



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR
LÍQUIDO IÔNICO, PEG E ÁGUA E APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO DE α -AMILASE

OLGA REINERT RAMOS GANDOLFI

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL

2016

OLGA REINERT RAMOS GANDOLFI

**CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR
LÍQUIDO IÔNICO, PEG E ÁGUA E APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO DE α -AMILASE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de mestre.

Orientador (a): DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Co-orientadores: DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

DSc. Cristiane Martins Veloso.

**ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL**

2016

661.807
G187c

Gandolfi, Olga Reinert Ramos

Caracterização de sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, PEG e água e aplicação na partição de α -amilase. / Olga Reinert Ramos Gandolfi. - Itapetinga: UESB, 2016.

93p.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de mestre. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e co-orientação do Prof. D.Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e Prof^a. D.Sc. Cristiane Martins Veloso.

1. Extração líquido-líquido. 2. Diagrama de fases. 3. Fração mássica - Temperatura. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. IV. Veloso, Cristiane Martins. V. Título.

CDD(21): 661.807

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Extração líquido-líquido
2. Diagrama de fases
3. Fração mássica - Temperatura



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR LÍQUIDO IÔNICO, PEG E ÁGUA E APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO DE α -AMILASE.

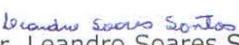
Autor (a): OLGA REINERT RAMOS GANDOLFI

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

Co-orientador (a): Prof.^o Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan
Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.


Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo (UESB)


Prof.^o Dr. Leandro Soares Santos (UESB)


Prof.^o Dr. Bernardo de Sá Costa (UFF)

Itapetinga-BA, 25 de fevereiro de 2016.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

À Deus
Aos meus pais
Aos meus irmãos
À Gabriel

Dedico!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela sua ajuda e proteção, por me ter concedido força, paciência e coragem nos momentos mais difíceis e por me guiar à conclusão de mais uma preciosa etapa em minha vida.

Aos meus pais Estefano e Kátia, por todas as oportunidades que me foram dadas, por sempre me incentivar a estudar, pelos ensinamentos e valores que fizeram de mim o que sou hoje e pelo apoio incondicional em todas as etapas em minha vida. Amo vocês!

Aos meus irmãos Karine, Tamille e Jorge, por compartilharem momentos inesquecíveis e pelas experiências divididas.

Ao meu sobrinho Daniel, por mostrar que pequenos momentos fazem a diferença.

Ao meu namorado Gabriel, pelo amor, carinho e companheirismo demonstrado ao longo desta conquista, por estar sempre comigo, me dando força e participando intensamente dos momentos mais difíceis e felizes. Te Amo!

À Universidade Estadual da Bahia (UESB) pela oportunidade e condições de realização do trabalho e pela experiência acadêmica.

À Renata Bonomo, pela excelente orientação, pelos valiosos conhecimentos compartilhados, além de sua disponibilidade e atenção nos momentos de dúvidas e pela amizade.

Aos co-orientadores Rafael Fontan e Cristiane Veloso, pelas sugestões, apoio e incentivo para a realização do trabalho.

Aos membros da banca Leandro Soares e Bernardo de Sá por aceitarem fazer parte da avaliação deste trabalho.

À toda minha família, tios, tias, primos, primas, em especial à Lita (in memoriam) pelo carinho, amor e ensinamentos que vão ficar para sempre na memória e a Ben-Hur e Graziely, sempre presente no meu dia-a-dia.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Processo, por tornar os dias mais felizes, em especial a Gabriel, Juliana, Raquel, Carilan e Mylena.

Aos amigos conquistados durante a graduação em especial ao pessoal do 282 pela convivência e amizade.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESB) pela bolsa concedida.

A todos que por ventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!

RESUMO

GANDOLFI, O. R. R. **Caracterização de sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, PEG e água e aplicação na partição de α -amilase.** Itapetinga – BA: UESB, 2016. 93p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).*

A procura crescente por métodos seguros e eficazes para a separação de materiais biológicos combinando as propriedades vantajosas do polietileno glicol (PEG) e líquido iônico (LI), levou à aplicações atraentes e promissoras dos novos sistemas aquosos bifásicos. Diante do exposto, foram determinados dados de equilíbrio de sistemas compostos por cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio + PEG ($1500\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ou $4000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + água nas temperaturas de (293,15, 303,15, 313,15 e 323,15) K, além das propriedades termofísicas do cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio e dos PEGs em função da fração mássica e temperaturas. Foi realizada também a partição da amilase na forma pura nos sistemas compostos por LI-PEG, avaliando a atividade amilásica e conteúdo proteico. A densidade, índice de refração e a condutividade elétrica, foram determinadas experimentalmente e as demais propriedades (volume específico aparente, coeficiente de expansão térmica e volume molar de excesso) obtidas por correlações matemáticas. Os dados de equilíbrio foram determinados utilizando o método turbidimétrico. A densidade e o índice de refração das misturas binárias aumentaram com a elevação da fração mássica dos constituintes e diminuíram com a elevação da temperatura, enquanto que o volume específico aparente apresentou comportamento contrário. A condutividade elétrica apresentou um comportamento polinomial quadrática com o aumento da fração mássica dos polímeros e polinomial linear para o LI. Modelos representando efeitos combinados entre a temperatura e fração mássica dos constituintes foram ajustados e apresentaram bom ajuste. O coeficiente de expansão térmica das soluções aquosas aumentou com a elevação da temperatura e fração mássica dos constituintes. Foram observados também valores negativos para o volume molar de excesso para misturas binárias do LI e água. Foi verificado que a diminuição da temperatura e o aumento da massa molar dos PEGs favorecem a formação de duas fases. Por fim, foi observado que a α -amilase teve preferência pela fase inferior composta por PEG nos sistemas compostos por PEG + LI e que os sistemas constituídos por PEG 1500 apresentaram melhores resultados. Os resultados encontrados sugerem que tal sistema pode ser utilizado para a separação de biomoléculas, como as α -amilase.

Palavras-chave: extração líquido-líquido, diagrama de fases, temperatura, fração mássica

* Orientador (a): Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB. Co-orientadores: Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB; Cristiane Martins Veloso, DSc., UESB.

ABSTRACT

GANDOLFI, O. R. R. **Characterization of aqueous two-phase systems composed per ionic liquid, PEG and water and application in the partition α -amylase.** Itapetinga – BA: UESB, 2015. 93 p. (Dissertation – Master's in Engineering and Food Science).*

The growing demand for safe and effective procedures for the separation of biological materials combined the advantageous properties of polyethylene glycol (PEG) and ionic liquid (IL), led to promising and attractive applications of the new aqueous two-phase systems. Thus, were determined equilibrium data in systems composed per 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride + polyethylene glycol (1500 g.mol⁻¹ ou 4000 g.mol⁻¹) + water at the temperatures (293,15, 303,15, 313,15 e 323,15) K, besides the thermophysical properties of the individual componentes in function of the mass fraction and temperature. Was carried also out the partition of amylase in pure form in systems composed of LI-PEG, assessing the amylase activity and protein content. The specific mass, refractive index and electrical conductivity were determined experimentally and other properties (specific volume apparent, thermal expansion coefficient and excess molar volume) obtained by mathematical correlation. The equilibrium data were determined by using the turbidimetric method. The density and the refractive index of the binary mixtures increased with increasing of mass fraction of the components and decreased with increasing temperature, while the apparent specific volume presented opposite behavior. The conductivity showed a quadratic polynomial behavior with increasing mass fraction of polymers and linear polynomial for the LI. Models representing the combined effects of temperature and mass fraction of the components were adjusted and showed good fit. The thermal expansion coefficient of aqueous solutions increased with increasing of temperature and mass fraction of the constituents. It was also observed negative values for the molar volume of excess to binary mixtures of LI and water. It was found that decreasing temperature and increasing the molecular weight of PEGs favor the formation of two phases. The results found suggest that such system can be used for separation of biomolecules, such as α -amylase.

Keywords: liquid-liquid extraction, phase diagram, temperature, mass fraction

* Advisor(a): Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB. Co-advisors: Rafael da Costa Ilheu Fontan, DSc., UESB; Cristiane Martins Veloso, DSc., UESB.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Enzimas aminolíticas.....	19
2.1.1. Tipos de amilases	19
2.1.2. Aplicação das amilases na indústria	20
2.2. Extração líquido-líquido.....	20
2.3. Sistemas aquosos bifásicos.....	21
2.3.1. Tipos de sistemas aquosos bifásicos.....	22
2.3.2. Coeficiente de partição	24
2.3.3. Diagramas de equilíbrio de fases.....	25
2.3.4. Fatores que afetam o equilíbrio de fase em SAB's	27
2.3.4.1. Efeito da temperatura.....	27
2.3.4.2. Efeito da massa molar do polímero	27
2.3.5. Propriedades termofísicas.....	28
2.3.5.1. Densidade	28
2.3.5.2. Índice de refração	28
2.3.5.3. Condutividade elétrica.....	29
2.3.5.4. Volume específico aparente.....	29
2.3.5.5. Coeficiente de expansão térmica	29
2.3.5.6. Volume molar de excesso.....	29
2.3.6. Aplicação dos sistemas aquosos bifásicos na separação de enzimas	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos	32
4. REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 2	44
RESUMO	45
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1. Material.....	46
2.2. Métodos	47

2.2.1. Preparo de soluções	47
2.2.2. Massa específica	47
2.2.3. Índice de refração	47
2.2.4. Condutividade elétrica	47
2.2.5. Volume específico aparente	48
2.2.6. Coeficiente de expansão térmica	48
2.2.7. Volume molar de excesso.....	48
2.2.8. Análise estatística	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1. Massa específica, índice de refração, condutividade elétrica e volume específico aparente das misturas binárias.....	49
3.2. Coeficiente de Expansão Térmica	52
3.3. Volume molar de excesso.....	54
4. CONCLUSÃO.....	54
5. REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO 3.....	58
RESUMO	59
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1. Material.....	60
2.2. Método.....	60
2.2.1. Preparo de soluções	60
2.2.2. Preparo dos sistemas.....	61
2.2.3. Massa específica, índice de refração, condutividade elétrica, volume específico aparente e coeficiente de expansão térmica	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1. Massa específica, índice de refração, condutividade elétrica e volume específico aparente	63
3.2. Efeito combinado da concentração e temperatura	68
3.3. Coeficiente de Expansão Térmica	69
3.4. Caracterização das fases	70
4. Conclusão	72
5. Referências	72

CAPÍTULO 4	76
RESUMO	77
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1. Material.....	78
2.2. Métodos	78
2.2.1. Preparo das soluções.....	78
2.2.2. Determinação das curvas binodais	79
2.2.3.Determinação das linhas de amarração	79
2.2.4. Quantificação dos Componentes do Sistema	80
2.3. Partição das amilases em SAB's	81
2.3.1. Determinação da atividade enzimática.....	81
2.3.2. Determinação do teor de Proteína	82
2.3.3. Determinação dos parâmetros de partição.....	82
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.1. Diagramas de Equilíbrio.....	83
3.2. Partição da α -amilase.....	88
4. CONCLUSÃO.....	89
5. REFERÊNCIAS	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.....26

CAPÍTULO 2

Figura 1. Volume Molar de Excesso (V_m^E) das soluções aquosas do ([C₂min]Cl) como função da fração mássica em diferentes temperaturas, T/K: ●, 293,15; ○, 303,15; ▼, 313,15; Δ, 323,15.....54

CAPÍTULO 4

Figura 1. Diagrama de fases do sistema PEG + ([C₂min]Cl) + água, para o PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b), em diferentes temperaturas.....83

Figura 2. Diagrama de fases do sistema PEG + ([C₂min]Cl) + água, a 293,15 K (a), 303,15 K (b), 313,15 K (c) e 323,15 K (d), em diferentes massas molares do polímero.....84

Figura 3. Dados de equilíbrio do sistema composto por PEG 1500 + ([C₂min]Cl) + água, nas temperaturas (a) 303,15 K, (b) 313,15 K e (c) 323,15 K.....87

Figura 4. Dados de equilíbrio do sistema composto por PEG 4000 + ([C₂min]Cl) + água, nas temperaturas (a) 303,15 K e (b) 313,15 K.....88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Exemplos de componentes e tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos.....23

Tabela 2. SAB's utilizados na separação de biomoléculas.....31

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$) das misturas binárias de água + ([C₂mim]Cl) em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.....49

Tabela 2. Parâmetros ajustados do modelo linear (eq. 4) para massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$) para soluções aquosas do ([C₂mim]Cl) em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.....52

Tabela 3: Coeficiente de expansão térmica das misturas binárias de água + ([C₂mim]Cl) em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.....53

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Composições globais para os sistemas formados por LI + PEG + água, expressas em percentagem mássica (%w/w).....61

Tabela 2. Massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$) das misturas binárias do PEG 1500 + água e do PEG 4000 + água em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas65

Tabela 3. Parâmetros ajustados do modelo linear (eq. 3) para massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$) das soluções aquosas do PEG 1500 e do PEG 4000 em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.....68

Tabela 4. Coeficiente de expansão térmica das misturas binárias de água + ([C₂mim]Cl) em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.....69

Tabela 5. Massa específica, índice de refração e condutividade elétrica para sistemas compostos por PEG 1500 + ([C₂mim]Cl) + água em diferentes temperaturas.....71

Tabela 6. Massa específica, índice de refração e condutividade elétrica para sistemas compostos por PEG 4000 + ([C₂mim]Cl) + água em diferentes temperaturas.....71

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Composições globais para os sistemas aquosos bifásicos utilizados para partição da α -amilase, expressas em porcentagem mássica (% w/w)	81
Tabela 2. Parâmetros a, b, c, e d e o coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o sistemas PEG-LI pela equação de Hu et al. (2003).	85
Tabela 3. Dados das linhas de amarração e fração mássica dos sistemas formados por LI (W_1) + PEG 1500 (W_2) + água, em diferentes temperaturas.....	86
Tabela 4. Dados das linhas de amarração e fração mássica dos sistemas formados por LI (W_1) + PEG 4000 (W_2) + água, em diferentes temperaturas.....	86
Tabela 5. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e), seletividade (S) e recuperação teórica (%Y) nos sistemas formados por (([C2min]Cl) + PEG (1500 ou 4000) + água.....	88

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

REFERENCIAL TEÓRICO

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

As amilases constituem um importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas, podendo ser encontradas em animais, plantas e microrganismos (MENDU et al., 2005; MICHELIN et al., 2010; SAHNOUN et al., 2012; SINGH e KAYASTHA, 2014). Porém, devido ao menor tempo de produção, as de origem microbiana são predominantes no setor industrial. As amilases agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido, atuando na digestão (amilases salivar e pancreática), na germinação de grãos e no crescimento microbiano (KUMARI et al., 2010). Em virtude dessas características, tais biomoléculas apresentam vasta gama de aplicações no setor industrial, como na fabricação de cerveja, fermento, têxtil e detergente (MICHELIN et al., 2010). Devido a estas características, o interesse na purificação das mesmas vem apresentando grande potencial.

O processo de purificação para a produção de enzimas/proteínas puras, geralmente, constitui uma porcentagem importante do custo total de produção, especialmente quando se deseja alto grau de pureza. A maioria das enzimas são purificadas por técnicas cromatográficas após isolamento por precipitação e separação por membranas que apresentam alto custo. Neste contexto, a necessidade de purificação de proteínas em larga escala de maneira eficaz e de baixo custo resultou na evolução de técnicas que proporcionam protocolos rápidos, eficiente e econômicos com menor número de etapas de processamento (AMRITKAR, KAMAT, e LALI, 2004).

Uma alternativa para a separação e purificação dessas enzimas sem interferir em sua atividade, com boa viabilidade econômica é a utilização de sistemas aquosos bifásicos (SAB's). Esta técnica é amplamente utilizada na purificação de biomoléculas, onde as suas vantagens incluem seletividade favorável, baixo custo e adaptabilidade para o processamento contínuo da amostra e retenção da atividade biológica. Os SAB's são constituídos por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis, com diferentes composições. Desta forma, o composto de interesse distribui-se entre as duas fases, dependendo da sua afinidade relativa por cada uma das fases individuais (KRONER et al., 1978; SELBER et al, 2001).

Entretanto, ao se fazer um estudo da partição de enzimas utilizando os sistemas aquosos bifásicos é necessário conhecer os dados de equilíbrio nas condições experimentais utilizadas. Para cada sistema existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases. Alguns já estão disponíveis na literatura, porém, é importante ao testar um novo sistema que se construa um diagrama nas condições experimentais a serem utilizadas na extração (temperatura, pressão, pH, massa molar do polímero, concentração dos constituintes do sistema, tipo de sal, entre outros).

Os processos de purificação da amilase utilizando sistemas aquosos bifásicos ainda são pouco documentados na literatura. Diante disso, esse trabalho tem como proposta obter dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol e líquido iônico e avaliar a partição da amilase nestes sistemas, além das propriedades termofísicas do cloreto de 1-etil-3metil-imidazólio e dos PEGs em função da fração mássica e temperaturas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enzimas aminolíticas

As amilases constituem um conjunto de enzimas vastamente distribuídas na natureza. Estas agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido, atuam na digestão (tais como as amilases salivar e pancreática), na germinação de grãos e no crescimento microbiano (KUMARI et al., 2010). Existem diversos tipos de amilases e elas são utilizadas em vários tipos de indústrias como a de papel, têxtil, panificação, álcool, bebidas, entre outras.

As α -amilases podem ser encontradas em animais, plantas e microrganismos (SAHNOUN et al., 2012). As β -amilases são abundantemente encontradas em plantas, especialmente em trigo, soja, batata doce e algumas culturas de microrganismos (*Bacillus polymyxa*, *B. cereus* e *B. megaterium*) (HIZUKURI, 1996). A massa molar da α -amilase varia de (10 a 210) kDa, dependendo da sua origem (SPIER, 2005).

2.1.1. Tipos de amilases

Conforme seu modo de ação, as amilases podem ser divididas em dois grandes grupos: as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α -1,4 de maneira aleatória no interior da molécula de amido. Sua ação resulta na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias. Por outro lado, as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em produtos finais pequenos (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LOPES, 1995; GUPTA et al., 2003). As principais amilases são: α -amilases, β -amilases e glicoamilases.

As α -amilases (EC 3.2.1.1, α -1,4-D-glicano glicanoidrolase), também chamadas de enzimas dextrinizantes, e pertencem ao grupo das endoamilases. Estas atuam ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando maltose, glicose e dextrina. A α -amilase é a enzima mais importante e popular entre as amilases de uso industrial e é induzida na presença de amido ou maltose (MICHELIN et al., 2010).

As β -amilases (EC 3.2.1.2, α -1,4-D-glicano-maltoidrolase) são exoamilases que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula de amilose, liberando maltose. Esse tipo de amilase está distribuído nos tecidos das plantas onde hidrolisa amido em β -maltose, sendo particularmente abundante em soja, trigo e cevada, principalmente durante a germinação (GUPTA et al., 2003).

As glicoamilases (EC 3.2.1.3, α -1,4-D-glicano-glicoidrolase) são exoamilases que rompem as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido, glicogênio e oligossacarídeos. Elas são capazes de

remover unidades de glicose apenas a partir da extremidade não redutora dos seus substratos (BAGHERI, KHODARAHMI e MOSTAFAIE, 2014).

2.1.2. Aplicação das amilases na indústria

As amilases são enzimas de grande importância biotecnológica, pois apresentam aplicações nas áreas de alimentos (sacarificação do amido), fermentação (cerveja), têxtil e de papéis (PANDEY et al., 2000). Embora estas enzimas possam ser obtidas de plantas, animais e microrganismos, as de origem microbiana são predominantes no setor industrial (GUPTA et al., 2003). Muitas espécies de bactérias e fungos têm sido identificadas como boas produtoras de amilase (CORONADO et al., 2000; YUGUO et al., 2000; JIN et al., 2001; STAMFORD et al., 2001).

O maior mercado de α -amilase está na produção de amido hidrolisado, obtendo-se glicose e frutose como produto final. Para a produção do xarope de milho com alto teor de frutose, o amido é convertido em glicose e depois em frutose pela ação da glicose isomerase. Devido ao seu alto poder adoçante, é utilizado em grande quantidade nas indústrias de bebidas, como por exemplo em refrigerantes (GUPTA et al., 2003).

As amilases têm ganhado um papel importante na conversão do amido em álcool utilizando-se, simultaneamente, a sacarificação e a fermentação (SINGH et al. 1995; KOBAYASHI et al. 1998). A aplicação das amilases na produção de etanol tem solucionado, em parte, os problemas que alguns países apresentam em função da escassez de reservas de combustível. Nesse processo, glucoamilases e α -amilases de *A. niger* são adicionadas em meio fermentativo contendo células de *Saccharomyces cerevisiae*. O amido presente no meio fermentativo é convertido, através da ação conjunta das amilases, em glicose que posteriormente é convertida por fermentação em etanol (RAJOKA et al., 2004).

2.2. Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (ELL) é uma operação unitária empregada para separar componentes em solução por meio de transferência de massa de tais componentes entre dois solventes imiscíveis ou parcialmente miscíveis (SONIYA; MUTHURAMAN, 2015). Essa operação é utilizada pelas indústrias em processos de separação, concentração e purificação de compostos de interesse econômico (DA SILVA et al., 2006a) e apresenta muitas vantagens, tais como alto rendimento, alto grau de purificação, seletividade, combinação entre as etapas de recuperação e de purificação, além de ser uma tecnologia simples e de baixo custo (PASSOS et al., 2013), o que torna tal processo atrativo para separação. Entretanto, a ELL apresenta como desvantagem a utilização de solventes orgânicos que podem causar problemas ambientais e de

saúde, pois são tóxicos, inflamáveis e cancerígenos, além de não serem adequados para a separação de moléculas biológicas, que apresentam baixa solubilidade nestes sistemas (DA SILVA et al., 2006b; ASENJO; ANDREWS, 2011; MAGESTE et al., 2012).

Uma alternativa à ELL tradicional, compatível com os processos de bioseparação, são os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) (PASSOS et al., 2013). Devido a sua biocompatibilidade, a extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos têm sido empregada para separar, purificar e recuperar vários materiais biológicos tais como enzimas (VAIDYA et al., 2006; YUE; YUAN; WANG, 2007; SHAHRIARI, et al., 2010), proteínas (DALLORA et al., 2007; SOUZA et al., 2009; ALCÂNTARA et al., 2014), ácidos nucleicos (GOMES et al., 2009) e anticorpos (AZEVEDO, et al., 2009).

2.3. Sistemas aquosos bifásicos

Os sistemas aquosos bifásicos são misturas compostas majoritariamente por água, que sob determinadas condições de composição, temperatura e pressão apresentam duas fases em equilíbrio termodinâmico. Este sistema é conhecido desde o final do século XIX, quando Beijerinck percebeu a separação espontânea em duas fases líquidas límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina e ágar ou amido solúvel em determinadas faixas de temperatura e concentração. A fase inferior era enriquecida em ágar ou amido e a superior em gelatina, sendo a água o componente majoritário em ambas as fases (DA SILVA e LOH, 2006). Posteriormente, Ostwald e Hertel em 1929, continuaram os estudos sobre esses sistemas e verificaram que amidos provenientes de origens distintas (arroz, milho, etc), produziam diferentes diagramas de fase. Essa descoberta permitiu concluir que pequenas variações nas interações intermoleculares promovem mudanças nas composições das fases em equilíbrio. Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 40, estudaram a miscibilidade de diversos pares de polímeros, dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Estes autores constataram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, e puderam concluir que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno geral (DIAMOND e HSU, 1992; DA SILVA e LOH, 2006).

Após trabalho de Albertsson no final da década de 1950, os SAB's começaram a receber maior atenção, ficando evidente para a comunidade científica a potencialidade de aplicação destes sistemas para utilização em processos de bioseparação. Desde então, as pesquisas nesta área têm se aprofundado, tornando a utilização dos SABs uma ferramenta na purificação e/ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, corantes (MAGESTE et al., 2012), enzimas (SHAHRIARI et al., 2010), proteínas (HAGHTALAB et al., 2005), ácido

nucleicos (EVERBERG et al., 2006), íons (DA SILVA; et al., 2006), peptídeos (SOUZA JR et al., 2014), entre outros.

Os SABs são formados pela mistura de determinados polímeros e polieletrólitos ou ainda, polímeros em combinação com solutos de baixa massa molar em uma mesma solução, que formam duas fases acima de certas concentrações. Em todos os casos, duas fases líquidas que se encontram em equilíbrio termodinâmico, são formadas (GARZA-MADRID et al., 2010; VENTURA et al., 2011). As fases são regiões que apresentam valores de propriedades termodinâmicas intensivas, como índice de refração, composição e densidade, diferentes. Mas, quando as duas fases do SAB's estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica varia em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. Essas fases são separadas por uma interface, que é uma região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO et al., 2007).

A formação de duas fases dependerá do tipo e quantidade das interações intermoleculares entre os constituintes formadores do sistema expressas em termos da energia livre. Serão também estas mesmas interações as responsáveis por todas as propriedades físico-químicas presentes nas duas fases, como por exemplo, a distribuição dos diferentes componentes no sistema, a relação de volumes entre as fases, a diferença de potencial elétrico, o excesso de energia livre associados à interface e o coeficiente de partição de um soluto específico, entre outros (DA SILVA e LOH, 2006).

2.3.1. Tipos de sistemas aquosos bifásicos

Os SAB's, podem ser obtidos pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros, de um polímero e um sal (orgânico ou inorgânico), de um solvente orgânico e um sal e mais recentemente pela mistura de líquidos iônicos e sais inorgânicos (Tabela 1).

O sistema polímero-polímero mais comum é composto por PEG e dextrana, entretanto, a dextrana apresenta custo elevado, o que inviabiliza o seu uso em escala industrial. A água misturada com polímeros atua como o principal solvente e pode estabelecer ligações não-covalentes com eles. Estas interações aumentam com a massa molar dos polímeros e a separação de fases pode ocorrer em concentrações muito baixas de polímero (WALTER et al., 1985; BASKIR et al., 1989). Por outro lado, a presença de um sal inorgânico em concentrações críticas em um sistema único polímero-água também pode levar à formação de duas fases aquosas distintas (SALABAT, 2001).

Tabela 1. Exemplos de componentes e tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos

Tipo de Sistema	Constituintes	Referência
Polímero – polímero	PEG/Dextrana	Gündüz; Korkmas, 2000
	PEG/PVA	Pessoa Júnior; Kilikian, 2005
Polímero – Sal	PEG/Sais de fosfato	Souza Jr. et al., 2014
	PEG/Tartarato de sódio	Mageste et al., 2009
Solvente orgânico – Sal inorgânico	Álcool/Citrato de Sódio	Ooi et al., 2009
	Álcool/Sais de Potássio	Reis et al., 2014
Líquido iônico - Sal inorgânico	[C4mim]Cl/Fosfato de Potássio	Louros et al., 2010
	[C7mim]Cl/Fosfato de Potássio	Ventura et al., 2011
Líquido iônico – Carboidratos	[C4mim]Cl/D-maltitol	Freire et al., 2011
Líquido iônico – PEG	[C4mim]Cl/PEG	Freire et al., 2012 ^a

O polietileno glicol é um dos principais polímeros sintéticos utilizados industrialmente, sendo um composto básico para produção de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes (MURRAY; JENKINS, 1994). Este polímero é formado por unidades de oxido de etileno, em que cada unidade contém sítios ativos (oxigênios portadores de pares de elétrons livres), onde são formadas as interações com as moléculas de água, íons e outras substâncias. Em aplicações biotecnológicas, a utilização do PEG é de grande interesse, principalmente por excluir outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Outro fator importante é a sua alta biodegradabilidade e atoxicidade, sendo o seu descarte não problemático para o meio ambiente (SILVA, 2007). Estes fatores podem explicar a utilização do PEG na purificação de biomoléculas quando se emprega sistemas aquosos bifásicos.

Recentemente, SAB's contendo líquido iônico como um dos componentes tem sido investigados. Estes sistemas têm apresentado sucesso na purificação de diversos analitos, tais como alcaloides (LI et al., 2005), aminoácidos (ZAFARANI-MOATTAR; HAMZEHZEDH, 2011), proteínas (PEI et al., 2009), esteroides (ZHANG; DENG; CHEN, 2010), entre outros.

Os líquidos iônicos (LI's) são compostos iônicos que pertencem ao grupo de sais fundidos, os quais são formados por grandes cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos, que os possibilita permanecer líquidos a temperatura ambiente. A natureza iônica destes líquidos resulta em características interessantes tais como, pressão de vapor desprezível, não inflamabilidade, elevada estabilidade química e térmica, além de poderem ser facilmente reciclados. As baixas pressões de vapor desses sais têm possibilitado sua utilização em substituição aos solventes orgânicos voláteis (FRANÇA et al., 2009; FICKE; NOVARD;

BRENNECKE, 2010; MUHAMMAD et al., 2012). Além disso, o grande número de possíveis combinações entre os cátions e ânions permite a possibilidade de ajuste das propriedades dos líquidos iônicos, tais como, densidade, velocidade do som, índice de refração, viscosidade, miscibilidade conforme necessários para aplicações específicas (PLECHKOVA; SEDDON, 2008; BAHADUR et al., 2014).

A maioria dos LI's solúveis em água à temperatura ambiente são eletrólitos indutores de *salting-in* (geralmente conhecido como sais “caotrópicos”) que pode formar uma segunda fase aquosana presença de soluções aquosas de sais inorgânicos *salting-out* (sais “cosmotrópicos”), resultando na formação de SAB's (GUTOWSKI et al., 2003; NEVES et al., 2009). Em sistemas aquosos compostos de LI, sal inorgânico e água a força motriz para a separação de fases é a competição entre o LI e o sal inorgânico pelas moléculas de água. A maior afinidade do sal inorgânico pela água induz uma migração de água para longe dos íons de LI reduzindo a sua hidratação e reduzindo a solubilidade do LI em água (FREIRE et al., 2009; FREIRE et al., 2010).

Os sistemas contendo LI apresentam vantagem em relação ao sistema formado por sal inorgânico, pois os problemas de cristalização dos sais inorgânicos podem ser totalmente evitados (FREIRE et al., 2012a). Além disso, os sistemas polímero-polímero ou polímero-sal convencional exibem uma faixa limitada de polaridade. Os sistemas formados por polímeros normalmente apresentam duas fases hidrofóbicas e a diferença de polaridade depende essencialmente da quantidade de água em cada uma das fases. A faixa limitada de diferenças de polaridade entre as fases limita assim a aplicabilidade de SAB's convencionais à base de polímero para fins de extração e separação. Por outro lado, os sistemas formados por polímero-sal, geralmente, apresentam uma fase hidrofóbica constituída de polímero e uma fase altamente hidrofílica (e iônica), tipicamente formada por sais de elevada densidade de carga (FREIRE et al., 2012). No entanto, a substituição de um sal inorgânico de elevada densidade de carga e/ou polímero por LI pode fornecer controle da polaridade entre as fases pelo ajuste adequado da estrutura do LI, uma vez que estes podem ser escolhidos adequadamente tendo em conta a grande variedade das estruturas iônica (pelo menos 10^6 LI's podem ser facilmente preparados no laboratório) (PEREIRA et al., 2013).

2.3.2. Coeficiente de partição

Quando os compostos biológicos são adicionados nos SAB's, estes distribuem-se seletivamente entre as duas fases, sendo caracterizado pelo coeficiente de partição (K). O coeficiente de partição é definido como a razão entre a concentração da molécula de interesse

na fase superior e inferior, conforme apresentado na equação 1 (ALBERTSSON, 1986; SOUZA Jr. et al., 2014).

$$K = \frac{C_S}{C_I} \quad (1)$$

Onde: C_S e C_I são as concentrações do soluto na fase superior e inferior, respectivamente.

Essa distribuição depende tanto das características intrínsecas da molécula de interesse (massa molar, carga superficial e hidrofobicidade) quanto da natureza do SAB utilizado (constituintes, massa molar, concentração, pH e força iônica) (GIRALDO-ZUNIGA, 2001; CHAIWUT et al., 2010).

Os mecanismos que interferem na partição das biomoléculas não são entendidos por completo. De acordo com Johansson et al., (2008) e Dreyer et al., (2009) a partição das biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos pode ser descrita com base na repulsão entrópica, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, entre outras. As propriedades das fases também contribuem na partição das biomoléculas, como a natureza química, composição do SAB, presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica, pH, temperatura e densidade (CHAIWUT et al., 2010).

2.3.3. Diagramas de equilíbrio de fases

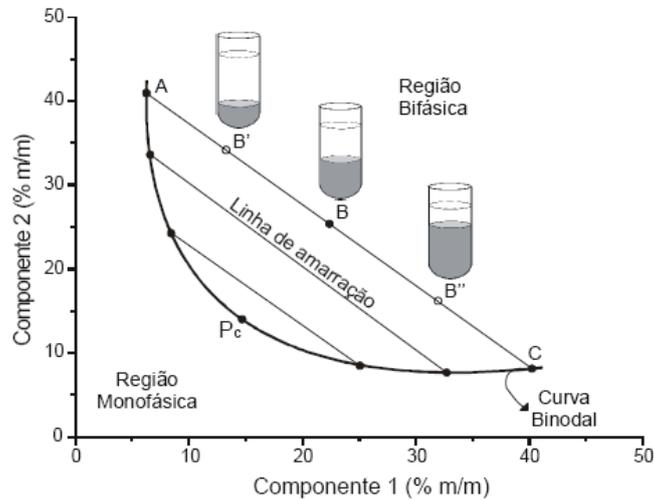
Para a utilização dos SAB's é necessário o conhecimento do comportamento das fases dos sistemas. Portanto, o ponto de partida para estudos de sistemas aquosos bifásicos é a determinação dos dados de equilíbrio que são representados por meio dos diagramas de equilíbrio de fases. Estes permitem a inferência sobre as condições nas quais o sistema apresente duas ou mais fases ou somente uma fase. Segundo KABIRI-BADR e CABEZAS JR (1996) estes diagramas tem grande importância para os estudos de separação de biomoléculas, visto que são usados como ferramenta básica de ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração. A Figura 1 apresenta um exemplo de diagrama de fases, mostrando a composição das fases em equilíbrio em coordenadas retangulares.

Nestes diagramas pode-se encontrar inúmeras informações, todas relacionadas a minimização da energia livre do sistema, como por exemplo as composições globais onde o sistema é monofásico ou bifásico demarcadas por uma curva denominada binodal (DA SILVA e LOH 2006).

No diagrama de fases são, também, representadas as linhas de amarração. Como exemplo, tem-se a linha de amarração formada pelos pontos ABC, na Figura 1, para uma determinada composição global do sistema (B), que fornece a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos A (fase superior) e C (fase inferior). Um

conjunto de pontos que se situa na região bifásica e que esteja em uma mesma linha de amarração (ex: B, B' e B'') fornece as fases que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.) e propriedades extensivas diferentes (massa, volume, etc.) (DA SILVA e LOH 2006).

Figura 1. Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.



Fonte: (CARVALHO, 2004).

Uma medida utilizada para caracterizar o sistema é o comprimento da linha de amarração (CLA), que liga os pontos das fases em equilíbrio no diagrama (PEI et al., 2009). O CLA é um parâmetro termodinâmico, geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição dos solutos em SAB's formados por diferentes componentes e é calculado pela equação 2 (DA SILVA; LOH, 2006).

$$CLA = \sqrt{[\Delta C_1]^2 + [\Delta C_2]^2} \quad (2)$$

Onde: $[\Delta C_1]$ e $[\Delta C_2]$ correspondem a diferença de concentração de componente 1 (C_1) e componente 2 (C_2) nas fases superior e inferior expressa em %m/m, respectivamente.

De acordo com Pei et al., (2009), a medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, elevando a eficiência na extração e/ou partição do soluto de interesse.

Outro parâmetro importante para caracterização dos SAB's é a inclinação da linha de amarração (ILA). Tal parâmetro fornece uma medida de como a composição das fases podem variar com mudanças das propriedades físico-químicas. O valor da ILA é obtido a partir da equação 3.

$$ILA = (C_{C2S} - C_{C2I}) / (C_{C1S} - C_{C1I}) \quad (3)$$

Onde, C_{1S} e C_{1I} são as concentrações do componente 1 na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto, C_{2S} e C_{2I} são as concentrações do componente 2 na fase superior e inferior, respectivamente.

Outra característica importante de um diagrama de fases é o ponto crítico (P_c). Nesse ponto, as propriedades físico-químicas (composição e volume, entre outras) das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1971). Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases são teoricamente iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1971).

2.3.4. Fatores que afetam o equilíbrio de fase em SAB's

No processo de separação de fases em sistemas aquosos bifásicos, a região bifásica é fortemente afetada por diversos fatores, como temperatura, massa molar do polímero, pH, tipo de eletrólito, entre outros. Nessa seção serão abordados os efeitos da temperatura e da massa molar do polímero, pois foram propriedades variadas no presente estudo.

2.3.4.1. Efeito da temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das duas fases em equilíbrio, bem como a alteração da estrutura da biomolécula. O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema (polímero-polímero, polímero-sal, líquido iônico-sal e líquido iônico-polímero, entre outros). Willauer et al., (2000) estudaram o sistema composto de PEG e dextrana e verificaram que maior concentração do polímero era requerida para separação de fases ao se aumentar a temperatura. Em sistemas compostos por LI-PEG foi verificado que o aumento da temperatura dificulta a separação de fases, diminuindo assim a área da região bifásica. O mesmo comportamento foi observado para sistemas composto por LI-sais inorgânicos e LI-carboidratos (TOMÉ et al., 2014). No entanto nos sistemas formados por polímero-sal inorgânico foi verificado que o aumento na temperatura facilita a separação de fases, consequentemente, provocando um aumento na região bifásica (AMARESH et al., 2008; REGUPATHI et al., 2009).

2.3.4.2. Efeito da massa molar do polímero

A influência do comprimento da cadeia polimérica nos diagramas de fase é evidente, quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração de sal (ou de outro constituinte do sistema) requerida para que ocorra a separação de fases. Freire et al., (2012a), estudaram as

interações que controlam o comportamento dos novos sistemas aquosos composto por polietilenoglicol e líquidos iônicos e verificaram que as capacidades do PEG em formar sistemas diminuem com a diminuição da massa molar do polímero. Resultados análogos também foram obtidos por Tubío et al. (2006), Oliveira et al. (2001) e Graber et al. (2002) para sistemas aquosos contendo polietilenoglicol e sais. Esse efeito ocorre em virtude da menor solubilidade dos polímeros com maior massa molar, o que facilita assim a separação de fases.

2.3.5. Propriedades termofísicas

Propriedades físicas, tais como densidade, viscosidade, índice de refração e condutividade elétrica são importantes na formação e no tipo de aplicação de um SAB. Soluções aquosas de PEG e de LI têm sido utilizados na engenharia química e bioquímica para separar e purificar produtos biológicos, biomateriais, proteínas e enzimas a partir de misturas complexas na qual eles são produzidos (ROBERTS; BENTLY; HARRIS, 2002; BEGUM et al., 2015).

2.3.5.1. Densidade

A densidade é uma propriedade termodinâmica intensiva, pois não depende da quantidade de massa presente no sistema e é definida pela equação 4:

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (4)$$

Onde: ρ é a densidade ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$); m é a massa (g) e v é o volume (cm^3).

Vários autores demonstraram que a aumento da temperatura contribui para a redução da densidade de sistemas com mais de um componente (TRIVEDI; BHANOT; PANDEY 2010; SIONGCO; LERON; LI, 2013).

Costa et al., (2014) determinaram a densidade de soluções aquosas de PEG 1500, nas frações mássicas de (0,05-0,25) e nas temperaturas (288-308) K e concluíram que conforme aumentaram a temperatura diminuía a densidade e aumentando a fração mássica aumentava a densidade.

2.3.5.2. Índice de refração

O conhecimento do índice de refração em soluções aquosas é importante em muitas aplicações, incluindo a identificação óptica das substâncias particulares, a verificação da pureza dos materiais e a medição da concentração de solutos em solução (KAREEM et al., 2010; HAYYAN et al., 2013).

GRABER et al. (2002) determinaram o índice de refração de uma mistura ternária composta por PEG+NaNO₃+água, nas temperaturas de (15 a 40) °C e concentrações de (3 a

24)% m/m para o NaNO_3 e PEG (massa molar 4000) e concluíram que conforme aumentavam as frações molares de PEG e de sal no sistema ocorria um aumento do índice de refração, sendo observado este comportamento em todas as temperaturas de trabalho.

2.3.5.3. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica de uma solução eletrolítica é a expressão numérica quantitativa da sua capacidade de transportar a corrente elétrica. Ela é definida como sendo o inverso da resistência elétrica de 1cm^3 do líquido a uma temperatura de 25°C . O transporte de cargas nas soluções eletrolíticas é realizado por íons, ou seja, todos os íons presentes na solução participam do transporte. Desta forma, pode-se dizer que a condutividade fornece uma informação global dos componentes da solução. Ácidos, bases e sais inorgânicos são bons condutores de corrente elétrica, ao passo que substâncias orgânicas, que não se dissociam em solução (polímeros, benzina, açúcares, por exemplo) não são condutores (SILVA 2005).

2.3.5.4. Volume específico aparente

O volume específico aparente de um soluto reflete não apenas o volume intrínseco da molécula do soluto, mas a extensão à qual eles interagem com o solvente. Além disso, quando o soluto é constituído por moléculas de cadeia flexíveis, o volume específico aparente limitante depende da extensão em que as moléculas são estendidos ou enrolados em solução (RUDANTASIC e KLOFUTAR, 2004).

2.3.5.5. Coeficiente de expansão térmica

O coeficiente de expansão térmica, também chamado de coeficiente de expansão volumétrica ou expansividade volumétrica indica a variação do volume provocada pela variação da temperatura, enquanto a pressão permanece constante (CUMICHEO et al., 2015).

2.3.5.6. Volume molar de excesso

Através da medição da massa específica, é possível obter medidas de propriedades volumétricas. Por sua vez, estas propriedades são complexas, não dependendo apenas do tamanho, forma e natureza química dos componentes de uma mistura (ABDULAGATOV et al., 2008; ABDULAGATOV et al., 2008a), mas também, sobre das interações entre soluto-soluto, solvente-solvente e soluto-solvente, e seus efeitos estruturais resultantes de acomodações intersticiais devido às diferenças de volume molar e volume livre entre os componentes da solução (LI; YE; ZENG, 2010).

A magnitude do volume molar em excesso V_m^E é resultado de diferentes efeitos, os quais podem ser enumerados em; (1) quebra da ordem da estrutura líquida no processo de mistura; (2) interações físicas envolvendo, principalmente, interações não específicas desfavoráveis entre os grupos; (3) efeitos estruturais advindos das acomodações intersticiais devido à diferenças no volume molar e no volume livre entre as moléculas dos componentes na mistura; e (4) interações químicas ou específicas, tais como, formação de complexo e ligações de hidrogênio entre as moléculas dos componentes presentes na mistura. Os efeitos 1 e 2 contribuem positivamente para o valor de V_m^E enquanto 3 e 4 contribuem para um valor negativo de V_m^E (PROLONGO; MASEGOSE; FUENTES, 1984; BAHADUR et al., 2015).

2.3.6. Aplicação dos sistemas aquosos bifásicos na separação de enzimas

Os SAB's vem sendo empregados com muito sucesso na separação de diversas biomoléculas, devido a manutenção da atividade biológica das mesmas. Encontram-se na literatura diversos trabalhos que evidenciam o seu potencial de aplicação e que auxiliam na identificação dos sistemas mais adequados para a separação de certas biomoléculas, como pode ser observado na tabela 2.

Porfiri et al., (2011) estudaram a aplicação de sistemas aquosos bifásicos do tipo PEG/sal na purificação da α -amilase, uma hidrolase amplamente distribuída em microrganismos, animais e plantas, que são aplicadas em vários setores industriais. A enzima foi particionada em sistemas aquosos bifásicos preparados com polietilenoglicol 2000, 4000, 6000 e 8000 e fosfato de potássio. No sistema de PEG 2000 a α -amilase se concentrou na fase superior, com alto coeficiente de partição, indicando interação significativa da enzima com o PEG. Nos sistemas formados com massa molar maior que 2000 a α -amilase se concentrou na fase inferior rica em sal. Tais resultados indicaram que a α -amilase pode ser isolada nos sistemas formados por PEG 2000 e PEG 8000 com fosfato de potássio, com elevada recuperação na fase superior e inferior, respectivamente.

Oliveira et al., (2003) particionaram hexoquinase em sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol 400, 1000 e 1500 e sal citrato. Eles verificaram que a hexoquinase teve preferência pela fase superior com altos valores do coeficiente de partição, sendo que o melhor resultado obtido utilizando 12% (m/m) de PEG 400 e 15% (m/m) de citrato em pH 8,5 a 25°C. Foi possível verificar que a enzima migrou preferencialmente para a fase superior, enquanto as proteínas contaminantes permaneceram na fase inferior.

Tabela 2. SAB's utilizados na separação de biomoléculas.

Enzima	SAB	Referência
α -amilase	PEG/Fosfato de Potássio	Porfiri et al., 2011
Hexoquinase	PEG/Citrato	Oliveira et al., 2003
β -amilase	PEG/Na ₂ SO ₄ /KH ₂ PO ₄	Shahriari et al., 2010
Bromelina	PEG/Fosfato de potássio	Badu et al., 2008
Proteinase	PEG/MgSO ₄	Klomklao et al., 2005
Lacase	PEG/fosfato de potássio	Zanella et al. 2002

Devido as características adequadas para purificação de materiais biológicos, diversas enzimas vêm sendo purificadas em SAB's, entre elas a amilase. Tal enzima é uma das principais na utilização industrial representando cerca de 30% deste mercado (ASOODEH et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinação de propriedades termofísicas de sistemas binário de água + líquido iônico e de água + PEG e dos dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, PEG e água e sua aplicação na partição de amilase.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar as propriedades termodinâmicas densidade, índice de refração e condutividade elétrica dos componentes formadores dos sistemas em função da temperatura e da fração mássica dos componentes e das fases dos sistemas;
- Obter dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos formado por cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio, PEG e água;
- Avaliar a partição da amilase nos sistemas aquosos bifásicos estudados e em outros sistemas da literatura.

4. REFERÊNCIAS

ABDULAGATOV, I. M. A.; TEKIN, J.; SAFAROV, A.; SHAHVERDIYEV, E.; HASSEL. High-pressure densities and derived volumetric properties (excess, apparent, and partial molar volumes) of binary mixtures of {methanol (1) + [BMIM][BF₄](2)}. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.40, p.1386–1401, 2008.

ABDULAGATOV, I. M.; TEKIN, A.; SAFAROV, J.; SHAHVERDIYEV, A.; HASSEL, E. Densities and Excess Apparent, and Partial Molar Volumes of Binary Mixtures of BMIMBF₄ + Ethanol as a Function of Temperature, Pressure, and Concentration. **Internation Journal of Thermophysics**, v.29, p.505–533, 2008a.

ALBERTSSON, P. A.; Partition of Cell Particles and Macromolecules, 2nd ed., Wiley-Interscience: New York, 1971.

ALCÂNTARA, L. A. P.; AMARAL, I. V.; BONOMO, R. C. F.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; MINIM, V. P. R.; MININM, L. A. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylen glycol) and sodium polyacrylate. **Food and Bioproducts Processing**. v. 92, p. 409-415, 2014.

AMARESH, S. P.; SHREELA, M.; REGUPATHI, I.; MURUGESAN, T. Liquid- Liquid Equilibrium of Poly (ethylene glycol) 4000 + diAmmonium Hydrogen Phosphate + Water at different temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.53, p.1574–1578, 2008.

AMRITKAR, N.; KUMAT, M.; LALI, A. Expanded bed affinity purification of bacterial α -amylase and cellulose on composite substrate analogue–cellulose matrices. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 565-570, 2004.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n. 49, p. 8826-8835, 2011.

ASOODEH, A.; CHAMANIC, J.; LAGZIANA, M. A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic “*Bacillus sp. Ferdowsicus*” isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.46, p.289-297, 2010.

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

BAGHERI, A.; KHODARAHMI, R.; MSTAFAIE, A. Purification and biochemical characterization of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. **Food Chemistry**, v. 161, p. 270-278, 2014.

BAHADUR, I.; GOVENDER, B. B.; OSMAN, K.; OSMAN, K.; WILLIAMS-WYNN, M. D.; NELSON, W. M.; NAIDOO, P.; RAMJUGERNATH, D. Measurement of activity coefficients at infinite dilution of organic solutes in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxyethoxy) ethylsulfate at T = (308.15, 313.15, 323.15 and 333.15) K using gas + liquid chromatography. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 70, p. 245-252, 2014.

BASKIR, J.N.; HATTON, T. A.; SUTTER, U.W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 541-558, 1989.

BEGUM, S. K.; RATNA, S. A.; CLARKE, R. J.; AHMED, M. S. Excess molar volumes, refractive indices and transport properties of aqueous solutions of poly(ethylene glycol)s at (303.15–323.15) K. **Journal of Molecular Liquids**, v.202, p.176–188, 2015.

CARVALHO, C. C.; COIMBRA, J. S. R.; COSTA, I. A. F.; MINIM, L. H.; MAFFIA, M. C. Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278.15 to 318.15) **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, p. 351-356, 2007.

CARVALHO, C. **Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol, Sais e Água**. Viçosa, 2004. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from calotropis procera latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1148-1155, 2010.

CORONADO, M.J.; VARGAS, C.; HOFEMEISTER, J.; VENTOSA, A.; NIETO, J. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 183, p.67-71, 2000.

COSTA, B. S.; GARCIA-ROJAS, E. E.; COIMBRA, J. S. R.; TEIXEIRA, J. A.; TELIS-ROMERO, J. Density, Refractive Index, Apparent Specific Volume, and Electrical Conductivity of Aqueous Solution of Poly(ethylene glycol) 1500 at Different Temperaturas. **Journal Chemical & Engineering Data**, v. 59, p. 339-345, 2014.

CUMICHEO, M. C.; NOBRE, I. C. S.; SANTOS, A. F.; LAMPREA, I. M. S.; SANTOS, M. S. C. S.; SANTOS, F. J. V.; SEGURA, H.; CASTRO, C. A. N. Thermophysical properties of 1-Buthyl-1methyl-pyrrolidinium Dicyanamide + H₂O Mixtures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 60, p.3766-3775, 2015.

DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; DE AQUINO, R. A. N.; Francisco, K.R.; Cardoso, M. V. C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. Nitroprusside-PEO Enthalpic Interaction as a Driving Force for Partitioning of the [Fe(CN)₅NO]₂-Anion in Aqueous Two Phase Systems Formed by Poly(ethylene oxide) and Sulfate Salts. **Journal of Physical Chemistry B**, v.110, p.23540 – 23546, 2006b.

DA SILVA, L.H.M.; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifasicos: Fundamentos e aplicações para particão/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p. 1345- 1351, 2006.

DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J. COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Sistema aquosos bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1332-1339, 2006.

DA SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; ÁMIM JÚNIOR, J.; GUIMARÃES, R. O.; MARTINS, J. P. Liquid-liquid Equilibrium of Aqueous Mixture of Triblock Copolymeres L35 and F68 with Na₂SO₄ or Li₂SO₄ or MgSO₄. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.51, n.6, p.2260-2264, 2006a.

DALLORA, N.L.P.; KLEMZ, J.G.D.; PESSÔA FILHO, P.D.A. Partitioning of model proteins in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium carbamate, **Biochemical Engineering Journal**, v. 34 , n. 92–97, 2007.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous Two Phase Systems for Biomolecule Separation. **Advances in Biochemical Engineering**, Fiechter, A. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, v.47, p.89-135, 1992.

DREYER, S., SALIM, P., KRAGL, U. Driving forces of protein partitioning in ionic liquid-based aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 176-185, 2009.

EVERBERG, H.; CLOUGH, J.; HENDERSON, P.; JERGIL, B.; TJERNELD, F.; RAMIREZ, I. B. R. Isolation of Escherichia coli inner membranes by metal affinity two-phase partitioning. **Journal of Chromatography A**, v.1118, p.244-252, 2006.

- FICKE, L. E.; NOVARK, R. R.; BRENNECKE, J. F. Thermodynamic and Thermo-physical Properties of Ionic Liquid + Water Systems. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.55, n. 11, 4946-4950, 2010.
- FRANÇA, J. M. P.; NIETO DE CASTRO, C. A.; LOPES, M. M.; NUNES, V. M. B. Influence of Thermo-physical Properties of Ionic Liquids in Chemical Process Design. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.54, n.9, p.2569–2575, 2009.
- FREIRE, M. G.; CARVALHO, P. J.; SILVA, A. M. S.; SANTOS, L. M. N. B. F.; REBELO, L. P. N.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Ion Specific Effects on the Mutual Solubilities of Water and Hydrophobic Ionic Liquids. **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, p.202–211, 2009.
- FREIRE, M. G.; CLÁUDIO, A. F. M.; ARAÚJO, J. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M.; LOPES, J. N. C.; REBELO, L. P. N. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v.41, p. 4966-4995, 2012.
- FREIRE, M. G.; NEVES, C. M.; SILVA, A. M.; SANTOS, L. M.; MARRUCHO, I. M.; REBELO, L. P.; SHANH, J. K.; MAGINN E. J.; COUTINHO, J. A. H-1 NMR and Molecular Dynamics Evidence for an Unexpected Interaction on the Origin of Salting-In/Salting-Out Phenomena. **Journal of Physical Chemistry B**, v.114, n.5, p. 2004-2014, 2010.
- FREIRE, M. G.; PEREIRA, J. F. B.; FRANCISCO, M.; RODRÍGUEZ, H.; REBELO, L. P. N.; ROGERS, R. D.; COUTINHO, A. P. Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol polymers and liquid ionic. **Chemistry A European Journal**, v. 18, p. 1831-1839, 2012a.
- FREIRE, M.G.; LOUROS, C.L.S.; REBELO, L.P.N.; COUTINHO, J.A.P. Aqueous biphasic system composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. **Green Chemistry**. v. 13, p.1536-1545, 2011.
- GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1082-1087, 2010.
- GIRALDO-ZUÑIGA, D.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Coeficiente de partição da α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos influência da massa molar do polímero. **Ciência y Tecnología Alimentaria**, v. 3, p. 149-155, 2001.

GOMES, G.A.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, M.R.; PRAZERES, D.M.F. Purification of plasmid DNA with aqueous two-phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate, **Separation and Purification Technology**, v. 65, p.22–30, 2009.

GRABER, T. A.; MARIA, E. T.; ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Influence of Molecular Weight of the Polymer on the Liquid-Liquid Equilibrium of the Poly(ethylene glycol) + NaNO₃ + H₂O System at 298.15 K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.46, p.765–768. 2002.

GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p.255-258, 2000.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B.. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. v.0, p.1-18, 2003.

GUTOWSKI, K. E.; BROKER, G. A.; WILLAUER, H. D.; J. G. HUDDLESTON, H. D.; SWATLOSKI, R.P. HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p.6632-6633, 2003.

HAGHTALAB, A.; MOKHTARANI, B. The UNIFAC-NRF activity coefficient model based on group contribution for partitioning of proteins in aqueous two phase (polyer + salt) systems. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 37, n. 3, p. 289-295, 2005.

HAYYAN, A.; MJALLI, F. S.; ALNASHEF, I. M.; AL-WAHAIBI, Y. M.; T. AL-WAHAIBI, M.A.HASHIM. Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties, **Journal Molecular Liquids**, v. 178, p.137–141, 2013.

HIZUKURI, S. Starch: analytical aspects. In: Eliasson, A.-C., Editor, 1996. Carbohydrates in Food. Marcel Dekker, New York, p. 347–429, 1996.

JIN, F.; LI, Y.; ZHANG, C.; YU, H. Thermostable α -amylase and β -galactosidase production from the thermophilic and aerobic Bacillus sp. JF strain. **Process Biochemistry**. v. 36, p.559-564, 2001.

- JOHANSSON, H-O; MAGALDI, F.M.; FEITOSA, E.; PESSOA-JR, A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1178, p. 145-153, 2008.
- KABIRI-BADR, M.; CABEZAS JR, H. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v.115, p.39-58, 1996.
- KAREEM, M. A.; MJALLI, F. S.; HASHIM, M. A.; ALNASHEF, I. M. Phosphonium-based ionic liquids analogues and their physical properties. **Journal Chemical & Engineering Data**, v. 55, p.4632–4637, 2010.
- KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN,W.; SIMPSON, B. K.; KISHIMURA, H. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3061–3067, 2005.
- KRONER, K.H.; HUSTEDT, H.; GRANDA, S.; KULA, M.R. Technical aspects of separation using aqueous two-phase systems in enzyme isolation processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1967-1988, 1978.
- KUMARI, A.; SINGH, V. K.; FITTER, J.; POLEN, T.; KAYASTHA, A. M. α -Amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds – Purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. **Phytochemistry**, v. 71, p.1657-1666, 2010.
- LI, S. H.; HE, C.; LIU, H.; LI, K.; LIU, F. Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids. **Journal of Chromatography B**, v.826, n.1-2, p.58-62, 2005.
- LOUROS, C. L. S.; CLÁUDIO, A. F. M.; NEVES, C. M. S. S.; MARRUCHO, M. G. F.; ISABEL, M.; PAULY, J.; COUTINHO, J. A. P. Extraction of biomolecules using phosphonium-based ionic liquids + K₃PO₄ aqueous biphasic systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1777-1791, 2010.
- MAGESTE, A. B.; LEMOS, L. R.; SILVA, M. C. H.; FERREIRA, G. M. D.; SILVA, L. H. M.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal Chromatography A**, v. 1216, p. 7623-7629, 2009.

- MAGESTE, A. B.; SENRA, T. D. A.; HESPANHOL, M. C. S.; BONOMO, R. C. F. B.; DA SILVA, L. H. M. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69-77, 2012.
- MENDU, D. R.; RATNEM, B. V. V.; PURNIMA, A. Affinity chromatograph of α -amylase from *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 712-717, 2005.
- MICHELIN, M.; SILVA, T. M.; BENASSI, V. M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MORAES, L. A. B.; LEÃO, J. M.; JOEGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotti*. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 2348-2353, 2010.
- MUHAMMAD, N.; MAN, Z.; ZIYADA, A. K.; BUSTAM, M. A.; MUTALIB, M. I. ABDUL, WILFRED, C. D.; RAFIQ, S.; MOHDTAN, I. Thermo-physical Properties of Dual Functionalized Imidazolium- Based Ionic Liquids **Journal Chemical & Engineering Data**, 57, 737-743, 2012.
- MURRAY, J. N.; JENKINS, A. D. Properties of liquids and solutions, 2 ed. New York: J. Wiley, 303, 1994.
- NEVES, C. M. S. S.; VENTURA, S. P. M.; FREIRE, M. G.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Evaluation of cation influence on the formation and extraction capability of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.113, p.5194-5199, 2009.
- OLIVEIRA, G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA JR., A. Partition Behavior and Partial Purification of Hexokinase in Aqueous Two-Phase Polyethylene Glycol/Citrate Systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 105-108, p. 787-197, 2003.
- OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A. ; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 1083-1087. 2009.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 31p. 135-152, 2000.

- PASSOS, H.; TRINDADE, M. P.; VAZ, T. S. M. DA COSTA, L. P.; FREIRE, M. G. F.; COUTINHO, J. A. P. The impact of self-aggregation on the extraction of biomolecules in ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 108, p. 174-180, 2013.
- PEI, Y. C.; EANG, J.; WU, K.; XUAN, X.; LU, X. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. **Separation and Purification Technology**, n. 64, p. 288–295, 2009.
- PEREIRA, J. F. B.; VENTURA, S. P. M.; SILVA, F. A.; SHAHRIARI, S.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquid and polymers: A platform for the purification of biomolecules. **Separation and Purification Technology**, v. 113, p. 83-89, 2013.
- PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos. Editora Manole, São Paulo, Brasil. 2005. p. 176 – 279.
- PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. **Chemical Society Reviews**, v.37, p.123–150, 2008.
- PORFIRI, M. C.; PICÓ, G.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B. *Aspergillus oryzae* alpha-amylase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, p.7–13, 2011.
- PROLONGO, M. G.; MASEGOSA, R. M.; HERMANDEZ-FUENTES, I.; HORTA, A. Viscosities and excess volume of binary mixtures formed by the liquids acetonitrile, pentyl acetate, 1-chlorobutane, and carbon tetrachloride at 25°C. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, p. 2163-2167, 1984.
- RAJOKA, M. I.; YASMIN. A.; LATIF. F. Kinetics of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamilase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 39, p. 13-18, 2004.
- REGUPATHI, I.; SHREELA, M.; GOVINDARAJAN, R.; AMARESH, S. P.; MURUGESAN, T. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly(ethylene glycol) 6000 + Triammonium Citrate + Water Systems at Different Temperatures. **Journal Chemical & Engineering Data**, v.54, p.1094–1097, 2009.

REIS, I.A.O.; SANTOS, S.B.; PEREIRA, F.D.S.; SOBRAL, C.R.S.; FREIRE, M.G.; FREITAS, L.S.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-sal-based aqueous two-phase systems. **Separation Science and Technology - In press**. 2014.

ROBERTS, M. J.; BENTLY, M.D.; HARRIS, J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p.459–476, 2002.

RUDAN-TASIC, D. e KLOFUTAR, C. Apparent Specific Volume and Apparent Specific Refraction of Some Poly(oxyethylene) Glycols in 1,4-Dioxane and Benzene Solutions at 298.15 K. **Monatshefte fur Chemie/Chemical Monthly**, v. 135, p.1209-1224, 2004.

SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKI, M. A.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, V. 47, P. 18-25, 2012.

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two phase systems: experiments and predictions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 48, p.187-188, 2001.

SELBER, K.; COLLEN, A.; HYYTIA, T.; PENTTILA, M.; TJERNELD, F.; KULA, MR. Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, v.10, p.229-236, 2001.

SHAHRIARI, S.; TAGHIKHANI, V.; VOSSOUGH, M.; SAFE KORDI, A. A.; ALEMZADEH, I.; PAZUKI, G. R. Measurement of partition coefficients of β -amylase and amyloglucosidase enzymes in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 292, p. 80-86, 2010.

SILVA, C. A. S. **Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 57 p., 2007.

SILVA, R. M. M. **Propriedades termofísicas de sistemas aquosos bifásicos composto por polietileno glicol, sulfato de lítio e água**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 71 p., 2005.

SINGH, D.; DAHIYA, J. S; NIGAM, P. Simultaneous raw starch hydrolysis and ethanol fermentation by glucoamylase from *Rhizocolonia solini* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Basic Microbiology** v. 35, p. 117-121, 1995.

SINGH, K.; KAYASTHA, A. M. α -Amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: its purification, biochemical attributes and active site studies. **Food Chemistry**, v. 162, p.1-9, 2014.

SIONGCO, K. R.; LERON, R. B.; LI, M-H. Densities, refractive indices, and viscosities of N,N-diethylethanol ammonium chloride–glycerol or –ethylene glycol deep eutectic solvents and their aqueous solutions. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 65, p.65–72, 2013.

SONIYA, M. E MUTHURAMAN G. Comparative study between liquid-liquid extraction and bulk liquid membrane for the removal and recovery of methylene blue from waste water. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 30, p. 266-273, 2015.

SOUZA JR., E. C.; COIMBRA, J. S. R.; OLIVEIRA, E. B.; BONOMO, R. C. F. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 973, p. 84-88, 2014.

SOUZA, R. C. S.; COIMBRA, J. S. R.; DA SILVA, L. H. M.; AS SILVA, M. C. H.; ROJAS, E. E. G.; VICENTE, A. A. A. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysosyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2579-2584, 2009.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no Estado sólido**. 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 2005. 157p.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAÚJO, J. M. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardioopsis* sp. Endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**. v. 76, p.137-141, 2001.

TOMÉ, L. I. N.; PEREIRA, J. F. B.; ROGERS, R. R.; FREIRE, M. G.; GOMES, J. R. B.; COUTINHO, J. A. P. “Washing-out” ionic liquids from polyethylene glycol to form aqueous biphasic systems. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, p. 2271-2274, 2014.

TRIVEDI, S.; BHANOT, C.; PANDEY, S. Densities of poly (ethylene glycol) + water over the temperature range (283.15 to 363.15) K, **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.42, p.1367–1371, 2010.

TUBIO, G.; PELLEGRINI, L.; NERLI, B. B.; PICO, G. A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycols) of different molecular weight and sodium citrate. **Journal Chemical & Engineering Data**, v.51, p.209–212, 2006.

VAIDYA, B. K.; SUTHAR, H. K.; KASTURE, S.; NENE, S. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system, **Biochemical Engineering Journal**, v.28, p. 161–166, 2006.

VENTURA, S. P. M.; SOUZA, S. G.; FREIRE, M. G.; SERAFIN, L. S.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Design of ionic liquids for lipase purification. **Journal of Chromatography**, v. 87, p. 2679, 2011.

WALTER, H.; BROOKS, D. E.; FISHER, D. Partition in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology. Orlando, FL: Academic, 1985.

WILLAUER, H. D.; HUDDLESTON, J. G.; LI, M.; ROERS, R. D. Investigation of aqueous biphasic systems for the separation of lignins from cellulose in the paper pulping process. **Journal of Chromatography B**, n. 743, p. 127 – 135, 2000.

YUE, H.; YUAN, Q.; WANG, W. Purification of phenylalanine ammonia-lyase in PEG1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase system by a two-step extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p.231–237, 2007.

YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C. α -Amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. v. 5, p.115-121, 2000.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMZEHZEDH, S. Partitioning of amino acids in the aqueous biphasic system containing the water-miscible ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the water-structuring salt potassium citrate. **Biotechnology Progress**, n. 27, p. 986–997, 2011.

ZANELLA L., DURÁN N. Produção e semipurificação da enzima lacase através de sistemas aquosos bifásicos. **X congresso interno de Iniciação Científica da UNICAMP**. 25-26 de setembro de 2002.

ZHANG, D. L.; DENG, Y. F.; CHEN, J. Enrichment of aromatic compounds in water using ionic liquids and their aqueous solutions. **Separation Science and Technology**, n. 45, p. 663-669, 2010.

ARTIGO 1

Densidade, Índice de Refração, Condutividade Elétrica, Volume Específico Aparente, Coeficiente de Expansão Térmica e Volume Molar de Excesso das misturas binárias de água + cloreto 1-etil-3-metil imidazólio em (293.15 a 323.15) K.

RESUMO

Objetivou-se nesse estudo obter as propriedades termofísicas densidade, índice de refração, condutividade elétrica, volume específico aparente, coeficiente de expansão térmica e volume molar de excesso de soluções binárias do líquido iônico cloreto 1-etil-3-metilimidazólio + água. As propriedades termofísicas do líquido iônico foram medidas como uma função da fração mássica $w = (0,05, 0,2, 0,35, 0,50, 0,65, 0,80, 0,95 \text{ e } 1)$ e da temperatura $T = (293,15, 303,15, 313,15 \text{ e } 323,15)$ K. Os valores da densidade e do índice de refração das misturas binárias de água + cloreto 1-etil-3-metilimidazólio aumentaram com a elevação da fração de massa do líquido iônico e diminuíram com a elevação da temperatura. Em contrapartida o volume específico aparente das misturas binárias apresentou comportamento contrário a densidade e índice de refração. Foi observado que a condutividade elétrica aumentou com a fração de massa de líquido iônico. Foi verificado que o volume molar de excesso foi negativo em quase toda faixa de fração mássica e temperatura. Modelos representando efeitos combinados entre as variáveis temperatura e fração mássica do líquido iônico foram ajustados, e apresentaram bom ajuste.

Palavras-Chave: solução aquosa, propriedades termofísicas, modelos polinomiais.

1. INTRODUÇÃO

Os líquidos iônicos (ILs) são sais orgânicos que apresentam baixo ponto de fusão. Eles têm propriedades físico-químicas únicas que incluem pressão de vapor desprezível, não inflamável, não explosivo, estável eletroquimicamente e termicamente, além de poderem ser facilmente reciclados. Estes sais apresentam pressões de vapor extremamente baixas, e esta característica tem atraído atenção como solventes potenciais para substituir solventes orgânicos voláteis de uma grande variedade de reações químicas, processos de separação, entre outros. Tais compostos possuem muitas propriedades favoráveis que os tornam atraentes para inúmeras aplicações (FRANÇA et al., 2009; FICKE, NOVARK e BRENNECKE, 2010; MUHAMMAD et al., 2012).

Devido a essas características os ILs vem sendo bastante estudados nos sistemas aquosos bifásicos (SAB's). Esses sistemas consistem de duas fases aquosas ricas em dois compostos estruturalmente diferentes, que são imiscíveis, onde acima de certos valores de concentração, separam-se em duas fases. Os SAB's podem ser formado por polímeros, sais e surfactantes, que podem ser combinados a fim de projetá-los estrategicamente para atingir alta seletividade e eficiência de extração e purificação de biomoléculas (VICENTE, et al., 2014).

Os SAB's formados por líquido iônico têm sido aplicados com sucesso para separar, concentrar, isolar e purificar biocompostos. Vários estudos com os ILs já foram publicados nos

últimos anos, como por exemplo na remoção completa de corantes, na recuperação de antibióticos, etanol e butanol de caldo da fermentação, acetona, na eliminação de contaminantes orgânicos de fluxos de resíduos aquosos e na partição de proteínas (HUDDLESTON et al., 1998; FADEEV e MEAGHER, 2001; DU et al., 2007; DREYER, SALIM e KREAGL, 2009; FERREIRA, et al., 2014). Predizer as propriedades termofísicas básicas das fases formadoras dos sistemas em várias concentrações e temperaturas são também são indispensáveis para o design e faixa de processos de separação. Neste contexto, para o projeto e design industrial utilizando líquido iônico, é necessário o conhecimento das propriedades físico-química e termodinâmica do fluido, tais como comportamento térmico, densidade, volume molar de excesso, entre outras (DEENADAYALU, BAHADUR e HOFMAN, 2010).

Propriedades de misturas binárias (densidade, volumes molares de excesso e parciais) são propriedades complexas que dependem não só do tamanho, forma e natureza química dos componentes de uma mistura, mas também das interações (soluto + soluto, solvente + soluto, soluto + solvente) e os efeitos estruturais decorrentes do alojamento intersticial devido às diferenças de volume molar e livre entre os componentes da solução (ABDULAGATOV et al., 2008; ABDULAGATOV et al., 2008a; BAHADUR et al., 2015). Embora os ILs têm sido amplamente estudados, informações sobre propriedades termodinâmicas de misturas binárias de cloreto 1-etil-3-metil imidazólio ([C₂mim]Cl) e água não foram encontradas na literatura. Diante do exposto, objetivou-se avaliar as propriedades termofísicas (densidade, índice de refração, condutividade elétrica, volume específico aparente, coeficiente de expansão térmica e volume molar de excesso) de misturas binárias de água + ([C₂mim]Cl) em várias condições, temperatura e fração mássica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

O líquido iônico utilizado foi o cloreto 1-etil-3-metil imidazólio ([C₂mim]Cl) (≥95% de pureza; CAS: 65039-09-0) foi adquirido da Sigma Aldrich. Foi utilizada água destilada no preparo das soluções. Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Itapetinga - Bahia.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo de soluções

As soluções aquosas de ([C₂mim]Cl) foram preparadas utilizando uma balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) com uma precisão de $\pm 0,0001$ g. Quantidades apropriadas do líquido iônico foram diluídas em tubos e agitadas manualmente para obter as frações mássicas de $w = (0,05, 0,20, 0,35, 0,50, 0,65, 0,80, 0,95 \text{ e } 1)$. As análises foram realizadas em todas as soluções preparadas nas temperaturas de $T = (293,15, 303,15, 313,15 \text{ e } 323,15)$ K, que correspondem às temperaturas relativas $T = (0,9832, 1,0168, 1,0503 \text{ e } 1,0839)$, respectivamente.

2.2.2. Massa específica

As massas específicas das soluções foram determinadas utilizando-se um Densímetro Digital de Bancada DMA 5000M (ANTON PAAR, Graz, Áustria) com uma precisão de $\pm 5 \times 10^{-6}$ g.cm⁻³ e repetibilidade de $\pm 1 \times 10^{-6}$ g.cm⁻³ na faixa de operação 0 a 3 g.cm⁻³. A faixa de temperatura do equipamento é de 273,15 K a 363,15 K com uma precisão de $\pm 0,01$ K e repetibilidade de $\pm 0,001$ K.

2.2.3. Índice de refração

Para o índice de refração, foi utilizado o refratômetro digital Q767BD (Quimis, Diadema, Brasil) com precisão de $\pm 0,0002$. Este aparelho foi conectado a um banho termostático (Tecnal, Te-184, Piracicaba, Brasil), que permitia o controle da temperatura com uma precisão de 0,1 K. O equipamento foi calibrado com água destilada na temperatura de estudo, em seguida a amostra foi colocada no prisma do refratômetro para proceder à leitura direta.

2.2.4. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi determinada utilizando um condutivímetro digital de bancada Q795m (Quimis, Diadema, Brasil) com precisão de 0,5%. O equipamento foi calibrado com solução padrão de KCl 0,01 M. A temperatura das amostras foram controladas em banho termostático (Tecnal, Te-184, Piracicaba, Brasil), que permitia o controle da temperatura com uma precisão de 0,1 K.

2.2.5. Volume específico aparente

O volume específico aparente ($v_{2\phi}$) foi calculado a partir dos dados da massa específica, utilizando a seguinte equação:

$$v_{2\phi} = \frac{1}{\rho} \left[1 + \frac{\rho_0 - \rho}{w\rho_0} \right] \quad (1)$$

Em que: ρ (g.cm⁻³) e ρ_0 (g.cm⁻³) são as massas específicas da mistura binária e água pura, respectivamente.

2.2.6. Coeficiente de expansão térmica

A massa específica calculada para as misturas binárias foi utilizada para calcular o coeficiente de expansão térmica (α_p) em cada fração mássica, por meio da seguinte equação:

$$\alpha_p = -1 \left(\frac{\partial \rho}{\partial T} \right)_p \quad (2)$$

Onde: ρ é a massa específica em g.cm⁻³.

2.2.7. Volume molar de excesso

O Volume molar de excesso (V_m^E) foi calculado para as misturas binárias a partir dos valores da massa específica, utilizando a seguinte equação:

$$V_m^E = x_1 M_1 \left(\frac{1}{\rho} - \frac{1}{\rho_1} \right) + x_2 M_2 \left(\frac{1}{\rho} - \frac{1}{\rho_2} \right) \quad (3)$$

Onde: V_m^E (cm³.mol⁻¹) representa o volume molar de excesso; ρ (g.cm⁻³) representa a massa específica; x representa a fração molar; e M (g.mol⁻¹) representa a massa molar, sendo que as variáveis com os índices 1 e 2 correspondem a água e ao líquido iônico, respectivamente.

2.2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SAEG v.9.1 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001). O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), com duas repetições e em triplicata.

Foram ajustados modelos polinomiais dessas propriedades termofísicas em função da temperatura relativa ($T/T_{\text{referência}}$) e da fração mássica do líquido iônico, por meio do ajuste do modelo aos dados experimentais (equação 4), obtendo assim o efeito combinado de tais propriedades em relação as variáveis estudadas. Foi considerado 298,15 K como a temperatura de referência ($T_{\text{referência}}$).

$$\psi = \beta_1 + \beta_2 w + \beta_3 T + \beta_4 w^2 + \beta_5 T^2 + \beta_6 wT \quad (4)$$

Onde: ψ é a propriedade termodinâmica e $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$ e β_6 são constantes determinadas a partir dos dados experimentais.

O modelo foi selecionado com base na significância dos parâmetros com base no teste t de Student, valor p menor que 0,05, coeficiente de determinação (R^2) e a raiz quadrada do erro quadrado médio (RMSE).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (V_{ei} - V_{pi})^2} \quad (5)$$

Onde: V_{ei} são os valores experimentais das propriedades, V_{pi} são os valores preditos pelos modelos ajustados e N é o número de observações. O desvio padrão para cada propriedade também foi calculado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Massa específica, índice de refração, condutividade elétrica e volume específico aparente das misturas binárias

A massa específica, o índice de refração, condutividade elétrica e volume específico aparente das soluções aquosas de líquido iônico ([C₂mim]Cl) foram medidas em diferentes temperaturas relativas (0,9832, 1,0168, 1,0503 e 1,0839) e frações mássicas $w = (0,05, 0,2, 0,35, 0,50, 0,65, 0,80, 0,95$ e 1). Na Tabela 1 estão apresentados a média e o desvio padrão de tais propriedades em todas as condições estudadas.

Tabela 1. Massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$) das misturas binárias de água + ([C₂mim]Cl) em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.

W	T (K)	ρ (g.cm ⁻³)	n_D	κ (mS.cm ⁻¹)	$v_{2\phi}$ (cm ³ .g ⁻¹)
0,050	0,9832	1,006±0,001	1,3415±0,0001	17,54±0,76	0,853±0,001
	1,0168	1,002±0,001	1,3405±0,0001	17,66±0,53	0,877±0,001
	1,0503	0,998±0,001	1,3390±0,0001	17,43±1,25	0,883±0,001
	1,0839	0,994±0,001	1,3375±0,0001	17,98±0,96	0,896±0,001
0,200	0,9832	1,024±0,001	1,3677±0,0001	65,10±1,57	0,852±0,001
	1,0168	1,020±0,001	1,3664±0,0001	64,82±1,44	0,860±0,001
	1,0503	1,016±0,001	1,3648±0,0001	61,66±1,25	0,868±0,001

	1,0839	1,011±0,001	1,3631±0,0001	63,72±1,38	0,875±0,001
0,350	0,9832	1,047±0,001	1,3958±0,0001	107,81±3,09	0,822±0,001
	1,0168	1,043±0,001	1,3943±0,0001	107,33±3,48	0,830±0,001
	1,0503	1,038±0,001	1,3923±0,0001	102,94±3,47	0,838±0,001
	1,0839	1,032±0,001	1,3901±0,0001	105,95±3,68	0,845±0,001
0,500	0,9832	1,073±0,001	1,4264±0,0001	136,19±0,41	0,792±0,001
	1,0168	1,068±0,001	1,4244±0,0001	139,17±0,77	0,801±0,001
	1,0503	1,062±0,001	1,4223±0,0001	137,20±0,79	0,809±0,001
	1,0839	1,057±0,001	1,4201±0,0001	147,53±0,94	0,816±0,001
0,65	0,9832	1,101±0,001	1,4585±0,0001	167,14±0,14	0,765±0,001
	1,0168	1,095±0,001	1,4566±0,0001	171,02±0,77	0,773±0,001
	1,0503	1,089±0,001	1,4537±0,0001	173,10±0,79	0,780±0,001
	1,0839	1,083±0,001	1,4511±0,0001	180,05±0,94	0,787±0,001
0,800	0,9832	1,122±0,001	1,4987±0,0001	204,50±0,70	0,753±0,001
	1,0168	1,118±0,001	1,4906±0,0001	214,47±2,76	0,758±0,001
	1,0503	1,114±0,001	1,4855±0,0001	211,59±0,60	0,761±0,001
	1,0839	1,109±0,001	1,4777±0,0001	220,52±1,13	0,764±0,001
0,950	0,9832	1,139±0,001	1,5193±0,0001	228,35±1,22	0,748±0,001
	1,0168	1,133±0,001	1,5166±0,0001	234,67±1,24	0,755±0,001
	1,0503	1,128±0,001	1,5133±0,0001	232,56±1,22	0,760±0,001
	1,0839	1,122±0,001	1,5111±0,0001	236,77±0,08	0,764±0,001
1,000	0,9832	1,144±0,001	1,5305±0,0001	241,84±1,70	0,746±0,001
	1,0168	1,139±0,001	1,5266±0,0001	249,97±3,97	0,753±0,001
	1,0503	1,133±0,001	1,5232±0,0001	246,51±3,13	0,758±0,001
	1,0839	1,127±0,001	1,5205±0,0001	253,34±2,65	0,762±0,001

A massa específica das misturas binárias variou de (0,994 a 1,144) g.cm⁻³, o índice de refração variou de (1,3375 a 1,5305), a condutividade elétrica variou entre (17,54 a 249,97) mS.cm⁻¹ e o volume específico aparente variou entre (0,746 a 0,896) cm³.g⁻¹. A massa específica aumentou com a elevação da fração de massa do ([C₂mim]Cl) e diminuiu com a elevação da temperatura para uma composição constante do ([C₂mim]Cl). Muray et al. (2013) observaram comportamento semelhante, estudando as propriedades termofísicas do líquido iônico a base de imidazólio. A diminuição da massa específica com o aumento da temperatura pode ser atribuída a maior mobilidade das moléculas do líquido com aumento de energia fornecida na forma de calor, tornando as interações dentro do sistema mais fracas, causando a

expansão do volume e a diminuição de interações moleculares, conseqüentemente diminuindo a massa específica (SIANGCO et al., 2013). No entanto, os valores da massa específica obtidos experimentalmente para as misturas binárias são menores que os calculados a partir do cálculo de proporção direta, considerando que a massa específica resultante fosse a fração dos constituintes versus suas respectivas massas específicas quando puros. Isto se deve ao fato de novas interações termodinâmicas serem formadas a partir da mistura de substâncias, pois se estas forem mais fortes as moléculas estarão mais próximas. Desta forma, o volume ocupado por uma mesma massa será menor e conseqüentemente, a massa específica da substância será maior. O caso inverso também pode ocorrer.

Comportamento similar pode ser observado para o índice de refração em todas as frações mássicas do ([C₂mim]Cl) e temperaturas. Em relação a temperatura, fixando-se a fração mássica do ([C₂mim]Cl), foi verificado que o aumento da temperatura causa uma expansão do volume do líquido, diminuindo o número de moléculas que serão atravessadas pelo feixe de luz monocromático, proporcionando uma diminuição no índice de refração das soluções aquosas. Observou-se ainda que o índice de refração aumentou com a elevação na fração mássica de ([C₂mim]Cl). O que indica que o aumento da fração de massa de ([C₂mim]Cl), proporciona um aumento de moléculas que serão atravessadas pelo feixe de luz monocromático, conseqüentemente ocorre um aumento em tal propriedade.

Pode-se verificar que a condutividade elétrica aumenta com o aumento da fração de massa do líquido iônico. A condutividade elétrica aumenta com aumento da fração mássica ([C₂mim]Cl), devido ao aumento da quantidade de íons presentes nas soluções aquosas (XU et al., 2015).

O volume específico aparente diminuiu com aumento da fração de massa do ([C₂mim]Cl) para uma mesma temperatura e aumentou com a elevação da temperatura, para uma fração mássica constante.

A partir dos dados experimentais obtidos, foram ajustados modelos polinomiais dessas propriedades termofísicas em função da temperatura e fração mássica do líquido iônico, por meio do ajuste dos dados experimentais ao modelo geral (equação 4).

A tabela 2 apresenta os coeficientes obtidos a partir da regressão polinomial (eq. 4) para massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\theta}$). O ajuste entre os dados experimentais e preditos pelo modelo foi satisfatório, com valores de R² e coeficiente de correlação maiores que 0,98 e baixo RMSE.

Tabela 2. Parâmetros ajustados do modelo linear (eq. 4) para massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$) para soluções aquosas do ([C₂mim]Cl) em diferentes temperaturas relativas.

Propriedades	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	R ²	RMSE
ρ (g. cm ⁻³)	1,1436	0,1631	-0,1502	-0,0130	ns	ns	0,9977	0,0033
n_D	1,3628	0,2765	-0,0327	0,0142	ns	-0,0903	0,9994	0,0022
κ (10 ⁻³ mS. cm ⁻¹)	23,1155	168,2722	-19,0354	-67,7352	ns	137,2398	0,9987	3,9472
$v_{2\phi}$ (cm ³ .g ⁻¹)	0,5470	-0,0077	0,3384	0,0806	ns	-0,2129	0,9883	0,0072

ns: não significativo

Os ajustes da tabela 2 mostram um efeito linear negativo da temperatura, para a massa específica e índice de refração. O que indica que o aumento da temperatura causa uma diminuição nestas propriedades termodinâmica em questão. Isso ocorre, devido ao aumento da mobilidade das moléculas das misturas binárias, que causa a expansão do volume, e a diminuição das interações intermoleculares (SIANGCRO; LERON e LI, 2013).

Pode-se observar ainda na tabela que a condutividade elétrica apresentou comportamento quadrático para a fração de massa do ([C₂mim]Cl), indicando que o aumento do ([C₂mim]Cl) aumenta a concentração de íons presentes em solução, e conseqüentemente aumenta a condutividade elétrica.

Pode-se observar que para o volume específico aparente o termo referente a temperatura foi positivo, indicando que com o aumento da temperatura, as moléculas tendem a se afastar e conseqüentemente aumenta o volume.

3.2. Coeficiente de Expansão Térmica

O coeficiente de expansão térmica (α_p) é um indicador para expansão ou contração de um fluido em todas as direções com a temperatura. Foi verificado que o coeficiente de expansão térmica aumentou com a elevação da temperatura em todas misturas binárias (Tabela 3). Esse comportamento está de acordo ao encontrado por Muhammad et al. (2012) que estudaram propriedades termofísicas de um líquido iônico e por Wu et al. (2012) que estudaram as propriedades termofísicas de misturas binárias compostas por líquido iônico + polietilenoglicol.

Tabela 3: Coeficiente de expansão térmica das misturas binárias de água +([C₂mim]Cl) em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.

W	Tr	$\alpha_p \times 10^{-1} \text{ (K}^{-1}\text{)}$
0,050	0,9832	1,4959
	1,0168	1,5034
	1,0503	1,5111
	1,0839	1,5188
0,200	0,9832	1,4603
	1,0168	1,4675
	1,0503	1,4748
	1,0839	1,4821
0,350	0,9832	1,4264
	1,0168	1,4333
	1,0503	1,4402
	1,0839	1,4472
0,500	0,9832	1,3940
	1,0168	1,4006
	1,0503	1,4072
	1,0839	1,4138
0,65	0,9832	1,3631
	1,0168	1,3693
	1,0503	1,3756
	1,0839	1,3820
0,800	0,9832	1,3335
	1,0168	1,3394
	1,0503	1,3455
	1,0839	1,3516
0,950	0,9832	1,3051
	1,0168	1,3108
	1,0503	1,3166
	1,0839	1,3225
1,000	0,9832	1,2959
	1,0168	1,3016
	1,0503	1,3073

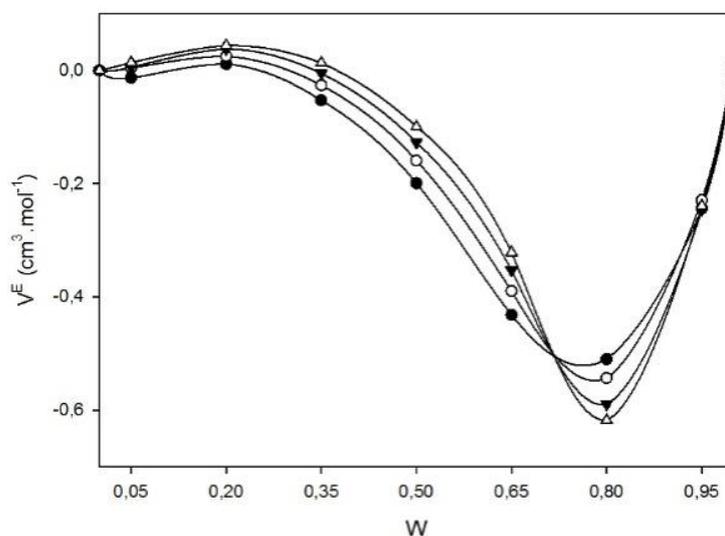
3.3. Volume

molar de excesso

O volume molar de excesso (V_m^E) foi determinado indiretamente a partir dos dados da massa específica dos componentes puros e da mistura binária.

A variação no volume molar de excesso, V_m^E com a concentração do ([C₂mim]Cl) e temperatura estão representados graficamente na figura 1. O volume molar de excesso das misturas binárias ([C₂mim]Cl) + água são negativos com valor mínimo na concentração de 0,80 e temperatura de 323,15 K. Os valores negativos da V_m^E podem ser explicados por vários fatores, tais como: pelo enfraquecimento das interações entre os cátions e o ânion do líquido iônico durante a adição de água; contração do líquido iônico durante a adição de água; diferença de tamanho do LI e da água (DOMÁNSKA e REKAWEK, 2009).

Figura 1. Volume Molar de Excesso (V_m^E) das soluções aquosas do ([C₂mim]Cl) como função da fração mássica em diferentes temperaturas, T/K: ●, 293,15; ○, 303,15; ▼, 313,15; △, 323,15.



4. CONCLUSÃO

Foi possível verificar que as propriedades densidade, índice de refração, volume específico aparente foram afetadas pela fração mássica do ([C₂mim]Cl) e temperatura. A condutividade elétrica foi afetada pela fração mássica do ([C₂mim]Cl). Modelos polinomiais para as propriedades apresentaram ajuste satisfatório aos dados experimentais. Foi verificado também que o volume molar de excesso foi negativo em quase toda faixa de fração mássica e

temperatura, que pode ser devido ao enfraquecimento das interações entre os cátions e os ânions do líquido iônico durante a adição de água e pela diferença de tamanho das moléculas do Líquido iônico e água.

5. REFERÊNCIAS

ABDULAGATOV, I. M. A.; TEKIN, J.; SAFAROV, A.; SHAHVERDIYEV, E.; HASSEL. High-pressure densities and derived volumetric properties (excess, apparent, and partial molar volumes) of binary mixtures of {methanol (1) + [BMIM][BF₄](2)}. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.40, p.1386–1401, 2008.

ABDULAGATOV, I. M.; TEKIN, A.; SAFAROV, J.; SHAHVERDIYEV, A.; HASSEL, E. Densities and Excess Apparent, and Partial Molar Volumes of Binary Mixtures of BMIMBF₄ + Ethanol as a Function of Temperature, Pressure, and Concentration. **International Journal of Thermophysics**, v.29, p.505–533, 2008a.

BAHADUR, I.; LETCHER, T. M.; SINGH, S.; REDHI, G. G.; VENKATESU, P.; RAMJUGERNATH, D. Excess molar volumes of binary mixtures (an ionic liquid + water): A review. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.82, p.34-46, 2015.

DEENADAYALU, N.; BAHADUR, I.; HOFMAN, T. Ternary excess molar volumes of {methyltrioctylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide + ethanol + methyl acetate. or ethyl acetate} systems at T = (298.15. 303.15. and 313.15) K. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.42, p.726-733, 2010.

DOMÁNSKA, U.; REKAWEK, A.; Extraction of Metal Ions from Aqueous Solutions Using Imidazolium Based Ionic Liquids. **Journal of Solution Chemistry**, v.38, p.739–751, 2009.

DREYER, S.; SALIM, P.; KRAGL, U. Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v.46, p.176-185, 2009.

DU, Z.; YU, Y. L.; WANG, J. H. Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two-phase system. **Chemistry – A European Journal**, v.13, p.2130-2137, 2007.

FADEEV, A. G.; MEAGHER, M. M. Opportunities for ionic liquids in recovery of biofuels. **Chemical Communications**, p.295-296, 2001.

FERRERIRA, A. M.; COUTINHO, J. A. P.; FERNANDES, A. M. FREIRE, M. G. Complete removal of textile dyes from aqueous media using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v.128, p.58-66, 2014.

FICKE, L. E.; NOVARK, R. R.; BRENNECKE, J. F. Thermodynamic and Thermo-physical Properties of Ionic Liquid + Water Systems. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, p.4946-4950, 2010.

FRANÇA, J. M. P.; NIETO DE CASTRO, C. A.; LOPES, M. M.; NUNES, V. M. B. Influence of Thermo-physical Properties of Ionic Liquids in Chemical Process Design. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 54, p.2569–2575, 2009.

HUDDLESTON, J. G.; WILLAUER, H. D.; SWATLOSKI, R. P.; VISSER, A. E.; ROGERS, R. D. Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid-liquid extraction. **Chemical Communications**, p.1765-1766, 1998.

MALEK. N. I.; IJARDAR. S. P.; Binary mixtures of ([C4mim][NTf₂] + molecular organic solvents): Thermophysical, acoustic and transport properties at various compositions and temperatures. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.93, p.75-85, 2016.

MUHAMMAD, N.; MAN. Z.; ZIYADA, A. K.; BUSTAM, M. A.; MUTALIB, M. I. ABDUL, WILFRED. C. D.; RAFIQ, S.; MOHDTAN, I. Thermophysical Properties of Dual Functionalized Imidazolium-Based Ionic Liquids. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 57, p. 737-743, 2012.

MURAY, S. M.; ZIMLICH, T. K.; MIRJAFARI, A.; O'Brien, R. A.; Davis, J. H. Thermo-physical Properties of Imidazolium-Based Lipidic Ionic Liquids. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.58, p.1516-1522, 2013.

Ribeiro Júnior. J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. UFV. Viçosa. 2001. 301 p.

SIANGCO, K. R.; LERON, R. B.; LI, M-H. Densities, refractive indices, and viscosities of N,N-diethylethanol ammonium chloride–glycerol or –ethylene glycol deep eutectic solvents and their aqueous solutions. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.65, p.65–72, 2013.

VICENTE, F. A.; MALPIEDI, L. P.; SILVA, F. A.; JR. PESSOA, A.; COUTINHO, J. A. P.; VENTURA, S. P. M. Design of novel aqueous micellar two-phase systems using ionic liquids as co-surfactants for the selective extraction of (bio) molecules. **Separation and Purification Technology**, v.135, p.259-267, 2014.

XU, L. CUI, X.; ZHANG, Y.; FENG, T.; LIN, R.; LI, R.; LI, X.; JIE, H. Measurement and correlation of electrical conductivity of ionic liquid [EMIM][DCA] in propylene carbonate and *g*-butyrolactone. **Electrochimica Acta**, v. 174, p.900-907, 2015.

WU, T.-Y.; CHEN, B.-K.; HAO, L.; KUO, C.-W.; SUN, I-W. Thermophysical properties of binary mixtures {1-methyl-3-pentylimidazolium tetrafluoroborate + polyethylene glycol methyl ether}. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical**, v.43, p.313–321, 2012.

ARTIGO 2

Massa específica, índice de refração, condutividade elétrica, volume específico aparente e coeficiente de expansão térmica das misturas binárias de água + PEG 1500 e PEG 4000 em (293,15 a 323,15) K e das fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG 1500 ou 4000 e ([C₂mim]Cl)

RESUMO

Soluções aquosas de polietilenoglicol são frequentemente utilizados em processos envolvendo a separação e ou purificação de materiais biológicos. Propriedades termofísicas de soluções aquosas de polietilenoglicol 1500 g.mol⁻¹ e 4000 g.mol⁻¹ foram medidas como função da temperatura $T = (293,15, 303,15, 313,15 \text{ e } 323,15) \text{ K}$ e fração mássica $w = (0,05, 0,125, 0,20, 0,275, 0,35, 0,425 \text{ e } 0,50)$. A massa específica das soluções aquosas do polietilenoglicol 1500 e do polietilenoglicol 4000 variaram de $(0,995\text{-}1,087) \text{ g.cm}^{-3}$ e $(0,996\text{-}1,089) \text{ g.cm}^{-3}$, respectivamente. O índice de refração das soluções aquosas do polietilenoglicol 1500 e do polietilenoglicol 4000 variaram de $(1,3352\text{-}1,4057)$ e $(1,3349\text{-}1,4075)$, respectivamente. O volume específico aparente variou entre $(0,756\text{-}0,849) \text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ e $(0,751\text{-}0,850) \text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$, para as soluções aquosas do polietilenoglicol 1500 e do polietilenoglicol 4000, respectivamente. A condutividade elétrica variou de $(39,05\text{-}107,98) 10^{-3} \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $(32,54\text{-}106,24) 10^{-3} \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, para as soluções aquosas do polietilenoglicol 1500 e do polietilenoglicol 4000, respectivamente. Modelos polinomiais para as propriedades como função da fração de massa dos polímeros e temperaturas foram ajustados, observando boa concordância. Pode-se observar que todos os valores da caracterização das fases, estão dentro da faixa estudada para as misturas binárias.

Palavras-Chave: Polímero, fração mássica, propriedades termodinâmicas.

1. INTRODUÇÃO

Sistemas tradicionais de extração líquido-líquido (ELL) são muito empregados nas indústrias para processos de pré-concentração, extração e purificação de compostos de interesse econômico, utilizando solventes orgânicos que geralmente são tóxicos, cancerígenos e inflamáveis (DA SILVA, et al., 2006). Para extração e purificação de proteínas e biomoléculas, no entanto o método clássico de extração líquido-líquido não é adequado, devido a sensibilidade destes compostos a desnaturação promovida por solventes orgânicos (SAMPAIO et al., 2012).

Neste contexto, uma alternativa a ELL tradicional é o sistema aquoso bifásico (SAB), que sob determinadas condições de composição e temperatura se divide em duas fases em equilíbrio termodinâmico. Eles podem ser formados pela mistura de água, com dois polímeros estruturalmente diferentes (KULAGUIN-CHICAROUX e ZEINER, 2014), por um polímero e um eletrólito (SOUZA JR et al., 2013), ou por dois eletrólitos (ZAFARANI-MOATTAR e HAMZEZHARDEH, 2007). Este método apresenta características importantes que incluem baixo custo e toxicidade, pequeno valor de tensão interfacial, e alto conteúdo de água, que permite um ambiente favorável no qual solutos podem ser separados e purificados (ASENJO e ANDREWS, 2011; RODRIGUES et al., 2013; RENGIFO et al., 2015).

Sistemas aquosos bifásicos (SAB's) contendo polímero sintético (PEG) tem sido utilizado para extração, separação e purificação de diversos solutos tais como proteínas (ALCÂNTARA et al., 2014), enzimas (SILVERIO et al., 2012), antibióticos (ROSA et al., 2010), ácidos nucleicos (SILVERIO et al., 2010), moléculas orgânicas (MAGESTE et al., 2012). A transferência de um soluto de uma fase para outra fase no SAB depende fortemente dos componentes do sistema, bem como das propriedades termodinâmicas intensivas das duas fases em equilíbrio, tais como índice de refração e massa específica (BARBOSA et al., 2015). Consequentemente, informações relativas ao comportamento dinâmico de soluções aquosas de PEG 1500 e PEG 4000 são necessários para a concepção de processos biotecnológicos em que estes polímeros são utilizados.

Neste estudo objetivou-se determinar as propriedades termodinâmicas densidade, índice de refração, condutividade elétrica, volume específico aparente e coeficiente de expansão térmica de soluções aquosas de polietilenoglicol (1500 e 4000) $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ em diferentes frações mássicas $w = (0,05, 0,125, 0,20, 0,275, 0,35, 0,425 \text{ e } 0,50)$, e das fases dos sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (1500 ou 4000) + cloreto de 1 etil 3 metil imidazólio + água, em diferentes temperaturas .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

O polietilenoglicol 1500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (CAS: 25322-68-3) e 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (CAS: 25322-68-325322-68-3) da Synth, Brasil. O líquido iônico utilizado foi o cloreto 1-etil-3-metil imidazólio ($[\text{C}_2\text{mim}]\text{Cl}$) ($\geq 95\%$ de pureza; CAS: 65039-09-0) foi adquirido da Sigma Aldrich. Foi utilizada água destilada no preparo das soluções. Todo o experimento foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Itapetinga - Bahia.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo de soluções

As soluções aquosas do polietilenoglicol 1500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PEG 1500) e 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PEG 4000) e do ($[\text{C}_2\text{mim}]\text{Cl}$) foram preparadas utilizando uma balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) com uma precisão de $\pm 0,0001 \text{ g}$. Soluções estoques de PEG 1500 e PEG 4000 ($w=0,50$) foram preparadas e quantidades apropriadas dessa solução foram diluídas com água destilada para obter as concentrações desejadas $w = (0,05, 0,125, 0,2, 0,275 \text{ e } 0,35, 0,425, 0,50)$. Solução estoque de ($[\text{C}_2\text{mim}]\text{Cl}$) foi preparada na fração mássica de 0,80.

As análises foram realizadas em todas as soluções preparadas nas temperaturas de $T = (293,15, 303,15, 313,15 \text{ e } 323,15) \text{ K}$, que correspondem às temperaturas relativas $T = (0,9832, 1,0168, 1,0503, 1,0839)$, respectivamente.

2.2.2. Preparo dos sistemas

Os sistemas compostos por PEG + ([C₂mim]Cl) + água foram preparados utilizando soluções estoque de PEG em água e ([C₂mim]Cl) em água. Foram utilizados dois pontos globais para cada sistema LI-PEG, os quais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composições globais para os sistemas formados por LI + PEG + água, expressas em porcentagem mássica (% w/w).

Ponto Global	303,15 K		313,15 K		323,15 K	
	LI	PEG	LI	PEG	LI	PEG
PEG 1500						
1	41	21	44	20	42	24
2	43	23	46	22	44	26
PEG 4000						
1			38	22	45	20
2			40	24	27	22

Os sistemas foram obtidos em cada temperatura, com composições conhecidas em tubos de centrífuga graduados de fundo cônico, a partir da massa do líquido iônico, PEG e água para uma massa total do sistema de 10 g. A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada (SP LABOR, modelo Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a uma força centrífuga de 2000 g por 10 minutos, para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, durante 12 horas em estufa B.O.D (LONGEN SCIENTIFC, modelo LG340 FT220), nas temperaturas de trabalho estudadas, para se alcançar o equilíbrio das fases. Todas as soluções e diluições foram preparadas, usando uma balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) com uma precisão de $\pm 0,0001 \text{ g}$, na pesagem dos reagentes para que o erro obtido a partir do balanço de massa fosse reduzido.

Alcançado o equilíbrio, uma alíquota de cada uma das fases resultante foi separada utilizando seringa de 5 mL com agulhas longas. Primeiramente, coletou-se a fase superior até que restasse uma camada de aproximadamente 5 mm desta fase acima da interface. Este procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada. Em seguida, após a coleta da fase superior, uma seringa foi introduzida cuidadosamente na célula de equilíbrio para a retirada da fase inferior, evitando que a interface fosse perturbada. As fases foram coletadas, pesadas e armazenadas em recipientes com tampa sob refrigeração até que todas as análises fossem realizadas.

2.2.3. Massa específica, índice de refração, condutividade elétrica, volume específico aparente e coeficiente de expansão térmica

As massas específicas das soluções foram determinadas utilizando-se um Densímetro Digital de Bancada DMA 5000M (ANTON PAAR, Graz, Áustria) com uma precisão de $\pm 5 \times 10^{-6} \text{ g.cm}^{-3}$ e repetibilidade de $\pm 1 \times 10^{-6} \text{ g.cm}^{-3}$ na faixa de operação 0 a 3 g.cm^{-3} . A faixa de temperatura do equipamento é de 273,15 K a 363,15 K com uma precisão de $\pm 0,01 \text{ K}$ e repetibilidade de $\pm 0,001 \text{ K}$.

Para o índice de refração, foi utilizado o refratômetro digital Q767BD (Quimis, Diadema, Brasil) com precisão de $\pm 0,0002$. Este aparelho foi conectado a um banho termostático (Tecnal, Te-184, Piracicaba, Brasil), que permitia o controle da temperatura com uma precisão de 0,1 K. O equipamento foi calibrado com água destilada na temperatura de estudo, em seguida a amostra foi colocada no prisma do refratômetro para proceder à leitura direta.

A condutividade elétrica foi determinada utilizando um condutivímetro digital de bancada Q795m (Quimis, Diadema, Brasil) com precisão de 0,5%. O equipamento foi calibrado com solução padrão de KCl 0,01 M. A temperatura das amostras foram controladas em banho termostático (Tecnal, Te-184, Piracicaba, Brasil), que permitia o controle da temperatura com uma precisão de 0,1 K.

O volume específico aparente ($v_{2\phi}$) foi calculado a partir dos dados da massa específica, utilizando a seguinte equação:

$$v_{2\phi} = \frac{1}{\rho} \left[1 + \frac{\rho_0 - \rho}{w\rho_0} \right] \quad (1)$$

Em que: ρ (g.cm^{-3}) e ρ_0 (g.cm^{-3}) são as massas específicas da mistura binária e água pura, respectivamente.

A massa específica calculada para as misturas binárias foi utilizada para calcular o coeficiente de expansão térmica (α_p) em cada fração mássica, por meio da seguinte equação:

$$\alpha_p = -1 \left(\frac{\partial \rho}{\partial T} \right) \quad (2)$$

Onde: ρ é a massa específica em g.cm^{-3} .

Toda análise estatística foi realizada utilizando o Sistema de SAEG v.9.1 (RIBEIRO JR, 2001). O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), com duas repetições e em triplicata. Aos dados experimentais obtidos foram ajustados modelos polinomiais, onde o coeficiente de correlação foi calculado em relação as médias dos

tratamentos. O coeficiente de correlação entre os valores preditos e reais foram calculados para todos os modelos. O desvio padrão para cada propriedade também foi calculado. Todas as análises foram realizadas considerando um nível de significância de 5%.

Foram ajustados modelos polinomiais dessas propriedades termofísicas em função da temperatura relativa ($T/T_{\text{referência}}$) e da fração mássica dos polímeros, por meio do ajuste do modelo aos dados experimentais (equação 3), obtendo assim o efeito combinado de tais propriedades em relação as variáveis estudadas. Foi considerado 298,15 K como a temperatura de referência ($T_{\text{referência}}$).

$$\psi = \beta_1 + \beta_2 w + \beta_3 T + \beta_4 w^2 + \beta_5 T^2 + \beta_6 wT \quad (3)$$

Onde: ψ é a propriedade termodinâmica e $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$ e β_6 são constantes determinadas a partir dos dados experimentais.

O modelo foi selecionado com base na significância dos parâmetros com base no teste t de Student, valor p menor que 0,05, coeficiente de determinação (R^2) e a raiz quadrada do erro quadrado médio (RMSE).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (V_{ei} - V_{pi})^2} \quad (4)$$

Onde: V_{ei} são os valores experimentais das propriedades, V_{pi} são os valores preditos pelos modelos ajustados e N é o número de observações. O desvio padrão para cada propriedade também foi calculado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Massa específica, índice de refração, condutividade elétrica e volume específico aparente

Na tabela 2 estão apresentados a média e desvio padrão para os valores da massa específica, índice de refração, condutividade elétrica e volume específico aparente para as soluções do PEG 1500, PEG 4000 em todas as condições estudadas. Pode-se observar que a massa específica das soluções aquosas do PEG 1500 e do PEG 4000 variaram de (0,995-1,087) g.cm^{-3} e (0,996-1,089) g.cm^{-3} , respectivamente. O índice de refração das soluções aquosas do PEG 1500 e PEG 4000 variaram de (1,3352-1,4057) e (1,3349-1,4075), respectivamente. O menor valor para ambas propriedades citadas foi encontrado na fração de massa de 0,05, na temperatura relativa de 1,0839 e o maior valor foi verificado na fração de massa de 0,50, ambos na temperatura relativa de 0,9832.

O volume específico aparente variou entre $(0,756-0,849) \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e $(0,751-0,850) \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, para as soluções aquosas do PEG 1500 e PEG 4000, respectivamente. O menor foi verificado na temperatura relativa de 0,9832, na fração mássica de 0,50 e o maior valor na fração mássica de 0,05 e na temperatura relativa de 1,0839.

A condutividade elétrica variou de $(39,05-107,98) 10^{-3} \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $(32,54-106,24) 10^{-3} \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$, para as soluções aquosas do PEG 1500 e PEG 4000, respectivamente, sendo o menor valor encontrado na fração de massa de 0,50, na temperatura relativa de 0,9832 e o maior valor foi verificado na fração de massa de 0,275 para o PEG 1500 e 0,20 para o PEG 4000, ambos na temperatura relativa de 1,0839.

Tabela 2. Massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$) das misturas binárias do PEG 1500 + água e do PEG 4000 + água em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.

W	T (K)	ρ (g.cm ⁻³)		n_D		$v_{2\phi}$ (cm ³ .g ⁻¹)		$\kappa 10^{-3}$ (mS.cm ⁻¹)	
		PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000
0,050	0,9832	1,007±0,001	1,007±0,001	1,3396±0,0001	1,3400±0,0001	0,829±0,001	0,824±0,001	41,35±0,07	48,80±0,60
	1,0168	1,004±0,001	1,004±0,001	1,3384±0,0001	1,3384±0,0001	0,838±0,001	0,832±0,001	42,75±0,54	50,67±3,39
	1,0503	1,000±0,001	1,000±0,001	1,3360±0,0001	1,3367±0,0001	0,849±0,001	0,841±0,001	50,97±0,33	51,35±0,21
	1,0839	0,995±0,002	0,996±0,001	1,3352±0,0001	1,3349±0,0001	0,849±0,001	0,850±0,001	52,36±0,81	51,88±0,85
0,125	0,9832	1,019±0,001	1,020±0,002	1,3498±0,0001	1,3504±0,0001	0,816±0,001	0,812±0,001	79,20±0,61	75,18±0,64
	1,0168	1,016±0,001	1,016±0,005	1,3483±0,0001	1,3488±0,0001	0,826±0,001	0,821±0,001	82,98±0,81	77,72±3,11
	1,0503	1,012±0,001	1,012±0,001	1,3465±0,0001	1,3468±0,0001	0,835±0,001	0,830±0,001	86,97±0,81	79,80±3,68
	1,0839	1,007±0,001	1,007±0,001	1,3450±0,0001	1,3451±0,0001	0,843±0,001	0,840±0,001	88,54±1,88	82,44±2,26
0,20	0,9832	1,032±0,001	1,033±0,003	1,3604±0,0001	1,3607±0,0001	0,803±0,001	0,799±0,001	89,54±0,07	89,30±0,92
	1,0168	1,028±0,001	1,029±0,001	1,3589±0,0001	1,3599±0,0001	0,813±0,001	0,809±0,001	94,76±0,20	97,04±0,83
	1,0503	1,024±0,001	1,024±0,001	1,3572±0,0001	1,3580±0,0001	0,823±0,001	0,819±0,001	100,23±0,54	99,07±0,86
	1,0839	1,019±0,001	1,019±0,001	1,3555±0,0001	1,3563±0,0001	0,828±0,001	0,828±0,001	103,35±0,47	106,24±0,32
0,275	0,9832	1,047±0,001	1,048±0,001	1,3714±0,0001	1,3727±0,0001	0,786±0,001	0,784±0,001	87,02±0,13	80,07±1,70
	1,0168	1,042±0,001	1,043±0,001	1,3694±0,0001	1,3705±0,0001	0,797±0,001	0,795±0,001	94,64±0,41	87,14±0,35
	1,0503	1,037±0,001	1,037±0,001	1,3677±0,0001	1,3684±0,0001	0,807±0,001	0,805±0,001	99,07±0,54	92,15±0,71
	1,0839	1,031±0,001	1,031±0,001	1,3657±0,0001	1,3660±0,0001	0,817±0,001	0,816±0,001	107,98±0,27	98,77±1,06
0,35	0,9832	1,061±0,001	1,063±0,001	1,3834±0,0001	1,3849±0,0001	0,775±0,001	0,767±0,001	74,89±0,47	73,42±1,74
	1,0168	1,055±0,001	1,057±0,001	1,3811±0,0001	1,3829±0,0001	0,789±0,001	0,779±0,001	84,46±0,88	82,93±1,96
	1,0503	1,049±0,001	1,051±0,001	1,3785±0,0001	1,3800±0,0001	0,798±0,001	0,791±0,001	92,29±1,68	87,74±0,81

	1,0839	1,043±0,001	1,045±0,001	1,3759±0,0001	1,3782±0,0001	0,808±0,001	0,801±0,001	102,19±1,61	96,63±0,77
0,425	0,9832	1,075±0,001	1,077±0,001	1,3955±0,0001	1,3965±0,0001	0,761±0,001	0,757±0,001	57,39±0,34	49,36±1,13
	1,0168	1,069±0,002	1,070±0,001	1,3927±0,0001	1,3937±0,0001	0,774±0,001	0,770±0,001	66,97±0,47	59,22±0,35
	1,0503	1,062±0,001	1,063±0,001	1,3902±0,0001	1,3912±0,0001	0,786±0,001	0,782±0,001	77,21±1,01	67,59±0,14
	1,0839	1,056±0,001	1,056±0,001	1,3871±0,0001	1,3887±0,0001	0,795±0,001	0,793±0,001	87,12±0,54	79,02±1,41
0,50	0,9832	1,087±0,001	1,089±0,001	1,4057±0,0001	1,4075±0,0001	0,756±0,001	0,751±0,001	39,05±0,13	32,54±0,64
	1,0168	1,080±0,001	1,082±0,001	1,4034±0,0001	1,4059±0,0001	0,769±0,001	0,764±0,001	50,40±0,20	41,14±1,27
	1,0503	1,073±0,001	1,075±0,001	1,4010±0,0001	1,4026±0,0001	0,781±0,001	0,776±0,001	59,52±0,07	48,78±0,49
	1,0839	1,065±0,001	1,067±0,001	1,3979±0,0001	1,3995±0,0001	0,792±0,001	0,788±0,001	68,62±0,81	58,12±0,64

A massa específica das misturas binárias de PEG 1500 e PEG 4000 + água, diminuíram com o aumento da temperatura e aumentaram com a elevação da fração mássica. Comportamento similar foi observado por Trivedi, Bhanot e Pandey (2010), estudando o efeito da temperatura sobre a densidade de soluções aquosas de polietilenoglicol. A diminuição da massa específica com o aumento da temperatura pode ser atribuída a maior mobilidade das moléculas do líquido, que causa a expansão do volume e a diminuição de interações moleculares (SIONGCO; LERON; LI, 2013). Os valores da massa específica das soluções aquosas do PEG 1500 e do PEG 4000 foram bem próximos, estando de acordo aos resultados encontrados por Kirinčič e Klofutar (1998) que determinaram a massa específica de soluções aquosas de polietilenoglicol de peso molecular na faixa de 300 a 35000 g.mol⁻¹ a 298.15 K e verificaram que os valores da massa específica são praticamente independentes da massa molecular do polietilenoglicol.

Comportamento similar pode ser observado para o índice de refração em todas as frações mássica para o PEG 1500 e PEG 4000. Pode-se verificar que o aumento na fração de massa dos polímeros aumenta o índice de refração e que a diminuição da temperatura diminui o índice de refração das misturas binárias. Comportamento similar foi observado por Costa (et al., 2014), estudando o efeito da temperatura sobre algumas propriedades de soluções aquosas de polietilenoglicol 1500. De acordo com Ohlweiler (1981), o aumento da temperatura provoca uma expansão do volume do líquido, diminuindo o número de moléculas que serão atravessadas por um feixe de luz monocromático, proporcionando uma diminuição no índice de refração das soluções. Com a diminuição da temperatura, ocorre uma condensação das moléculas, aumentando o número de moléculas que serão atravessadas por um feixe de luz monocromático, proporcionando aumento no índice de refração.

O volume específico aparente das misturas binárias de PEG 1500 + água e PEG 4000 + água decresceram com o aumento da fração mássica do polímero e aumentaram com a elevação da temperatura. Comportamento similar foi observado por Sadeghi, Hosseini e Jamehbozorg (2008), estudando o efeito do sal de fosfato de sódio nas propriedades termodinâmicas das soluções aquosas de polietilenoglicol 6000 em diferentes temperaturas.

Pode-se verificar que a condutividade elétrica diminui com o aumento da temperatura e apresentou um efeito parabólico com a fração de massa dos polímeros. Comportamento similar foi encontrado por Costa et al., (2014), estudando o efeito da temperatura sobre algumas propriedades de soluções aquosas de polietilenoglicol 1500, nas frações mássicas entre 0,05-0,25, e verificaram que a condutividade das soluções variou de (66,22-170,29) 10⁻³ mS.cm⁻¹. Esses valores foram superiores ao encontrado no trabalho para o PEG 1500 g.mol⁻¹. Silva et al.,

(2007), estudando as propriedades termofísicas de soluções aquosas de PEG 4000 nas temperaturas de (278,15 e 318,15) K, e encontraram valores na faixa de (28-140) $10^{-3} \text{mS.cm}^{-1}$.

3.2. Efeito combinado da concentração e temperatura

A partir dos dados experimentais obtidos, foram ajustados modelos polinomiais das propriedades termofísicas estudadas em função da temperatura e fração mássica dos polímeros, por meio do ajuste do modelo polinomial de 2º ordem (equação 3) aos dados experimentais, obtendo assim uma expressão correlacionando a temperatura e fração mássica dos polímeros.

A tabela 3 apresenta os coeficientes obtidos a partir da regressão polinomial (eq. 3) para massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$). O ajuste entre os dados experimentais e preditos pelo modelo foi satisfatório, com valores de R^2 maiores que 0,99 para todas as propriedades, exceto para a condutividade elétrica e baixo RMSE.

Tabela 3. Parâmetros ajustados do modelo linear (eq. 3) para massa específica (ρ), índice de refração (n_D), condutividade elétrica (κ) e volume específico aparente ($v_{2\phi}$) das soluções aquosas do PEG 1500 e do PEG 4000 em diferentes frações mássicas e temperaturas.

Propriedades	PEG	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	R^2	RMSE
ρ ($g.cm^{-3}$)	1500	1,0875	0,4238	-0,0917	ns	ns	-0,2468	0,9997	0,0007
	4000	1,0903	0,4316	-0,0945	ns	ns	-0,2507	0,9996	0,0007
n_D	1500	1,3685	0,2271	-0,0366	0,0215	ns	-0,0915	0,9998	0,0004
	4000	1,3731	0,2200	-0,0414	0,0183	ns	-0,0791	0,9998	0,0005
κ ($10^{-3} \text{mS.cm}^{-1}$)	1500	-39,3590	-3,8459	66,3721	-928,5471	ns	439,0542	0,8966	18,1100
	4000	12,9874	-104,5325	18,9901	-906,4687	ns	556,1875	0,9756	4,3978
$v_{2\phi}$ ($\text{cm}^3.g^{-1}$)	1500	0,6378	-0,5304	0,2082	0,0943	ns	0,3126	0,9966	0,0022
	4000	0,5929	-0,4594	0,2471	0,0820	ns	0,2492	0,9971	0,0020

ns: não significativo.

Observa-se, que para a massa específica e para o índice de refração o termo referente a temperatura foi negativo, comprovando que a esta propriedade citada anteriormente foi afetada negativamente com o aumento dessa variável. Isto pode ser explicado que com fornecimento de energia na forma de calor, as interações existentes no sistema enfraquecem, causando uma maior mobilidade das moléculas, que tendem a ocupar volume maior para a mesma unidade de massa de uma condição anterior, diminuindo assim, a massa específica e o índice de refração. Além disso, as misturas binárias, apresentaram coeficiente positivo para a fração mássica de

PEG 1500 e PEG 4000, confirmando que a presença do polímero nos sistemas contribui para o aumento destas propriedades.

Pode-se observar que a condutividade elétrica aumenta em baixas frações mássicas dos polímeros, diminuindo com o aumento da fração mássica dos polímeros.

Para o volume específico aparente o termo referente a temperatura foi positivo, indicando que com o aumento do fornecimento de energia na forma de calor, as moléculas tendem a se afastar e conseqüentemente o volume aumenta.

3.3. Coeficiente de Expansão Térmica

O coeficiente de expansão térmica ou volume de expansividade (α_p) é um indicador para expansão ou contração de um fluido em todas as direções com a temperatura. O coeficiente de expansão térmica foi calculado utilizando a equação 3, utilizando os parâmetros do ajuste da equação 3. Os resultados estão apresentados graficamente na Tabela 4.

Pose-se verificar que o coeficiente de expansão térmica para as misturas binárias de água + PEG 1500 e água + PEG 4000 tiveram uma diminuição com a temperatura. Esse comportamento está de acordo ao encontrado por Muray et al., (2013) estudando propriedades termofísicas de líquidos iônicos e por Wu et al.(2012) que estudaram as propriedades termofísicas de misturas binárias compostas por líquido iônico + polietilenoglicol. Pode-se verificar ainda na tabela 4 que o coeficiente de expansão térmica aumentou com o aumento da concentração dos polímeros.

Tabela 4: Coeficiente de expansão térmica das misturas binárias de água + ([C₂mim]Cl) em diferentes frações mássicas e temperaturas relativas.

W	T (K)	$\alpha_p \cdot 10^{-1} (K^{-1})$	
		PEG 1500	PEG 4000
0,050	0,9832	1,0338±0,001	1,0633±0,001
	1,0168	1,0374±0,001	1,0671±0,001
	1,0503	1,0410±0,001	1,0709±0,001
	1,0839	1,0447±0,002	1,0748±0,001
0,125	0,9832	1,2015±0,001	1,2331±0,002
	1,0168	1,2064±0,001	1,2382±0,005
	1,0503	1,2113±0,001	1,2434±0,001
	1,0839	1,2162±0,001	1,2486±0,001
0,20	0,9832	1,3648±0,001	1,3983±0,003
	1,0168	1,3711±0,001	1,4049±0,001
	1,0503	1,3774±0,001	1,4115±0,001
	1,0839	1,3838±0,001	1,4182±0,001

0,275	0,9832	1,5238±0,001	1,5591±0,001
	1,0168	1,5317±0,001	1,5673±0,001
	1,0503	1,5396±0,001	1,5756±0,001
	1,0839	1,5476±0,001	1,5840±0,001
0,35	0,9832	1,6788±0,001	1,7158±0,001
	1,0168	1,6883±0,001	1,7257±0,001
	1,0503	1,6980±0,001	1,7358±0,001
	1,0839	1,7077±0,001	1,7459±0,001
0,425	0,9832	1,8299±0,001	1,8684±0,001
	1,0168	1,8412±0,002	1,8802±0,001
	1,0503	1,8526±0,001	1,8921±0,001
	1,0839	1,8642±0,001	1,9042±0,001
0,50	0,9832	1,9772±0,001	2,0171±0,001
	1,0168	1,9904±0,001	2,0308±0,001
	1,0503	2,0038±0,001	2,0448±0,001
	1,0839	2,0173±0,001	2,0589±0,001

3.4. Caracterização das fases

As propriedades físicas da fase superior e inferior em sistemas ternários apresentam características distintas em relação à composição e temperatura. Essas informações são necessárias para a concepção e aumento de escala de produção de processos de extrações. Portanto, nas Tabelas de 5 e 6 estão apresentados os valores experimentais da massa específica (ρ), índice de refração (n_D) e condutividade (κ) das fases dos sistemas compostos por PEG 1500+ [C₂mim]Cl + água; PEG 4000+ [C₂mim]Cl + água, nas temperaturas de (303,15, 313,15, e 323,15) K, respectivamente.

Na tabela 5, pode-se observar que a densidade das fases superior e inferior do sistema composto por PEG 1500 + ([C₂mim]Cl) variaram de (1,0799 a 1,0897) g.cm⁻³ e (1,0833 a 1,0959) g.cm⁻³, respectivamente. O índice de refração variou de (1,4397 a 1,4561) na fase superior e (1,4445 a 1,4555) na fase inferior. Por meio da análise dos dados, verificou-se um aumento da massa específica e do índice de refração com o aumento da concentração dos constituintes, tanto na fase superior quanto na fase inferior dos sistemas, como resultado do aumento do comprimento da linha de amarração. Além disso, pode-se verificar que a fase inferior, composta por PEG e água é um pouco mais densa que a fase superior rica em ([C₂mim]Cl) e água.

Em relação ao índice de refração foi observado que a fase superior apresenta valores maiores que a fase inferior por causa do aumento da densidade, que torna a propagação de luz mais difícil. Este comportamento descrito foi também relatado na literatura para soluções contendo polímeros de diferentes massas molares (SANTOS et al., 2012). O mesmo comportamento para a densidade e índice de refração pode ser observado no sistema composto por PEG 4000 + ([C₂mim]Cl) descrita na tabela 6.

Pode-se observar que todos os valores presentes nas tabelas 5 e 6, estão dentro da faixa estudada para as misturas binárias de + ([C₂mim]Cl) + água, PEG 1500 + água e PEG 4000 + água.

Tabela 5. Massa específica, índice de refração e condutividade elétrica para sistemas compostos por PEG 1500 + ([C₂mim]Cl) + água em diferentes temperaturas.

CLA	Fase Superior			Fase inferior		
	ρ (g.cm ⁻³)	n _D	κ (mS.cm ⁻¹)	ρ (g.cm ⁻³)	n _D	κ (mS.cm ⁻¹)
303,15 K						
0,7333	1,0853	1,4447	32,1116	1,0900	1,4493	20,0163
0,5605	1,0897	1,4468	24,2164	1,0959	1,4532	19,9212
313,15 K						
0,4617	1,0822	1,4397	31,8371	1,0858	1,4445	23,1188
0,6047	1,0846	1,4561	37,1634	1,0887	1,4535	21,2976
323,15 K						
0,6115	1,0799	1,4456	69,7321	1,0833	1,4537	23,8136
0,7244	1,0813	1,4478	35,7184	1,0850	1,4555	17,9659

Tabela 6. Massa específica, índice de refração e condutividade elétrica para sistemas compostos por PEG 4000 + ([C₂mim]Cl) + água em diferentes temperaturas.

LA	Fase Superior			Fase inferior		
	ρ (g.cm ⁻³)	n _D	κ (mS.cm ⁻¹)	ρ (g.cm ⁻³)	n _D	κ (mS.cm ⁻¹)
313,15 K						
0,4880	1,0713	1,4293	32,5101	1,0844	1,4538	17,9532
0,6540	1,0776	1,4373	33,1081	1,0858	1,4552	15,8111
323,15 K						
0,4658	1,0793	1,4287	44,4871	1,0808	1,4561	25,3999
0,4983	1,0803	1,4468	37,6488	1,0847	1,4573	21,9663

4. Conclusão

Foi possível verificar que as propriedades densidade, índice de refração, volume específico aparente e condutividade elétricas foram afetadas pela fração mássica dos polímeros e temperatura. Foi possível verificar que o coeficiente de expansão térmica aumentou com o aumento da temperatura e fração mássica dos polímeros. Modelos polinomiais para as propriedades apresentaram ajuste satisfatório aos dados experimentais. Foi verificado que com o aumento do CLA houve um aumento nas propriedades das fases, devido a maior concentração dos constituintes na fases superiores e inferiores.

5. Referências

ALCÂNTARA, L. A. P.; AMARAL, I. V.; BONOMO, R. C. F.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; MINIM, V. P. R.; MININM, L. A. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylen glycol) and sodium polyacrylate. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 409-415, 2014.

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

BARBOSA, A. A.; BONOMO, R. C. F.; MARTINS, C. V.; FONTAN, R. C. I.; SOUZA JR, E. C. S.; MINIM, L. A.; PIGNATA, M. C. Equilibrium Data and Physical Properties of Aqueous Two Phase Systems Formed by PEG (1500 and 4000) $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ + Sodium Sulfate +Water at Different Temperatures and pH 2. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 61, p.3-11, 2016.

BEGUM, S. K.; RATNA, S. A.; CLARKE, R. J.; AHMED, M. S. Excess molar volumes, refractive indices and transport properties of aqueous solutions of poly(ethylene glycol)s at (303.15–323.15) K. **Journal of Molecular Liquids**, v.202, p.176–188, 2015.

COSTA, B. S.; GARCIA-ROJAS, E. E.; COIMBRA, J. S. R.; TEIXEIRA, J. A.; TELIS-ROMERO, J. Density, Refractive Index, Apparent Specific Volume, and Electrical Conductivity of Aqueous Solution of Poly(ethylene glycol) 1500 at Diffetent Temperaturas. **Journal Chemical and Engineering Data**, v. 59, p. 339-345, 2014.

DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J. COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Sistema aquosos bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1332-1339, 2006.

KIRINČIČ, S. E KLOFUTAR, C. A volumetric study of aqueous solutions of polyethylene glycol sat 298.15 K. **Fluid Phase Equilibria**, v.149, p.233–247, 1998.

KULAGUIN-CHICAROUX, A.; ZEINER. T. Novel aqueous two-phase system based on a hyperbranched polymer. **Fluid Phase Equilibria**, v.362, p.1–10, 2014.

MAGESTE, A. B.; SENRA, T. D. A.; HESPANHOL, M. C. S.; BONOMO, R. C. F. B.; DA SILVA, L. H. M. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69-77, 2012.

MURAY, S. M.; ZIMLICH, T. K.; MIRJAFARI, A.; O'Brien, R. A.; Davis, J. H. Thermo-physical Properties of Imidazolium-Based Lipidic Ionic Liquids. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 58, p.1516-1522, 2013.

OHLWEILER, O. A. 1981. Fundamentos de Análise Instrumental, Livros Técnicos e Científicos S/A, Rio Janeiro.

RENGIFO, A. F. C.; FERREIRA, G. M. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M. Phase diagrams, densities and refractive indexes of poly(ethylene oxide) + organic salts + water aqueous two-phase systems: Effect of temperature, anion and molar mass. **Fluid Phase Equilibria**, v. 406, p.70-76, 2015.

RIBEIRO JÚNIOR. J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. UFV. Viçosa. 2001. 301 p.

RODRIGUES, G. D.; DE LEMOS, L.R.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H. Application of hydrophobic extractant in aqueous two-phase systems for selective extraction of cobalt, nickel and cadmium. **Journal of Chromatography A**, v.1279, p.13–19,2013.

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

SADEGHI, R.; HOSSEINI, R.; JAMEHBOZORG, B. Effect of sodium phosphate salts on the thermodynamic properties of aqueous solutions of poly(ethylene oxide) 6000 at different temperatures. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v.40, p.1364–1377, 2008.

SAMPAIO, V. S.; BONOMO, R. C. F.; FILHO, E. S. M.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Physical Properties and Liquid–Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems

Containing Poly(ethylene glycol) + Potassium Chloride + Sodium Polyacrylate. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 57, p.3651-3657, 2012.

SANTOS, I. J. B.; 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. **Journal of Chemical and Engineering Data**, 57, p. 274–279. 2012.

SILVA, R. M. M.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R.; ROJAS, E. E. G.; DA SILVA, L. H. M.; MINIM, V. P. R. Density, electrical conductivity, kinematic viscosity, and refractive index of binary mixtures containing poly(ethylene glycol) 4000, lithium sulfate, and water at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 52, p.1567–1570, 2007.

SILVÉRIO, S. C.; FERREIRA, L. A.; MARTINS, J. A.; MARCOS, J. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A. Lysozyme and bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol–phenylalanine conjugate polymer/salt aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 322–323, p.19–25, 2012.

SILVERIO, S. C.; RODRIGUEZ, O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Solute partitioning in polymer–salt ATPS: the Colander equation. **Fluid Phase Equilibria**, v.296, p.173–177, 2010.

SIONGCO, K. R.; LERON, R. B.; LI, M-H. Densities, refractive indices, and viscosities of N,N-diethylethanol ammonium chloride–glycerol or –ethylene glycol deep eutectic solvents and their aqueous solutions. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 65, p.65–72, 2013.

SOUZA JR, E. C.; DINIZ, R. S.; COIMBRA, J. R.; LEITE, M. O.; SANTOS, G. R.; RODRIGUES, A. M. C.; DA SILVA, L. H. M. Measurements and Modeling of Liquid–Liquid Equilibrium of Polyethylene Glycol 400, Sodium Phosphate, or Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems at (298.2, 308.2, and 318.2) K. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 58, p.2008-2017, 2013.

TRIVEDI, S.; BHANOT, C.; PANDEY, S. Densities of poly(ethylene glycol) + water over the temperature range (283.15 to 363.15) K, **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.42, p.1367–1371, 2010.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMZEZHARDEH, S. Liquid–liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and potassium phosphate

or dipotassium hydrogen phosphate at 298.15 K, **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.52, p.1686–1692, 2007.

Dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos composto por polietilenoglicol ([C2min]Cl) + água e sua aplicação na partição da α -amilase

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se o processo de extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos (SAB) para a partição da α -amilase. Os SAB's foram compostos por polietilenoglicol (PEG) 1500 g.mol⁻¹ ou polietilenoglicol (PEG) 4000 g.mol⁻¹ + cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio + água. Inicialmente foram obtidos dados de equilíbrio formados por PEG 1500 + cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio+ água, PEG 4000 + cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio+ água, nas temperaturas de (293,15, 303,15, 313,15 e 323,15) K, pela aplicação do método turbidimétrico. Posteriormente foi realizada a partição da α -amilase, onde foi verificado o coeficiente de partição da proteína, atividade, seletividade e recuperação teórica. Foi verificado que a diminuição da temperatura e o aumento da massa molar do polímero favorecem a formação de duas fases. Foi verificado também que a α -amilase teve preferência pela fase inferior composta por PEG.

Palavras-Chave: Coeficiente de partição, diagrama de fase, linha de amarração.

1. INTRODUÇÃO

A α -amilase (1,4- α - D glucanohidrolase glucana, EC 3.2.1.1) constitui um importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas, sendo encontradas em plantas, animais e microrganismos. Pertence à família das hidrolases, que cliva aleatoriamente as ligações α -1,4 entre unidades adjacentes de glicose no amido e polissacáridos relacionados para produzir principalmente maltose e maltodextrinas (MIHELIN et al., 2010; SAHNOUN et al., 2012; SINGH & KAYASTHA, 2014). As α -amilases apresentam vasta gama de aplicações no setor industrial, tais como na preparação de xaropes de glucose, fabricação de cerveja, fermento, têxtil e detergente (MICHELIN et al., 2010). Devido a vasta gama de aplicação da α -amilase o interesse em purificá-las vem apresentando grande potencial.

As técnicas mais utilizadas para a purificação de proteínas/enzimas são a precipitação com sal (PEI et al., 2009), diálise, filtração, eletroforese (PIERGIOVANNI, 2007; WANG et al., 2004), micelas reversas (SHIN et al., 2003), e cromatografia iônica e de afinidade (ZATLOUKALOVÁ, et al., 2004). No entanto, as principais limitações para a produção de enzimas puras são os vários passos necessários para purificação, que em geral, causa perdas de atividade enzimática e exigem alto consumo de energia e de produtos químicos (MARTÍNEZ-ARAGÓN et al., 2009). Uma alternativa para a purificação destas enzimas sem interferir em sua atividade, com viabilidade econômica é a utilização de sistemas aquosos bifásicos (KRONER et al., 1978; SELBER et al., 2001).

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) são formados por duas fases que coexistem em equilíbrio, devido a dissolução, em concentrações apropriadas, de pares de solutos em água (FREIRE et al., 2012). A separação de compostos em SAB tem como princípio a utilização de duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente imiscíveis que podem ser obtidas pela adição de duas soluções aquosas de dois polímeros hidrófilos naturais ou sintéticos, de uma solução polimérica e uma solução salina ou pela combinação de dois sais (PEREIRA et al., 2013).

Ao se fazer um estudo da partição em sistemas aquosos bifásicos é necessário conhecer os dados de equilíbrio dos sistemas que serão utilizados. Para cada sistema seja polímero/polímero, polímero/sal, polímero/líquido iônico existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases. Alguns já estão disponíveis na literatura, porém, é importante ao testar um novo sistema que se construa um diagrama nas condições de trabalho a serem utilizadas na extração (temperatura, massa molar do PEG, pH, entre outros).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho estudar o comportamento do sistema aquoso bifásico constituído por líquido iônico (cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio) e polietilenoglicol (1500 g.mol⁻¹ ou 4000 g.mol⁻¹) e água nas temperaturas de (293,15, 303,15, 313,15 e 323,15) K para partição da α -amilase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Os reagentes utilizados na condução deste trabalho foram: cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio ([C2min]Cl) com grau de pureza $\geq 95\%$, albumina do soro bovino (BSA) com grau de pureza 98% (CAS: 232-936-2), a α -amilase com grau de pureza, o ácido 3,5 dinitrosalicílico e o azul de coomassie G250 foram adquiridos da Sigma Aldrich Brasil. Alcool etílico 95%, ácido fosfórico 85% e polietilenoglicol 1500 g.mol⁻¹ e 4000 g.mol⁻¹ da Synth, Brasil.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo das soluções

Para montagem do sistema aquoso bifásico composto por PEG + ([C2min]Cl) + água, foram preparadas soluções estoque de PEG em água e ([C2min]Cl) em água.

2.2.2. Determinação das curvas binodais

As curvas binodais dos sistemas aquosos foram formadas utilizando soluções aquosas de PEG 1500 + ([C2min]Cl) + água, PEG 4000 + ([C2min]Cl) + água, nas temperaturas de (293,15, 303,15, 313,15 e 323,15) K. Para esta determinação foi aplicado o método turbimétrico (ALBERTSSON, 1986), que indica o início da região bifásica.

O procedimento consistiu em pesar 1,00 g da solução estoque de PEG em tubos de ensaio, em uma balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) com precisão de $\pm 0,0001$ g. O tubo contendo a solução de PEG foi levado ao banho termostático (Tecnal, Te-184, Piracicaba, Brasil) com precisão $\pm 0,1$ K, onde foi incubado até atingir o equilíbrio térmico, na temperatura experimental desejada. Em seguida, foram adicionadas alíquotas da solução estoque de ([C2min]Cl) (50 μ L) com uma pipeta automática, até ocorrer à turvação do sistema (solução bifásica). A quantidade de ([C2min]Cl) que provocou a turvação foi registrada e em seguida, o sistema foi titulado com água destilada até o desaparecimento da turvação, registrando o seu valor. Esse procedimento foi repetido continuamente até a obtenção dos pontos necessários para fazer a curva. A equação empírica sugerida por Hu et al., (2003) foi ajustada as curvas binodais:

$$X_{LI} = \exp(a + b (X_{PEG})^{0,5} + cX_{PEG} + d(X_{PEG})^2) \quad (1)$$

Em que X_{LI} e X_{PEG} são as composições em fração mássica do([C2min]Cl)e PEG, respectivamente, e a, b, c e d são parâmetros de ajuste da equação.

2.2.3. Determinação das linhas de amarração

As linhas de amarração foram obtidas utilizando o método gravimétrico descrito por Merchuk et al. (1998), que consiste em selecionar um ponto acima da região bifásica, através do qual a linha de amarração vai passar. Foram utilizados dois pontos globais para cada sistema ([C2min]Cl)-PEG. Os pontos que deram origem a linha de amarração foram obtidos em cada temperatura, com composições conhecidas em tubos de centrífuga graduados de fundo cônico, a partir da massa das soluções estoques de ([C2min]Cl), PEG e água para uma massa total do sistema de 20 g.

A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada (SP LABOR, modelo Sp-701, Presidente Prudente, Brasil) a uma força centrífuga de 2000 g por 10 minutos, para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, durante 12 horas em estufa B.O.D, nas temperaturas de trabalho estudadas, para se alcançar o equilíbrio das fases. Todas as soluções e diluições foram preparadas, usando uma balança analítica M254A (Bel Engineering,

Piracicaba, Brasil) com precisão de $\pm 0,0001$ g) na pesagem dos reagentes para que o erro obtido a partir do balanço de massa fosse reduzido.

Alcançado o equilíbrio, uma alíquota de cada uma das fases resultante foram separadas utilizando seringa de 5 mL com agulhas longas. Primeiramente, coletou-se a fase superior até que restasse uma camada de aproximadamente 5 mm desta fase acima da interface. Este procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada. Em seguida, após a coleta da fase superior, uma seringa foi introduzida cuidadosamente na célula de equilíbrio para a retirada da fase inferior, evitando que a interface fosse perturbada. As fases foram coletadas, pesadas e armazenadas em recipientes com tampa sob refrigeração até que todas as análises fossem realizadas.

2.2.4. Quantificação dos Componentes do Sistema

Depois das fases terem sido separadas, elas foram pesadas. A concentração de cada componente nas fases coletadas foi estimada pela aplicação da regra da alavanca, na relação entre a composição em massa da fase superior e a composição total do sistema.

Para determinação dos componentes da linha de amarração o seguinte sistema de quatro equações (Equações 2-5) e quatro incógnitas (X_{LI}^s , X_{LI}^i , X_{PEG}^s , X_{PEG}^i) foi resolvido (HU et al., 2003):

$$X_{LI}^s = \exp(a + b (X_{PEG}^s)^{0,5} + cX_{PEG}^s + d(X_{PEG}^s)^2) \quad (2)$$

$$X_{LI}^i = \exp(a + b (X_{PEG}^i)^{0,5} + cX_{PEG}^i + d(X_{PEG}^i)^2) \quad (3)$$

$$\frac{X_{LI}^s - X_{LI}^M}{X_{LI}^M - X_{LI}^i} = \frac{m_i}{m_s} \quad (4)$$

$$\frac{X_{PEG}^M - X_{PEG}^s}{X_{PEG}^i - X_{PEG}^M} = \frac{m_i}{m_s} \quad (5)$$

Onde X_{LI}^s , X_{PEG}^s , X_{LI}^i , X_{PEG}^i , X_{LI}^M , X_{PEG}^M são as composições em fração mássica do LI e do PEG na fase superior, inferior e na mistura, respectivamente. E m_i e m_s é a massa da fase inferior e superior, respectivamente.

O comprimento da linha de amarração foi obtido utilizando a seguinte equação:

$$CLA = \sqrt{[\Delta C_1]^2 + [\Delta C_2]^2} \quad (6)$$

Onde: $[\Delta C_1]$ e $[\Delta C_2]$ correspondem a diferença de concentração de componente 1 (C_1) e componente 2 (C_2) nas fases superior e inferior expressa em %m/m, respectivamente.

A inclinação da linha de amarração foi determinada pela equação:

$$ILA = (C_{C2S} - C_{C2I}) / (C_{C1S} - C_{C1I}) \quad (7)$$

Onde, C_{1S} e C_{1I} são as concentrações do componente 1 na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto, C_{2S} e C_{2I} são as concentrações do componente 2 na fase superior e inferior, respectivamente.

2.3. Partição das amilases em SAB's

As linhas de amarração foram utilizadas para construção do sistema aquoso bifásico utilizado para partição da α -amilase. Foram utilizados PEG 1500 ou PEG 4000 e ([C2min]Cl), onde a composição global foi obtida na região acima da curva binodal. As composições globais estão apresentadas na tabela 1. Os sistemas foram formados com adição de quantidades adequadas da solução estoque de PEG + ([C2min]Cl) + água, PEG + sulfato de sódio + água e PEG + sulfato de zinco + água para uma massa total de 20 g, em tubos de centrífuga cônico, misturados e mantidos em repouso durante 24 horas em estufa B.O.D. nas temperaturas estudadas. Após o equilíbrio de fases dos sistemas, foi realizada a separação das fases superior e inferior, da forma supracitada, para fazer a partição da amilase. Foi adicionado (100 μ L) da solução enzimática a 50mg/mL diretamente na fase de inferior, durante a montagem dos sistemas, em um volume de 2,5 mL. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL da fase superior ao sistema. Os sistemas foram submetidos à agitação durante 3 minutos e, então, centrifugados a 2000g, por 20 minutos, a fim de acelerar a separação de fases. Depois, os tubos foram mantidos em repouso, em estufa B.O.D., por 24 horas, nas temperaturas de operação estabelecidas. Posteriormente, as fases foram coletadas com seringas, para posterior determinação da atividade enzimática e determinação do teor de proteína, descritas nos itens 2.3.1 e 2.3.2, respectivamente.

Tabela 1. Composições globais para os sistemas aquosos bifásicos utilizados para partição da α -amilase, expressas em porcentagem mássica (% w/w).

LA	T (K)	PEG 1500 +([C2min]Cl)		PEG 4000+([C2min]Cl)	
		PEG	LI	PEG	LI
1	303,15	21	41		
2		23	43		
1	313,15	20	44	22	38
2		22	46	24	40
1	323,15	24	42	20	45
2		26	44	22	47

2.3.1. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da α -amilase foi determinada utilizando metodologia adaptada de Okolo et al. (1995). A mistura consiste de 0,5 μ L das fases apropriadamente diluídas em 0,5 mL de amido solúvel a 1% (m/v) solubilizada em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,6). Após

30 minutos de incubação a 50°C os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme Miller (1959), utilizando comprimento de onda de 540 nm. Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1µmol de açúcar redutor por mL de extrato por minuto sob as condições de ensaio descritas.

$$U/mL = ART \times \frac{V_T}{0,18 \times V_c \times T_H} \quad (8)$$

Onde:

ART: Açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg/mL);

V_T: Volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume do caldo) (mL);

V_c: Volume do caldo utilizado na hidrólise (mL);

T_H: Tempo de hidrólise (min.);

0,18: 1µmol de glicose (mg).

2.3.2. Determinação do teor de Proteína

O mesmo extrato enzimático utilizado na determinação da atividade da α-amilase foi utilizado para determinar a concentração de proteína pelo método de Bradford (1976) a 595 nm, em espectrofotômetro. Foi utilizando albumina sérica bovina como padrão. Os resultados foram expressos em atividade amilásica específica (UA/mg de proteína).

2.3.3. Determinação dos parâmetros de partição

O coeficiente de partição foi utilizado para quantificar o grau de separação alcançado na extração. O coeficiente de partição para atividade enzimática (K_e) é definido como razão da atividade enzimática na fase superior (A_{sup}) pela inferior do sistema (A_{inf}) como descrito na equação 9.

$$K_e = \frac{[A]_{sup}}{[A]_{inf}} \quad (9)$$

O coeficiente de partição da proteína (K_p), o qual é a relação entre a concentração de equilíbrio da proteína na fase superior (C_{sup}) e inferior (C_{inf}) foi determinado como descrito na equação 10.

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (10)$$

A seletividade (S) foi calculada como a razão entre o coeficiente de partição da atividade da α-amilase (K_e) e o coeficiente de partição da proteína total (K_p) (equação 11).

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (11)$$

Para que se possa selecionar o SAB com melhor capacidade de extração das proteínas estudadas, foi calculada a recuperação teórica (y , %) do sistema, utilizando-se a Equação 12 (PICÓ, 2006):

$$y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_e)} \quad (12)$$

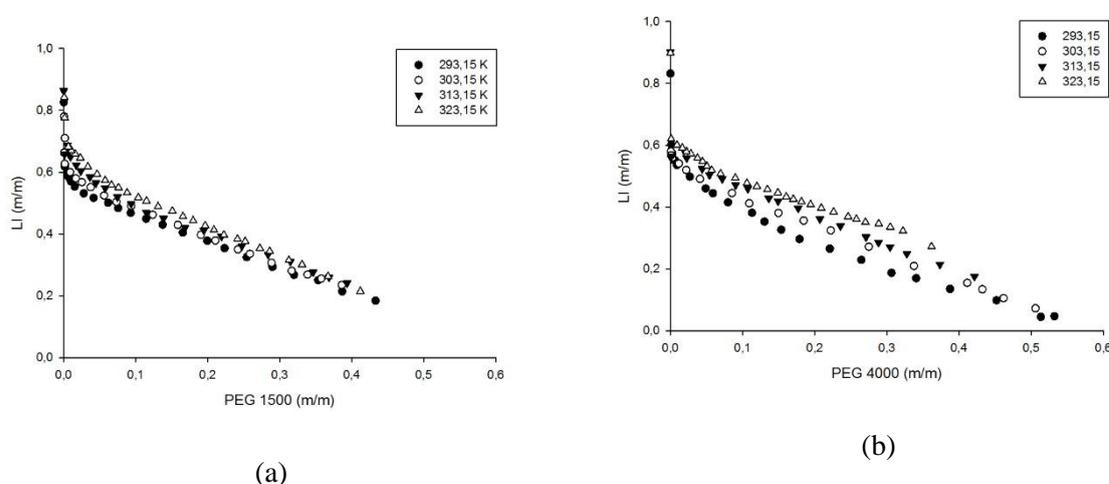
Onde que R corresponde a razão entre os volumes da fase superior e inferior e K corresponde ao coeficiente de partição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Diagramas de Equilíbrio

Os diagramas de fases para os sistemas PEG-([C2min]Cl) são apresentados na Figura 1 (a e b) (em função da temperatura); e na figura 2 (a, b, c e d) (em função da massa molar do PEG). Esses diagramas fornecem informações sobre a concentração dos componentes necessárias para a formação das duas fases. Quanto mais a curva se aproxima da origem, menor a concentração de ([C2min]Cl) e PEG necessária para formar o SAB's. Abaixo das curvas obtidas para cada condição estudada de temperatura ou massa molar do polímero, a mistura dos constituintes do sistema encontra-se miscíveis formando uma fase homogêneas e acima das curvas verifica-se a formação de duas fases.

Figura 1. Diagrama de fases do sistema PEG + ([C2min]Cl) + água, para o PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b), em diferentes temperaturas.

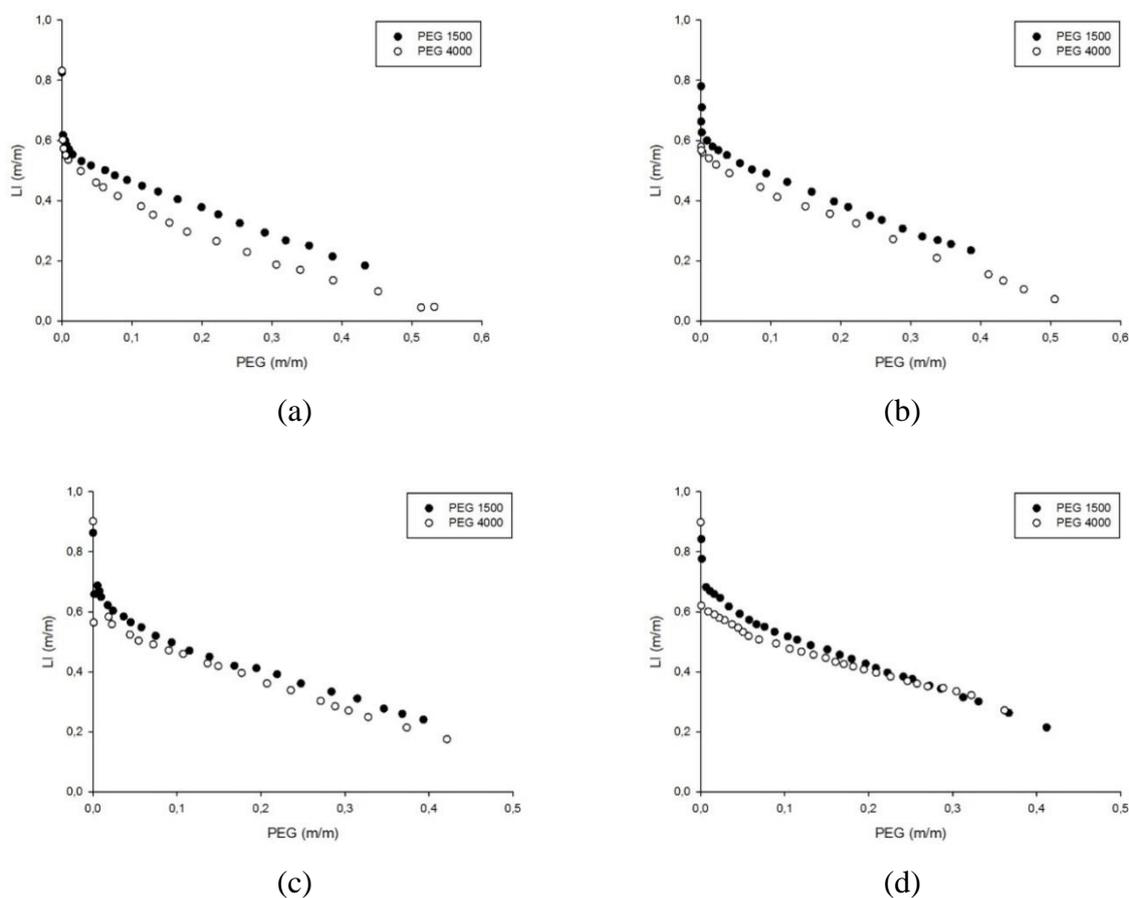


A partir da análise dos dados das binodais, verificou-se que a medida que a temperatura aumenta a solubilidade do PEG aumenta, isto é, temperaturas mais baixas são favoráveis para

a formação das duas fases. Esse comportamento está de acordo com o encontrado por Freire et al., (2012a) que estudaram as interações que controlam o comportamento de fases compostas de PEG (1000, 2000, 3400 e 4000) e LI ([C4mim]Br, [C4mim]Cl, [C4mim]CH₃SO₃, [C4mim]CH₃CO₃ e [C4mim]CF₃SO₃, nas temperaturas (298, 15, 308,15 e 323,15) K. Comportamento oposto foi observado Souza Jr et al., (2013) ao estudar sistemas formados por PEG 400 e citrato de sódio e PEG 400 e fosfato de sódio.

Ao se comparar os sistemas na mesma temperatura e variando a massa molar do polímero (Figura 1) pode-se observar que o PEG 4000 de maior massa molar apresentou uma maior região bifásica. Uma tendência semelhante é observada no SAB convencional formado por PEG e sal inorgânico. Na figura 2 (a, b, c e d) está demonstrado como as curvas binodais deslocam-se para as menores concentrações de PEG e ([C2min]Cl) com o aumento da massa molar do polímero. Rodriguez et al. (2009) verificaram que polímeros com maiores massas moleculares são menos solúveis em líquido iônico e são mais facilmente separadas do meio aquoso, devido a diminuição da solubilidade do PEG em água à medida que a massa molar do polímero é aumentada. Este fato está ligado ao aumento da hidrofobicidade do polímero que conduz a uma menor interação entre esta molécula e o ([C2min]Cl) (molécula hidrofílica).

Figura 2. Diagrama de fases do sistema PEG + ([C2min]Cl) + água, a 293,15 K (a), 303,15 K (b), 313,15 K (c) e 323,15 K (d), em diferentes massas molares do polímero.



As tendências mencionadas acima no comportamento de fases têm que ser examinadas tendo em conta as interações que podem existir no nível molecular, incluindo interações de hidrogênio, interações de Coulomb, entre outras. Os átomos de hidrogênio do anel imidazólio (particularmente C2-H) podem interagir com os átomos de oxigênio com o grupo terminal OH dos grupos do PEGs (SEDDON, 1997; WANG et al., 2004). O OH pode formar interações de hidrogênio fortes com os ânions de cloreto (do ([C2min]Cl)), (WANG et al., 2004; REMSING et al., 2006) enquanto os ânions também podem interagir com os cátions. Além disso a flexibilidade conformacional (por exemplo, enrolado ou aleatória) das cadeias do PEG, bem como a formação dos domínios polares, não polares e segregados do LI, poderia adicionar uma complexidade ainda maior. Rodriguez et al., (2009) estudaram diagramas de fase composto por cloreto de 1-etil-3-metil imidazólio ([C2mim]Cl) e cloreto de 1-butil-3-metil imidazólio ([C4mim]Cl) em diferentes massas moleculares do PEG (2000 ou 3400) e verificaram que o ([C2mim]Cl), eram mais propícios a formar fase do que o ([C4mim]Cl). Eles relatam tal comportamento em virtude da interação de Coulomb interna entre os cátion e o ânion do ([C2mim]Cl) serem mais fortes, em comparação com o ([C4mim]Cl), o que conseqüentemente poderia contribuir para interações mais fracas com a segregação favorecendo o sistema de PEG com ([C2mim]Cl). Deste modo, diminuindo a solubilidade do LI no PEG, com o aumento da massa molar, pode ser interpretada em termos da proporção relativamente menor dos grupos terminais OH, que contribuem mais fortemente para a solvatação do cátion do LI.

Os dados obtidos experimentalmente na obtenção das curvas binodais dos sistemas foi ajustada a equação não linear (Equação 1) proposta por Hu et al. (2003) e os valores obtidos para os parâmetros a, b, c e d e os coeficientes de determinação (R^2) da equação ajustadas para os sistemas estudados estão apresentados na Tabela 2. Com base nos valores de R^2 pode-se concluir que a equação se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais.

Tabela 2. Parâmetros a, b, c, e d e o coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o sistemas PEG-LI pela equação de Hu et al. (2003).

T (K)	A	B	C	d	R^2
PEG 1500					
293,15	10,8807	-58,9651	84,2775	-56,7159	0,9979
303,15	19,7392	-96,1520	127,1656	-71,5702	0,9989
313,15	5,6203	-31,3677	44,4656	-32,2985	0,9991
323,15	6,1181	-33,4127	46,1071	-30,7108	0,9992
PEG 4000					
293,15	-0,0959	-3,4926	5,0797	-13,7606	0,9978
303,15	1,0836	-11,4725	20,2497	-25,2416	0,9971
313,15	7,8943	-44,1597	63,3339	-44,3197	0,9987
323,15	6,1768	-37,0238	56,0591	-42,2329	0,9980

Pode-se verificar nas tabelas 3 e 4, as composições de equilíbrio para os sistemas estudados em diferentes temperaturas e massa molar do polímero, expressas em fração mássica, obtidos pela regra da alavanca, além dos comprimentos (CLA) e das inclinações (ILA) da linha de amarração dos diferentes sistemas obtidos.

Tabela 3. Dados das linhas de amarração e fração mássica dos sistemas formados por LI (W_1) + PEG 1500 (W_2) + água, em diferentes temperaturas.

T (K)	Composição global		Fase Superior		Fase inferior		CLA	ILA
	W_1	W_2	W_1	W_2	W_1	W_2		
303,15	41	21	0,9826	$2,7 \times 10^{-9}$	0,3081	0,2878	0,7333	-2,3441
	43	23	0,8748	$1,1 \times 10^{-6}$	0,3641	0,2308	0,5605	-2,2114
313,15	44	20	0,7505	0,0017	0,3614	0,2502	0,4617	-1,5660
	46	22	0,8481	0,0002	0,3219	0,2982	0,6047	-1,7654
323,15	42	24	0,9083	0,0001	0,3595	0,2697	0,6115	-2,0356
	44	26	0,8910	0,0002	0,2633	0,3618	0,7244	-1,7536

Tabela 4. Dados das linhas de amarração e fração mássica dos sistemas formados por LI (W_1) + PEG 4000 (W_2) + água, em diferentes temperaturas.

T (K)	Composição global		Fase Superior		Fase inferior		CLA	ILA
	W_1	W_2	W_1	W_2	W_1	W_2		
313,15	38	22	0,6533	0,0048	0,2693	0,3072	0,4880	-1,2698
	40	24	0,7932	0,0001	0,2349	0,3407	0,6540	-1,6391
323,15	42	20	0,7611	0,0004	0,3691	0,2519	0,4658	-1,5582
	44	22	0,8220	$5,3 \times 10^{-5}$	0,3237	0,3114	0,4983	-1,6006

Pode-se observar pelas tabelas 3 e 4 que a concentração de PEG na fase superior para a maioria dos sistemas é muito baixa, e em alguns casos o PEG é quase que totalmente excluído desta fase. Comportamento similar foi observado por Rodríguez et al., (2014) que encontrou valores de fração mássica do LI entre 0,86-0,99 fase rica em LI. Observa-se ainda que para alguns sistemas a concentração de LI na fase inferior foi maior que a concentração do PEG. Isto pode ter ocorrido em virtude de o sistema ser formado com grandes concentrações de LI. Rodríguez et al., (2014) também observaram que a fase rica em PEG era composta em até 40% de LI.

Segundo Da Silva e Loh (2006) o CLA está associado a seletividade do sistema, quanto menor seu valor, mais próximo da unidade será o valor do coeficiente de partição da biomolécula de interesse, tornando-se menos seletiva a extração. Entretanto, com o aumento do CLA, a biomolécula de interesse tende a migrar preferencialmente para uma das fases, isto é, o valor do coeficiente de partição torna-se mais distante de 1, aumentando assim o valor do coeficiente de partição. Esse comportamento é resultado do aumento da diferença de

composição entre as fases, que aumenta as contribuições entálpicas e entrópicas na transferência da biomolécula para uma das fases. Pode-se observar na figura 4, que a temperatura influencia no comprimento e na inclinação das linhas de amarração dos sistemas. Como mostrado nas tabelas 3 e 4, os valores mais elevados da ILA são obtidos em condições onde observa-se maiores diferenças entre o teor de PEG e LI nas duas fases. Esse mesmo comportamento foi observado por SABs composto por PEG 400 e sais de sulfato (MARTINS et al., 2010).

Figura 3. Dados de equilíbrio do sistema composto por PEG 1500 + ([C2min]Cl) + água, nas temperaturas (a) 303,15 K, (b) 313,15 K e (c) 323,15 K.

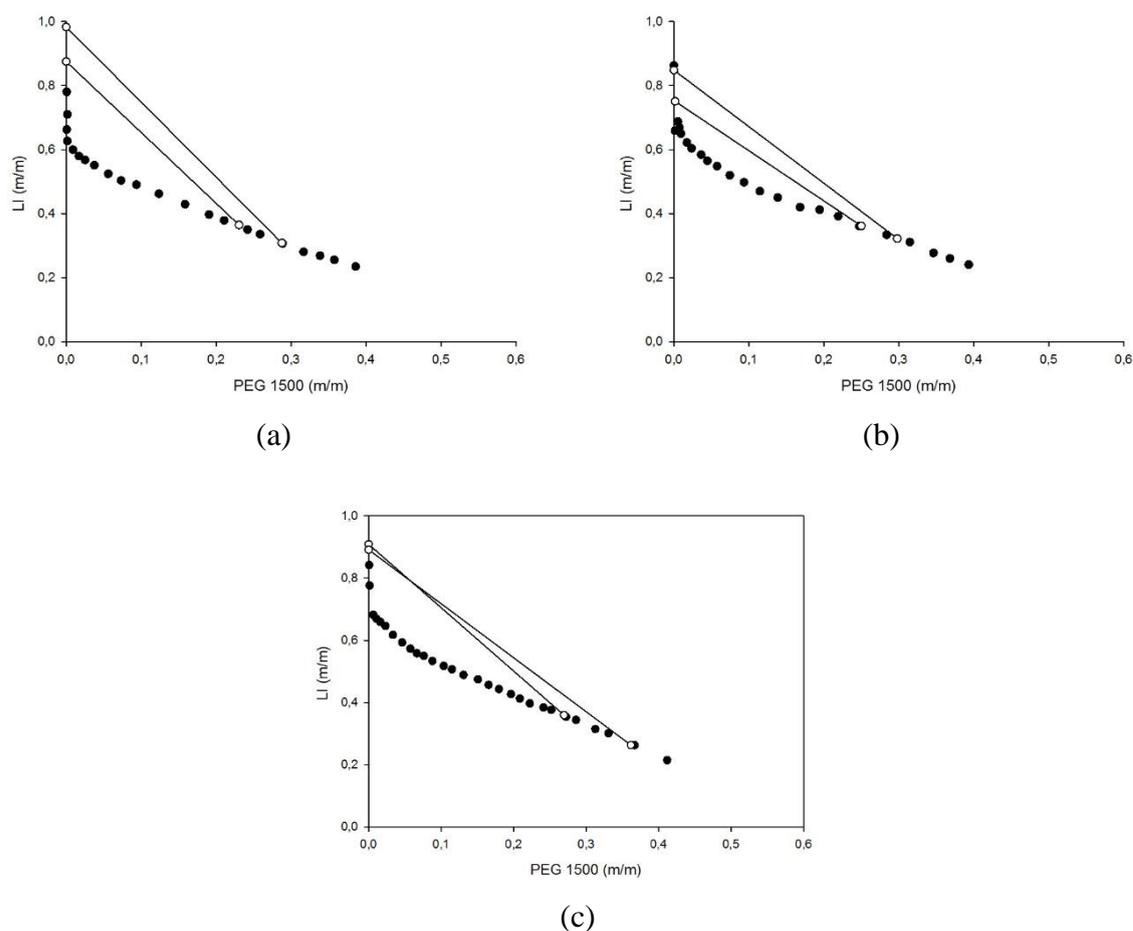
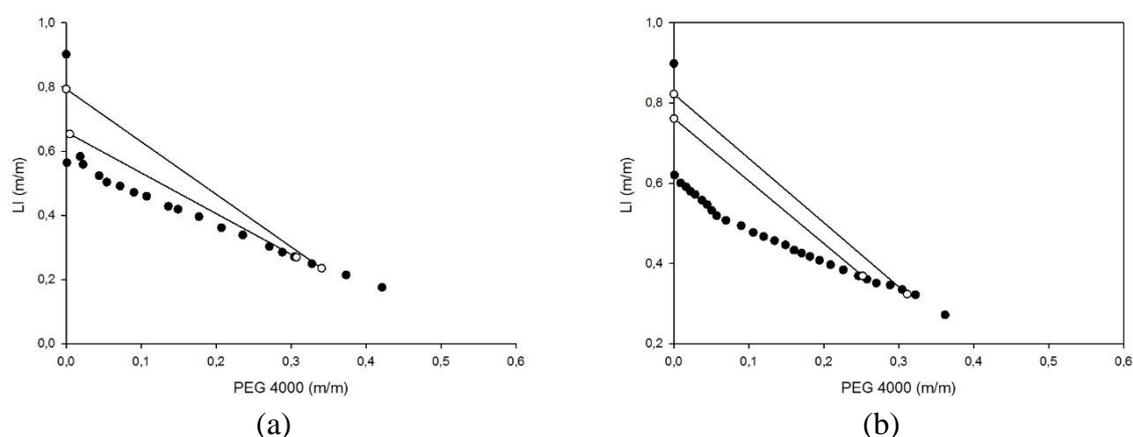


Figura 4. Dados de equilíbrio do sistema composto por PEG 4000 + ([C2min]Cl) + água, nas temperaturas (a) 303,15 K e (b) 313,15 K.



3.2. Partição da α -amilase

Foram realizados experimentos de partição da α -amilase em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1500 + ([C2min]Cl) + água e PEG 4000 + ([C2min]Cl) + água. Na tabela 5 estão apresentados os valores para o coeficiente de partição da proteína (K_p), o da atividade enzimática (K_e), da seletividade (S) e da recuperação teórica ($Y\%$) da α -amilase.

Tabela 5. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e), seletividade (S) e recuperação teórica ($Y\%$) nos sistemas formados por (([C2min]Cl) + PEG (1500 ou 4000) + água.

LA	T (K)	PEG 1500 + ([C2min]Cl)				4000 + ([C2min]Cl)			
		K_p	K_e	S	$Y(\%)$	K_p	K_e	S	$Y(\%)$
1	303,15	0,036	0,478	13,278	99,907				
2		0,417	0,693	1,662	97,421				
1	313,15	0,500	0,591	1,182	96,353	0,786	1,632	2,076	33,745
2		0,517	1,234	2,387	94,413	0,792	4,227	5,337	34,477
1	323,15	0,077	0,841	10,922	99,741	0,812	1,121	1,381	24,477
2		0,286	1,284	4,490	96,431	0,889	1,265	1,423	31,767

A distribuição desigual de proteínas entre as duas fases aquosas (coeficiente de partição), é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a proteína e as outras espécies presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (LUECHAU et al., 2010). Várias propriedades físico-químicas do sistema e da biomolécula determinam o valor de K_p . Por exemplo, algumas propriedades das fases como natureza química dos componentes, massa molar e concentração dos polímeros, temperatura, entre outras (DA SILVA e LOH, 2006).

Pode-se verificar na tabela 5 que para todos os sistemas analisados, os valores do coeficiente de partição da proteína (K_p) foram inferiores a 1. Como $K_p < 1$, as proteínas presentes

exibiram migração preferencialmente para fase inferior rica em PEG. Esse comportamento é semelhante ao observado por outros autores ao estudar a partição de amilase. Por exemplo, Li, Kim e Peeples, (2002) estudaram a partição da α -amilase nos sistemas formados por PEG/sulfato de amônio e verificou que a amilase migrou preferencialmente para fase rica em PEG. Porfiri et al., (2011) observaram no sistema composto por PEG 2000 e fosfato de potássio que a α -amilase tende a concentrar na fase rica em PEG. Isso pode ter ocorrido em virtude da menor condutividade elétrica da fase inferior que a fase superior, que implica numa menor concentração de íons livres, isso pode ocasionar uma maior estabilidade da enzima na fase inferior.

Com aumento da massa molar do polímero o coeficiente de partição da proteína ficou mais próximo da unidade, diminuindo assim, a preferência para a fase inferior. Pode-se observar ainda na tabela que tanto o coeficiente de partição da proteína, quanto o coeficiente de partição da atividade da α -amilase aumentaram com o aumento da concentração dos constituintes ([C2min]Cl) e PEG. Tal comportamento é resultado do aumento da diferença de composição entre as fases (DA SILVA e LOH, 2006).

Desta forma é evidenciado que os SAB's composto por PEG 1500 + ([C2min]Cl) apresentados neste estudo pode ser uma alternativa para pré-concentração da α -amilase, tendo em vista que esta é uma técnica que apresentam boa seletividade para a separação desta enzima.

4. CONCLUSÃO

Foram obtidos dados de equilíbrio composto por ([C2min]Cl) e PEG (1500 ou 4000) e água, onde foi verificado que temperaturas mais baixas são mais favoráveis para a formação das duas fases. Foi verificado também que o aumento na massa molar do polímero aumenta a região bifásica, devido ao aumento da hidrofobicidade do polímero que conduz a uma menor interação com a molécula do ([C₂mim]Cl), favorecendo o aumento da região bifásica. Foi observado que a fase superior do sistema foi composta majoritariamente por LI, sendo que o polímero foi praticamente excluído dessa fase. As fases inferiores dos sistemas foram compostas tanto por polímeros quanto por LI. Com o aumento da composição global, foi observado um aumento no CLA, devido a maior diferença da composição entre as fases. Foi verificado também que a α -amilase teve preferência pela fase inferior composta por PEG e que o sistema composto por PEG 1500 é mais adequado.

5. REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986, 346p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.
- DA SILVA, L.H.M.; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifasicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p. 1345- 1351, 2006.
- FREIRE, M. G.; CLÁUDIO, A. F. M.; ARAÚJO, J. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M.; CANONGIA LOPES, J. N.; REBELO, L. P. N. Aqueous Biphasic Systems: A boost brought about by using ionic liquids, **Chemical Society Reviews**, v.41, p.4966-4995, 2012.
- FREIRE, M. G.; PEREIRA, J. F. B.; FRANCISCO, M.; RODRÍGUEZ, H.; REBELO, L. P. N.; ROGERS, R. D.; COUTINHO, A. P. Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol polymers and liquid ionic. **Chemistry A European Journal**, v. 18, p. 1831-1839, 2012a.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. In: Pure and Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 1987.
- HU, M.; ZHAI, Q.; LIU, Z.; XIA, S. Liquid–Liquid and Solid–Liquid Equilibrium of the Ternary System Ethanol + Cesium Sulfate + Water at (10, 30, and 50) °C. **Journal Chemical & Engineering Data**, v.48, n.6, p.1561-1564, 2003.
- KRONER, K.H.; HUSTEDT, H.; GRANDA, S.; KULA, M.R. Technical aspects of separation using aqueous two-phase systems in enzyme isolation processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1967-1988, 1978.
- LI, M.; KIM, J.-W.; PEEPLES, T. L. Amylase partition and extractive bioconversion of starch using thermos separating aqueous two-phase systems. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p.15-26, 2002.
- LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Two-step process for initial capture of plasmid DNA and partial removal of RNA using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 45 (8), p. 1432-1436, 2010.

MARTÍNEZ-ARAGÓN M, BURGHOFF S, GOETHEER ELV, DE HAAN AB. Guidelines for solvent selection for carrier mediated extraction of proteins. **Separation and Purification Technology**, v.65, p. 65-72, 2009.

MARTINS, J. P.; COIMBRA, J. S. R.; OLIVEIRA, F. C.; SANAIOTTI, G.; DA SILVA, C. A. S.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol) 400 and sulfate salts. **Journal Chemical & Engineering Data**, v. 55, p.1247-1251, 2010.

MERCHUK, J. C., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 285-293, 1998.

MICHELIN, M.; SILVA, T. M.; BENASSI, V. M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MORAES, L. A. B.; LEÃO, J. M.; JOEGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotti*. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 2348-2353, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 69, p.109-115, 1995.

PEREIRA, J. F. B.; VENTURA, S. P. M.; SILVA, F.; SHAHRIARI, S.; FREIRE, M. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and polymers: A platform for the purification of biomolecules. **Separation and Purification Technology**, v. 13, p. 83-89, 2013.

PIERGIOVANNI A. R. Extraction and separation of water-soluble proteins from different wheat species by acidic capillary electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3850-3856, 2007.

PORFIRI, M. C.; PICÓ, G.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B. *Aspergillus oryzae* alpha-amylase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, p.7-13, 2011.

REMSING, R. C.; SWATLOSKI, R. P.; ROGERS, R. D.; MOYNA, G. Mechanism of Cellulose Dissolution in the Ionic Liquid 1-n-Butyl-3- methylimidazolium Chloride: a ¹³C and

35/37Cl NMR Relaxation Study on Model Systems. **Chemical Communications**, v.1271–1273, 2006.

RODRÍGUEZ, H.; FRANCISCO, M.; RAHMAN, M.; SUN, N.; ROGERS, R. Biphasic liquid mixture of ionic liquid and polyethylene glycols. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.11, p.10916–10922, 2009.

SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKI, M. A.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. **Process BIOCHEMISTRY**, v. 47, p. 18-25, 2012.

SEDDON, K. R. Ionic Liquids for Clean Technology. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.68, p.351–356, 1997.

SELBER, K.; COLLEN, A.; HYYTIA, T.; PENTTILA, M.; TJERNELD, F.; KULA, MR. Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, v.10, p.229-236, 2001.

SHIN, Y. O.; WEBER M. E.; VERA, J. H. Reverse micellar extraction and precipitation of lysozyme using sodium di(2-ethylhexyl) sulfosuccinate. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 928-935, 2003.

SINGH, K., KAYASTHA, A. M. α -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. **Food Chemical**. n. 162, p.1-9. 2014.

SOUZA, JR., E. C.; DINIZ, R. S.; COIMBRA, J. S. R.; LEITE, M. O.; SANTOS, G. R.; RODRIGUES, A. M. C.; DA SILVA,, L. H. M. Measurements and Modeling of Liquid–Liquid Equilibrium of Polyethylene Glycol 400, Sodium Phosphate, or Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems at (298.2, 308.2, and 318.2) K. **Journal Chemical & Engineering Data**, v. 58, p.2008-2017, 2013.

STURESSON, S.; TJERNELD, F.; JOHANSSON. G. Partition of macromolecules and cell particles in aqueous two-phase systems based o hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol) **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.26, p.281-295, 1990.

WANG W, VIGNANI R, SCALI M, SENSI E, TIBERI P, CRESTI M. Removal of lipid contaminants by organic solvents from oilseed protein extract prior to electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 329, p. 139-141, 2004.

ZATLOUKALOVÁ E, KUČEROVÁ Z. Separation of cobalt binding proteins by immobilized metal affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 808, p. 808:99-103, 2004.