinâmica do sistema, o qual busca um novo estado em que a energia livre seja menor. O que será possível apenas com a formação de duas fases. Com essa nova formação, o polímero se concentra em uma fase e o sal em outra, aumentando a interação polímero-polímero e sal-sal.