



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO,
DENSIDADE E VISCOSIDADE DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO
CONSTITUÍDO DE POLIETILENOGLICOL E POLIACRILATO
DE SÓDIO**

VANESSA SANTOS SAMPAIO

2011

VANESSA SANTOS SAMPAIO

**OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO, DENSIDADE E
VISCOSIDADE DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO CONSTITUÍDO DE
POLIETILENOGLICOL E POLIACRILATO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof.:
D.Sc. Luis Antonio Minim

Co-Orientadora: Prof.:
D.Sc. Renata C. F. Bonomo

**ITAPETINGA – BAHIA
BRASIL
2011**

637.127	Sampaio, Vanessa Santos.
S186o	<p data-bbox="427 600 1361 770">Obtenção de dados de equilíbrio termodinâmico, densidade e viscosidade de sistema aquoso bifásico constituído de polietilenoglicol e poliacrilato de sódio. / Vanessa Santos Sampaio. – Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011. 45 fl..</p> <p data-bbox="427 801 1361 949">Dissertação do Programa de Pós-Graduação “<i>Strictu Senso</i>” do Curso de Especialização em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Luis Antonio Minim e co-orientação da Prof^a. D. Sc Renata C. F. Bonomo.</p> <p data-bbox="427 1016 1361 1182">1. Sistema Aquoso Bifásico(SAB) – Polietilenoglicol – Poliacrilato de sódio. 2. Sistema Aquoso Bifásico(SAB) – Extração líquido-líquido. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Minim, Luis Antonio. III. Bonomo, Renata C. F. IV. Título.</p> <p data-bbox="1129 1218 1361 1245" style="text-align: right;">CDD(21): 637.127</p>

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por assunto:

1. Sistema Aquoso Bifásico(SAB) – Polietilenoglicol – Poliacrilato de sódio.
2. Sistema Aquoso Bifásico(SAB) – Extração líquido-líquido.

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

Área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga – BA

TERMO DE APROVAÇÃO

Título: “Obtenção de dados de equilíbrio termodinâmico, densidade e viscosidade de sistema aquoso bifásico constituído de polietilenoglicol e poliacrilato de sódio”

Autor: Vanessa Santos Sampaio

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de concentração em **Engenharia de Processos de Alimentos**, pela Banca Examinadora:

Prof. D.Sc. Luis Antonio Minim
Presidente

Profª. D.Sc. Cristiane Martins Veloso

Prof. D.Sc. Genebaldo Sales Nunes

Data da defesa: 27/07/2011

UESB – Campus Juvino Oliveira, Praça Primavera n° 40 – Telefone: (77) 3261-8629
Fax: (77) 3261-8701 – Itapetinga – BA – CEP: 45.700-000 – E-mail: ppgeal@uesb.edu.br

*A toda minha família, pelo amor,
Carinho e incentivo.
Ao Júnior, pelo companheirismo,
amor e dedicação.
DEDICO!*

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças e não ter me desamparado nos momentos mais difíceis da minha vida; Aos meus pais, minha tia Jeane, minha irmã e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida;

Ao meu namorado Júnior, pelo amor, carinho, paciência, por está presente em minha vida nos momentos de alegria e de incertezas, me dando forças para superar os desafios;

Ao Professor Luis Antonio Minim, pela orientação, auxílio e atenção durante a realização deste trabalho;

À Professora Renata Cristina Ferreira Bonomo, pela amizade e pelas valiosas contribuições para a realização deste trabalho;

Ao Rubner Gonçalves Pereira, amigo incondicional, pela paciência e incontáveis momentos de ajuda;

Aos meus amigos e colegas do LADESP, em especial, à Janaína e Lizzy, pela ajuda na realização deste trabalho e pelo incentivo e apoio constantes;

Aos meus colegas do LEP, pelos agradáveis momentos proporcionados e compartilhamento de conhecimento;

À CAPES, pela concessão da bolsa, àUFV e à UESB, pela oportunidade e condições de realizar meu trabalho;

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

SAMPAIO, V.S. Obtenção de dados de equilíbrio termodinâmico, densidade e viscosidade de sistema aquoso bifásico constituído de polietilenoglicol e poliacrilato de sódio. Itapetinga – BA: UESB, 2011.45p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Processos de Alimentos)*

Neste estudo foram determinados dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água, polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água, em pH 7,0 e 9,0, bem como as propriedades físico-químicas das fases, densidade e viscosidade. Foi avaliada a influência do pH dos sistemas e da massa molar do poliacrilato de sódio nos diagramas de equilíbrio e nas propriedades físico-químicas das fases. Aos dados obtidos para construção dos diagramas de equilíbrio, foi ajustado um modelo exponencial decrescente de três parâmetros para obtenção das curvas binodais. De uma forma geral, foi observado que o aumento do pH não ocasionou o deslocamento da região bifásica. Já para a massa molar, só foi verificada a sua influência em pH 9,0, no qual foi observado que com o aumento da massa molar do poliacrilato de sódio ocorreu uma redução na concentração necessária dos polímeros para a formação de fase. Os resultados obtidos para densidade e viscosidade foram submetidos à análise de regressão linear, obtendo-se modelos matemáticos que predizem o comportamento destas variáveis em função do pH, concentração de Polietilenoglicol e da concentração de poliacrilato de sódio.

Palavras – chave: diagramas de equilíbrio, polietilenoglicol, poliacrilato de sódio, densidade, viscosidade.

*Orientador: Luis Antonio Minim, D. Sc., UFV e Co-orientadora: Renata Cristina Ferreira Bonomo, D. Sc. UESB.

ABSTRACT

SAMPAIO, V.S.S. Obtaining data from thermodynamic equilibrium and physical properties of aqueousbiphasic system consisting of polyethylene glycol and sodium polyacrylate at different values pH. UESB, 2011. 45p. (Dissertation - Master in Food Engineering Food Process Engineering)¹

This study determined liquid-liquid equilibrium data of aqueous biphasic systems formed by polyethyleneglycol 2000 g.mol⁻¹/sodium polyacrylate 8000 g.mol⁻¹/potassium chloride/ water and polyethyleneglycol 2000 g.mol⁻¹/sodium polyacrylate 15000 g.mol⁻¹/ potassium chloride /water, at pH 7.0 and 9.0, as well as the physical and chemical properties of the phases, density and viscosity. The system pH and sodium polyacrylate molar mass influence in the equilibrium diagrams and physico-chemical properties of phases was investigated. A three parameters exponential decay model was adjusted to data obtained from the construction of equilibrium diagrams for obtention of the Binodal curves. Overall, it was observed that increasing the pH did not cause the displacement of biphasic region. As for the molar mass, was only seen its influence at pH 9.0, where it was observed that increasing molar mass of sodium polyacrylate led to a reduction in the concentration of polymers required for phase formation. The results for density and viscosity were submitted to linear regression analysis resulting in mathematical models that can be used to predict the behavior of these variables as a function of pH, concentration of polyethylene glycol and sodium polyacrylate.

Keywords: equilibrium diagrams, polyethylene glycol, sodium polyacrylate, density, viscosity.

¹ **Advisor:** Luis Antonio Minim, D.Sc., UFV e **Co-advisors:** Renata Cristina Ferreira Bonomo, D.Sc., UESB.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de sistemas aquosos bifásicos mais utilizados.....	19
Tabela 2 - Biomoléculas extraídas com o uso de sistemas aquosos bifásicos.....	20
Tabela 3 - Frações mássicas (%m/m) para sistemas formados por PEG 2000 g.mol ⁻¹ (w1), poliacrilato de sódio 8000 g.mol ⁻¹ (w2), cloreto de potássio (w3) e água (w4), em diferentes valores de pH.....	31
Tabela 4 - Frações mássicas (%m/m) para sistemas formados por PEG 2000 g.mol ⁻¹ (w1), poliacrilato de sódio 15000 g.mol ⁻¹ (w2), cloreto de potássio (w3) e água (w4), em diferentes valores de pH.....	32
Tabela 5 - Comprimento das linhas de amarração para PEG 2000 g.mol ⁻¹ /NaPA 8000 g.mol ⁻¹ /Cloreto de potássio/Água em diferentes valores de pH.....	34
Tabela 6 - Comprimento das linhas de amarração para PEG 2000 g.mol ⁻¹ /NaPA 15000 g.mol ⁻¹ /Cloreto de potássio/Água em diferentes valores de pH.....	34
Tabela 7 - Inclinação das linhas de amarração para PEG 2000 g.mol ⁻¹ /NaPA 8000g.mol ⁻¹ /Cloreto de potássio/Água em diferentes valores de pH.....	34
Tabela 8 - Inclinação das linhas de amarração para PEG 2000 g.mol ⁻¹ /NaPA 15000g.mol ⁻¹ /Cloreto de potássio/Água em diferentes valores de pH.....	35
Tabela 9 - Densidade e viscosidade para sistema composto por polietilenoglicol 2000g.mol ⁻¹ /poliacrilato de sódio 8000 g.mol ⁻¹ /cloreto de potássio/água em diferentes valores de pH.....	37
Tabela 10 - Densidade e viscosidade para sistema composto por polietilenoglicol 2000g.mol ⁻¹ /poliacrilato de sódio 15000 g.mol ⁻¹ /cloreto de potássio/água em diferentes valores de pH.....	38
Tabela 11 - Coeficientes da Equação 3 para sistemas compostos por polietilenoglicol 2000g.mol ⁻¹ /poliacrilato de sódio 8000 g.mol ⁻¹ /cloreto de potássio/água.....	39

Tabela 12 - Coeficientes da Equação 3 para sistemas compostos por polietilenoglicol
2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água..... 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas triangulares (a) e retangulares (b).....	22
Figura 2 -	Diagrama de fase de um sistema polímero – sal.....	23
Figura 3 -	Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietilenoglicol 2000 $\text{g.mol}^{-1}(w_1)$, poliacrilato de sódio $8000\text{g.mol}^{-1}(w_2)$, cloreto de potássio e água, nos pH's 7,0 e 9,0.....	33
Figura 4 -	Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietilenoglicol 2000 $\text{g.mol}^{-1}(w_1)$, poliacrilato de sódio $15000\text{ g.mol}^{-1}(w_2)$, cloreto de potássio e água, nos pH's 7,0 e 9,0.....	33
Figura 5 -	Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietilenoglicol 2000 $\text{g.mol}^{-1}(w_1)$, poliacrilato de sódio $8000\text{ g.mol}^{-1}(w_2)$ e $15000\text{g.mol}^{-1}(w_2)$, cloreto de potássio e água, em pH7,0.....	35
Figura 6 -	Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietilenoglicol 2000 $\text{g.mol}^{-1}(w_1)$, poliacrilato de sódio $8000\text{ g.mol}^{-1}(w_2)$ e $15000\text{ g.mol}^{-1}(w_2)$, cloreto de potássio e água, em pH 9,0.....	36

LISTA DE SÍMBOLOS

SAB's – sistemas aquosos bifásicos

PEG – polietileno glicol

NaPA – poliacrilato de sódio

Dex – dextrana

ELL – extração líquido-líquido

TLL – tielines-comprimento da linha de amarração

ILA – inclinação da linha de amarração

°C – graus Celsius

g – força gravitacional

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	- 15 -
OBJETIVO GERAL	- 17 -
OBJETIVO ESPECÍFICOS	- 17 -
1. REVISÃO DE LITERATURA	- 18 -
1.1. Sistemas Aquosos Bifásicos	- 18 -
1.2. Sistemas Formados por PEG e Poliacrilato de Sódio	- 20 -
1.3. Propriedades Físico-Químicas dos Sistemas Aquosos Bifásicos	- 21 -
1.4. Diagrama de Fases	- 22 -
1.5. Variáveis que Influenciam o Sistema Aquoso Bifásico	- 24 -
1.5.1. Massa Molar e Concentração do Polímero	- 24 -
1.5.2. Potencial Hidrogeniônico	- 25 -
1.5.3. Temperatura	- 25 -
2. MATERIAIS E MÉTODOS	- 27 -
2.2. Materiais	- 27 -
2.2.1. Reagentes e equipamentos	- 27 -
2.3. Métodos	- 27 -
2.3.1. Determinação das curvas spinodais	- 27 -
2.3.2. Preparo dos sistemas aquosos bifásicos	- 28 -
2.3.3. Quantificação de PEG	- 28 -
2.3.4. Quantificação do poliacrilato de sódio	- 29 -
2.3.5. Quantificação de água	- 29 -
2.3.6. Quantificação do cloreto de potássio	- 29 -
2.3.7. Determinação da viscosidade	- 29 -
2.3.8. Determinação da densidade	- 29 -
2.4. Delineamento experimental e análises estatísticas	- 30 -
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 31 -
3.2. Efeito do pH	- 32 -
3.3. Efeito da massa molar	- 35 -
3.4. Propriedades físico-químicas das fases	- 36 -
4. CONCLUSÃO	- 40 -
5. REFERÊNCIAS	- 41 -

INTRODUÇÃO

Processos de separação estão presentes em toda indústria química, alimentícia e farmacêutica, sendo assim, é necessária uma atenção especial em relação ao impacto ambiental causado pela manipulação de substâncias químicas utilizadas em inúmeros processos industriais. Sistemas de extração líquido-líquido (ELL) clássicos são amplamente utilizados pelas indústrias em processos de purificação, extração e pré-concentração de compostos de interesse econômico e, geralmente, empregam solventes orgânicos que são extremamente tóxicos, cancerígenos e inflamáveis (DA SILVA *et al.*, 2006a).

Para proteínas e biomoléculas, no entanto, o método clássico de extração líquido-líquido não é adequado, devido à sensibilidade desses componentes à desnaturação promovida pelos solventes orgânicos. Neste contexto, os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) surgem como uma ferramenta alternativa para substituir métodos de extração líquido-líquido clássicos. Os SAB's possuem uma grande vantagem por serem constituídos em sua grande parte por água, sendo que os demais constituintes formadores (polímeros e sais inorgânicos) possuem toxicidade tecnicamente nula e não são inflamáveis. Além disso, seus constituintes são comercialmente acessíveis e de baixo custo (DA SILVA & LOH, 2006).

A formação espontânea de um SAB ocorre quando dois polímeros quimicamente diferentes e hidrossolúveis, ou um polímero e um sal inorgânico são misturados em água, desde que determinadas condições termodinâmicas críticas sejam estabelecidas, isto é, em uma faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes (DA SILVA & LOH, 2006).

Dentre os diferentes SAB's, os mais estudados e comumente empregados são aqueles compostos por polietilenoglicol-dextrana (PEG-Dextrana) e PEG-Sal. Um importante aspecto desses sistemas é a possibilidade de manipular a partição da biomolécula pela mudança da força iônica e pH do sistema. Além dos aspectos químicos, o rendimento da extração é independente da escala do processo, ao contrário de outros métodos de biosseparação como cromatografia. Uma importante desvantagem do sistema tradicional PEG-dextrana é o alto custo da dextrana. Um sistema de menor custo, mas muito limitado, é o sistema PEG-fosfato (GIRALDO-ZUÑIGA, 2000).

Um sistema aquoso potencialmente interessante é formado pelo par de polímeros PEG e NaPA. Pouca atenção tem sido dada a este sistema, pelo fato de formar duas fases somente quando certas condições são atendidas, como por exemplo, a necessidade das moléculas de NaPA estarem totalmente dissociadas ($\text{pH} > 7$). Além disso, deve haver quantidade de sal suficiente no sistema para facilitar a compartimentalização do polieletrólito altamente carregado em uma das fases. De um modo geral, o sistema apresenta vantagens como baixa viscosidade, fases claras bem definidas e possibilidade de reciclagem. Além disso, PEG e NaPA são polímeros inofensivos e relativamente baratos (TJERNELD, 1992 e HUGHES & LOW, 1988).

O polímero NaPA dissocia-se em pH acima de 5,0 e se encontra totalmente carregado em pH 7,0. Abaixo de pH 5,0, o NaPA se torna descarregado e precipita em solução aquosa. Portanto, o ajuste do pH possibilita a modulação da solubilidade do polímero. A cadeia principal do NaPA é hidrofóbica e sua solubilidade é caracterizada pela presença de grupos carboxílicos (ânions) nos grupos poliméricos laterais (QUOQIANG *et al.*, 1993). Estes grupos são fortemente hidrofílicos quando carregados e, por esse motivo, PEG e NaPA se separam em duas fases diferentes. O sistema aquoso PEG-NaPA é interessante pelo fato de poder formar um sistema de duas fases polímero-polímero em pH acima de 5,0 e um sistema polímero-água em pH abaixo de 5,0 (JOHANSSON *et al.*, 2008).

Objetivou-se com este trabalho a obtenção de novos dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol, poliacrilato de sódio com diferentes massas molares, cloreto de potássio e água, em pH 7,0 e pH 9,0, bem como determinar a densidade e viscosidade dos sistemas.

OBJETIVO GERAL

Obter dados de equilíbrio de fases para os sistemas aquosos compostos por poli (etileno glicol) 2000 g.mol^{-1} , poliacrilato de sódio 8000 g.mol^{-1} e 15000 g.mol^{-1} e cloreto de potássio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os diagramas de fases formados por combinação de polietilenoglicol e poliacrilato de sódio.
- Avaliar a influência do pH e da massa molar do poliacrilato de sódio nos diagramas de fase do sistema em estudo.
- Determinar as propriedades físicas dos sistemas, densidade e viscosidade.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Sistemas aquosos bifásicos

A formação dos SAB's é conhecida desde o final do século 19. Em 1896, Beijerinck descobriu que soluções aquosas de gelatina e Agar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, formavam misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em agar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases (ALBERTSSON, 1971).

Porém, foi apenas com os trabalhos de Per-Åke Albertsson (1971), em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação desses sistemas à partição e purificação de materiais biológicos, desde proteínas até células. Como o solvente é a água em ambas as fases e, geralmente, encontra-se presente em grande quantidade, esses sistemas fornecem um ambiente favorável para as biomoléculas evitando, assim, mudanças em suas estruturas e perda das atividades biológicas (DA SILVA & LOH, 2006).

A formação espontânea de um SAB ocorre quando dois polímeros quimicamente diferentes e hidrossolúveis, ou um polímero e um sal inorgânico são misturados em água, desde que determinadas condições termodinâmicas críticas sejam estabelecidas, isto é, em uma faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes (DA SILVA & LOH, 2006). As fases formadas nestes sistemas possuem propriedades termodinâmicas intensivas distintas, como índice de refração, composição, densidade e viscosidade. Essas fases são separadas por uma interface que é a região onde as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo ao valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

A técnica de separação em SAB é aconselhável para purificação de proteínas em larga escala, pois permite a separação seletiva, uma baixa tensão superficial, boa biocompatibilidade, a possibilidade de aplicação em grande escala e boa relação custo-benefício. Os SAB's apresentam, ainda, outras vantagens em comparação aos métodos de separação e purificação de biocompostos como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas, facilidade de separar materiais particulados e permite concentrar a proteína de interesse em uma das fases, controlando o volume das mesmas (CASCONI *et al.*, 1991).

Existem dois tipos principais de sistemas aquosos bifásicos, os formados por dois polímeros e os que contêm apenas um polímero. Na Tabela 1, encontram-se alguns exemplos de sistemas aquosos bifásicos. O sistema polímero-polímero mais comum é composto de dextrana

e PEG, mas a dextrana é de custo elevado o que inviabiliza o seu uso em larga escala. Os sistemas PEG e sais são atrativos, devido ao baixo custo, rápida separação de fases e baixa viscosidade. Por outro lado, apresentam algumas limitações como a desnaturação de biomoléculas em altas concentrações de sais (DA SILVA e MEIRELLES, 2000).

Tabela 1: Exemplos de sistemas aquosos bifásicos mais utilizados.

Polímero	Polímero
	Polipropileno glicol
	Dextrana
Polietileno glicol	Polivinil álcool
	Maltodextrina
	Ficol
Polímero	Componentes de baixa massa molar
Polietileno glicol	Sais inorgânicos: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$, NaHPO_4 , K_2CO_3 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4
Polietilenoglicol	Glicose, maltose
Polietilenoglicol	Poliacrilato de sódio
Copolímeros tribloco	K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4 , MgSO_4
Polipropileno glicol	Sais inorgânicos: K_2HPO_4 , KH_2PO_4

Diversos fatores como: constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza e tamanho da partícula alvo; pH e natureza do eletrólito do sistema bifásico influenciam na separação de fases em SAB e, conseqüentemente, o processo extrativo de um determinado biocomposto (ALBERTSSON, 1986). Por isso, torna-se necessário estudar diferentes SAB's para ampliar e facilitar o uso dos mesmos na extração líquido-líquido.

Os SAB's vêm sendo empregados com muito sucesso na separação de diversas biomoléculas. Encontram-se na literatura diversos trabalhos que evidenciam o seu potencial de aplicação a nível industrial e que auxiliam a identificar os sistemas mais adequados à separação de certas biomoléculas.

Durante todo o seu desenvolvimento, a pesquisa na área de sistemas aquosos bifásicos segue duas tendências. A primeira visa à aplicação de SAB's já conhecidos à purificação/extração de novos solutos, sendo, dessa forma, uma excelente ferramenta não somente para a bioseparações, mas também para separações de moléculas menores, íons metálicos e compostos orgânicos (LI *et al.* 1996 & FILHO *et al.*, 2002). Muitos trabalhos nessa linha têm sido feitos, utilizando SAB's formados por polímero – polímero e/ou polímero – sal. A Tabela 2 apresenta alguns exemplos.

Tabela 2: Biomoléculas extraídas com o uso de sistemas aquosos bifásicos

Biomolécula	SAB	Referência
BSA e ovalbumina	PEG – Dextrana	Nerlyet <i>al.</i> (2001)
Endopoligalacturose	PEG - Polivinil álcool	Wu <i>et al.</i> (1998)
Amilolucosidase	PEG - Sulfato de sódio	Saveat <i>al.</i> (1993)
β -galactosidase, lisozima	PEG – Dextrana	Lu & Tjerneld (1997)
α -la, β -lg	PEG - Fosfato de potássio	Giraldo-Zuniga (2000)
Escherichia coli	PEG - Fosfato de potássio	Kaulet <i>a.</i> (1995)
Álcool desidrogenase	PEG - Hidroxipropil-amido	Venâncio <i>et al.</i> (1996)
BSA	PEG - goma guar	Venâncio <i>et al.</i> (1995)
Ácido láctico	EOPO - PEG	Planas <i>et al.</i> (1999)
Liginina	PEG - Carbonato de potássio /sulfato de amônio	Willaueret <i>al.</i> (2000)
α -amilase	PEG - Sulfato de magnésio	Blazquezet <i>a.</i> (1998)
Caseína	Dextrana - goma guar	Simonetet <i>al.</i> (2000)
Glutenina	PEG - Dextrana	Truust& Johansson (1996)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PEF - Maltodextrina	Machado (1999)
Lisina, glicina	PEG - Dextrana	Zaslavskyet <i>al.</i> (2000)

A segunda tendência observada na pesquisa com SAB's procura entender todas as propriedades que determinam o comportamento de sistemas bifásicos. Conforme indicado anteriormente, os SAB's são empregados na extração de biopartículas, metais pesados e outros solutos de interesse. Entretanto, o mecanismo que governa a formação e a partição de solutos nesses sistemas é ainda desconhecido, do qual resulta que a obtenção de SAB otimizado para extração de um determinado soluto esteja ainda restrita a uma abordagem de tentativa e erro. Há muitas dificuldades na obtenção de um modelo geral. Uma delas é a grande quantidade e diferença entre os possíveis componentes capazes de gerar os SAB's. Para superar estas dificuldades, é importante pesquisar dados relacionados à energia livre do sistema. A busca de dados referentes a diagramas de fases e coeficientes de partição de um determinado soluto é útil na obtenção de informações referentes à minimização da energia livre de Gibbs, envolvida no processo de formação dos SAB's e da partição dos solutos. Com isso, caminha-se em direção à diminuição das dificuldades, quanto à compreensão dos fatores que governam a formação e partição dos SAB's (SILVA & MEIRELLES, 2001).

1.2. Sistemas Formados por PEG E Poliacrilato de Sódio

Os sistemas compostos por PEG e NaPA possuem potencial interessante para separação de biomolécula, mas pouca atenção tem sido dada a este sistema, pelo fato de formar duas fases

somente quando certas condições são atendidas, como, por exemplo, a necessidade das moléculas de NaPA estarem totalmente dissociadas ($\text{pH} > 7$). Além disso, deve haver quantidade de sal suficiente no sistema para facilitar a compartimentalização do polieletrólito, altamente carregado em uma das fases. De um modo geral, o sistema apresenta vantagens como baixa viscosidade, fases claras bem definidas e possibilidade de reciclagem. Além disso, PEG e NaPA são polímeros inofensivos e relativamente baratos (TJERNELD, 1992 e HUGHES & LOW, 1988).

Atualmente, foi relatado que esse novo sistema, constituído por polietilenoglicol (PEG) e poliacrilato de sódio (NaPA), é formado de duas fases e alguns estudos tem sido conduzidos para sua utilização no particionamento de biomolécula. Johansson et al. (2008a), estudando partição de proteína verde fluorescente (GFP), verificaram um alto potencial desse sistema para tal função. O mesmo foi verificado utilizando esses sistemas para partição de hemoglobina, lisozima e glucose – 6- fosfato desidrogenase, apresentando um bom resultado (JOHANSSON, et al. 2008b).

Apesar dos estudos citados, dados de equilíbrio dos sistemas formados por polietileno glicol e poliacrilato de sódio são escassos na literatura, sendo, então, necessários estudos e mais investigações nesse sentido.

1.3. Propriedades Físico-Químicas dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Propriedades físico-químicas como densidade, viscosidade e tensão interfacial variam com a concentração dos constituintes do sistema. Para SAB polímero-polímero, as densidades das fases não são muito diferentes da densidade da água (comumente entre 1,0 g/mL e 1,1 g/mL). A baixa tensão interfacial de SAB's poliméricos (de $1,0 \times 10^{-4}$ mN/m a 0,1 mN/m) proporciona condições amenas para a extração de biomoléculas, como enzimas e células frágeis (ZASLAVSKY, 1992). Os SAB's polímero-sais apresentam valores de tensão interfacial na faixa de 0,1mN/m a 2,0 mN/m (ALBERTSSON, 1986), e a viscosidade da fase polimérica é muito maior que a viscosidade da fase salina.

Saravanan et al. (2006) determinaram a viscosidade e a densidade de SAB's formados por PEG e poliacrilato de sódio (NaPA) em função da temperatura (298,15 K a 313,15 K). A densidade da fase superior (composta por PEG) e a densidade da fase inferior (composta por NAPA) variaram de 1,0476 g/cm³ a 1,0797 g/cm³ e 1,0924g/cm³ a 1,1498g/cm³, respectivamente. A viscosidade das fases superior e inferior variaram de 0,2094 Pa.s a 0,1679 Pa.s e 0,0498 Pa.s a 0,0520 Pa.s, respectivamente.

Machado (1999), utilizando sistemas compostos por PEG e maltodextrina, observou que a viscosidade da fase inferior, rica em maltodextrina, era maior que a da fase superior, rica em PEG, com diferenças da ordem de 80cP. Verificou também que um aumento na massa molar do

PEG provocou a elevação da viscosidade das duas fases, porém, com maior impacto sobre a fase inferior, rica em maltodextrina.

1.4. Diagrama de Fases

Para a utilização de SAB, é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isso, são obtidos os diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas.

Os dados de equilíbrio de fases dos SAB's podem ser representados em diagramas de equilíbrio, em uma temperatura e pressão fixas. Os diagramas de equilíbrio, ou diagramas de fase, representam graficamente a composição dos constituintes do sistema, presentes em certas concentrações, na qual ocorre a separação de fases. Podem ser apresentados no sistema de coordenadas triangulares (Figura 1a) e retangulares (Figura 1b), sendo a concentração do solvente omitida neste último.

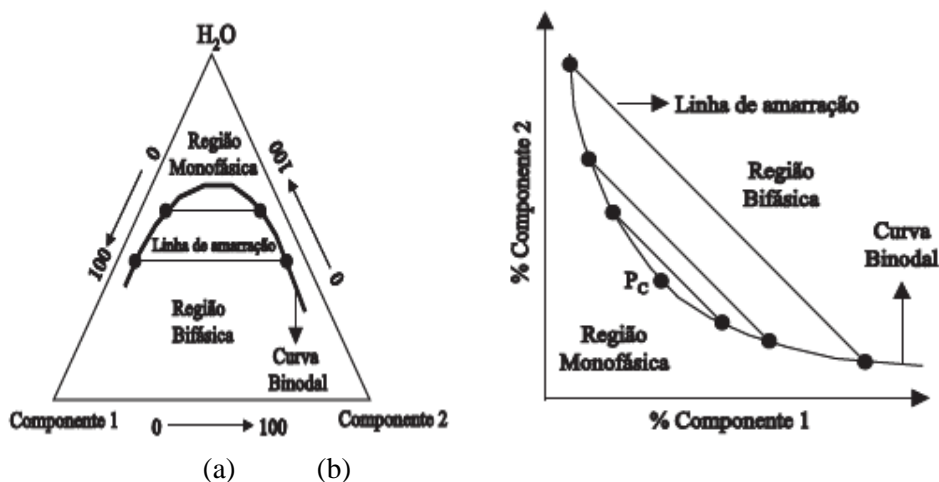


Figura 1. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas triangulares (a) e retangulares (b). Fonte: Da SILVA, 2007.

A obtenção dos dados de equilíbrio e das propriedades dos sistemas de fases é necessária para o desenvolvimento de processos de extração. Os dados dos diagramas de fase são também necessários para o desenvolvimento de modelos que possam prever a partição entre as fases (SNYDER *et al.*, 1992, GRABER *et al.*, 2004, HAGHTALAB e MOKHTARANI, 2004).

A Figura 2 apresenta um diagrama de fases típico de um sistema aquoso bifásico polímero e Sal. A concentração de um dos componentes é representada no eixo horizontal e a concentração do outro componente, no eixo vertical. A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por diferença.

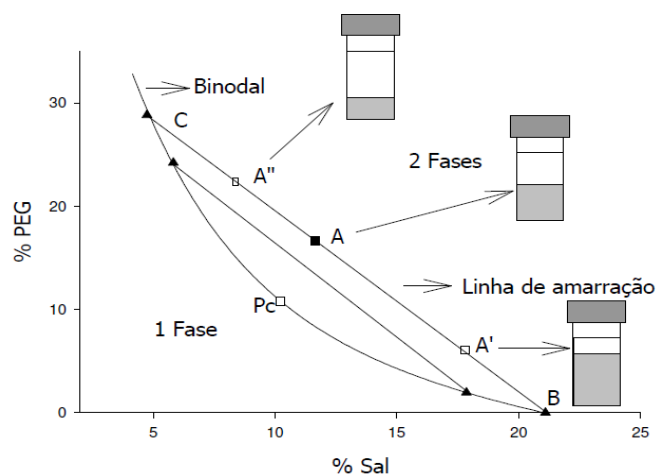


Figura 2: Diagrama de fase de um sistema polímero – sal. Fonte: CARVALHO, 2004.

Na Figura 2, a curva que separa a região bifásica da região monofásica é chamada de curva binodal (curva B-Pc-C). Os diagramas também contêm as linhas de amarração, que unem as composições das duas fases em equilíbrio (reta B-C). Os pontos de mistura (A, A', A''), distribuídos sobre uma mesma linha de amarração, levam no equilíbrio à mesma composição nas duas fases; no entanto, as propriedades extensivas, como, por exemplo, o volume de cada fase é diferente em cada ponto (ALBERTSSON, 1971).

Para se estudar separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. Esta medida foi determinada empiricamente como sendo o comprimento da linha de amarração (TLL), que pode ser calculado a partir das concentrações das fases coexistentes, segundo a Equação 1 (ZASLAVSKY, 1995).

$$TLL = \{[C[P]_S - C[P]_I]^2 + [C[S]_S - C[S]_I]^2\}^{0.5} \quad [1]$$

em que $C[P]_S$, $C[S]_S$, $C[P]_I$, $C[S]_I$ são, respectivamente, as concentrações do polímero e do sal nas fases superior e inferior.

Outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração (ILA) que é uma característica importante em um diagrama de equilíbrio: é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química, como a temperatura e a massa molar, por exemplo. O valor da inclinação pode ser calculado por:

$$ILA = \frac{[P^S] - [P^I]}{[S^S] - [S^I]} \quad [2]$$

em que [P] e [S] representam as concentrações de polímero e sal, respectivamente. O sobrescrito S representa a fase superior e I a fase inferior.

Dados das composições e propriedades dos sistemas aquosos bifásicos são necessários para o projeto de processos de extração e para o desenvolvimento de modelos termodinâmicos de transferência de massa e aplicáveis na extração líquido-líquido. Adicionalmente, dados de diagramas de fases são também necessários para viabilizar a predição da partição das moléculas entre as fases (SNYDER *et al.*, 1992; SÉ e AZNAR, 2002; GRABER *et al.*, 2004).

1.5. Variáveis que Influenciam o Sistema Aquoso Bifásico

As variáveis que influenciam a partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificadas como variáveis inerentes ao próprio sistema (por exemplo: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à proteína alvo (por exemplo: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (COSTA *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2003; TUBIO *et al.*, 2004). Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo. Sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GÜNDÜZ e KORKMAZ, 2000).

1.5.1. Massa Molar e Concentração do Polímero

Como observado inicialmente por Albertsson (1960), quanto maior a massa molar do polímero formador do SAB menor será a concentração de sal (ou do outro componente constituinte do sistema) requerida para que ocorra a separação de fases. Este comportamento é observado tanto para sistemas polímero-polímero-água quanto para sistemas polímero-sal-água.

Zafarani-Moattar e Sadeghi (2001) analisaram o efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais para o sistema PEG/NaH₂PO₄/água, a 25 °C, constatando que o aumento da massa molar do PEG provocou o deslocamento das curvas binodais para menores concentrações de PEG e sal. Resultados semelhantes também foram obtidos por Voros *et al.* (1993) para sistemas aquosos contendo polietilenoglicol e sais. Este efeito ocorre devido à diminuição da solubilidade do PEG em água, à medida que aumenta a massa molar do PEG. Em outras palavras, o aumento da incompatibilidade entre os componentes do sistema é causado devido ao caráter mais hidrofóbico de PEG de maior massa molar.

Com relação à concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero. A viscosidade das fases também aumenta com o aumento na concentração do polímero e isso pode influenciar a partição da proteína alvo (ASENJO, 1990; ALBERTSSON, 1971).

Tubío *et al.* (2005) verificaram, em sistemas aquosos compostos por citrato de sódio + PEG de diferentes massas molares, pH 9,2 e a 22°C, que as curvas binodais se tornaram assimétricas e mais próximas da origem com o aumento da massa molecular do PEG e, conseqüentemente, menores concentrações de PEG eram necessárias para que ocorresse a separação de fases.

1.5.2. Potencial Hidrogeniônico

O efeito do pH na separação das fases foi estudado por Huddleston *et al.* (1991) para sistemas PEG-fosfato de potássio. Observou-se que com o aumento do pH de 6,0 para 9,2 houve um deslocamento da curva binodal, no sentido de menores concentrações de polímero e sal.

Ferreira *et al.* (2007), estudando a influência do pH nos diagramas de fase constituído por PEG 6000 e cloreto de cálcio, verificaram que, com a redução do pH, houve a necessidade de aumentar a quantidade de sal adicionado para a formação de duas fases.

Padilha *et al.* (2011), estudando os diagramas de fase compostos por PEG 400/fosfato e PEG 4000/fosfato em dados de pHs que variaram de 6 a 11, notaram que não houve deslocamento significativo das binodais, corroborando com estudos de Diamond e Hsu (1992). No entanto, para estudos de SAB PEG/fosfato, realizados por Videira e Aires-Barros (1994), a redução do pH de 8,0 para 7,0 aumentou a concentração do polímero e sais, necessários para a formação de fases.

1.5.3. Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000). A temperatura pode levar a mudanças na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros, alterando a forma da curva binodal no diagrama de fases (CARVALHO, 2004). Os sistemas com constituição próxima da composição do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido à instabilidade inerente a essa região. Um deslocamento da curva binodal pode levar, facilmente, o sistema para a região monofásica (BAMBERGER *et al.*, 1985).

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero-polímero ou polímero - sal. Para o sistema PEG e dextrana, foi constatada que, com o aumento da temperatura, era necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores a ambiente. Já para PEG e sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas a ambiente, a separação das fases do sistema é facilitada. Foi observado também para o sistema PEG e sal, que o aumento da temperatura favorece o aumento da

concentração de PEG na fase superior do sistema e, conseqüentemente, ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (FORCINITI e HALL, 1991; ZASLAVSKY, 1995).

Graber *et al.* (2004), estudando o efeito das temperaturas de 5°C, 25°C e 45°C em sistemas PEG 4000/sulfato de lítio/água, concluíram que o aumento da temperatura provocou o deslocamento da curva binodal, aumentando a região bifásica, o que implica numa menor concentração do sal e do polímero necessários para a formação dos sistemas aquosos bifásicos. Zafarani-Moattar e Gasemi (2002) investigaram a influência da temperatura (25, 35 e 45) °C em sistemas aquosos PEG 6000/(NH₄)₂ HPO₄ e PEG 6000/NH₄H₂PO₄, verificando também uma expansão da área bifásica com o aumento da temperatura.

Zafarani-Moattar *et al.* (2004) estudaram a influência da temperatura no equilíbrio de fases de sistemas compostos por PEG 6000, citrato de sódio e água e concluíram que o aumento da temperatura provocou o aumento da região bifásica e da inclinação da linha de amarração.

De uma forma geral, os autores concluíram que o aumento da temperatura provoca diminuição da solubilidade mútua, ou seja, aumento da região bifásica. Igualmente, pode ser dito que o aumento da temperatura favorece a formação do SAB, pois a separação de fases é um processo endotérmico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

2.2. Materiais

2.2.1. Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados na realização do experimento foram: polímero polietilenoglicol (PEG), massa molar média 2000 g mol^{-1} (Sigma Aldrich, EUA); polímero poliacrilato de sódio, massa molar média 8000 g mol^{-1} (Sigma Aldrich, EUA); polímero poliacrilato de sódio 15000 g mol^{-1} (Sigma Aldrich, EUA); cloreto potássio P.A (VETEC, Brasil); ácido clorídrico P.A (ISOFAR, Brasil); hidróxido de cálcio P.A (VETEC, Brasil); e clorofórmio (VETEC, Brasil). Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., EUA) e reagentes químicos de grau analítico ou cromatográfico.

Os equipamentos utilizados durante a condução dos experimentos foram: agitador de tubos tipo Vortex; equipamento de purificação de água MilliQR (MilliPore[®]), balança analítica (Ohausadventurer[™] pro); banho termostático (Quimis, Brasil); pHmetro de bancada (HI 221, HANNA instruments, Brasil); centrífuga (5804, EPPENDORF, Alemanha); fotômetro de chama (Varian- AA240); estufa B.O.D (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil); liofilizador de bancada série LV2000 (TERRONI[®]); densímetro de bancada DMA 5000M (ATON PAAR); reômetro MARS (HAAKEMARS, ThermoElectronCorp., Alemanha), equipado com banho termostático (Phoenix 2C30P, ThermoElectronCorp., Alemanha) e sensor tipo cilindro concêntrico de 20 mm de diâmetro (Z 20 DIN).

2.3. Métodos

2.3.1. Determinação das curvas spinodais

Os procedimentos para obtenção da spinodal foram similares aos reportados na literatura (DA SILVA *et al.*, 2006b). Foi pesado 1g de solução concentrada de polímero (PEG) e adicionava-se de 10 em 10 μL da solução concentrada poliacrilato de sódio com uma pipeta automática até que se obtivesse um turvamento da solução. As soluções estoques de PEG e NaPA continham uma concentração de 150 mM de cloreto de potássio, concentração necessária para a formação de fase com pequenas quantidades dos polímeros. Após cada turvamento, adicionavam-se 100 μL de H_2O para que a solução se tornasse límpida. Todas as pesagens deste trabalho foram realizadas numa balança analítica (Ohausadventurer[™] pro). Todo o

procedimento de titulação turbidimétrica foi conduzido num banho termostático (Quimis, Brasil) a $25,00 \pm 0,01$ °C.

2.3.2. Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Os diagramas de equilíbrio contendo polietilenoglicol, poliacrilato de sódio e cloreto de potássio foram obtidos na temperatura de 25°C em pH 7,0 e 9,0. As curvas spinodais para estes sistemas foram obtidas mediante a técnica turbidimétrica, como citado anteriormente, na temperatura e valores de pH de estudo. Soluções estoque de PEG 50% m/m, poliacrilato de sódio 30% m/m e de cloreto de potássio 20% m/m foram utilizadas no experimento. A partir das spinodais obtidas foram preparados quatro pontos globais para cada condição estudada. Para obtenção dos sistemas, foram pesadas quantidades suficientes de PEG, NaPA, KCl e água em balança analítica até que se alcançasse uma massa final de 40 g. Após montagem dos sistemas, os tubos foram agitados manual e vigorosamente para que todos os reagentes se misturassem. Posteriormente, foram centrifugados durante 5 minutos a 4000×g e deixados em repouso, em estufa B.O.D. (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil) por 12 horas para que o equilíbrio fosse atingido.

Depois de ser alcançado o equilíbrio, as fases foram coletadas para análise dos componentes, utilizando-se seringas com agulhas longas. As fases superiores foram retiradas, primeiramente, com o cuidado de deixar uma camada de 0,5 cm desta fase acima da interface. Introduziu-se com cuidado uma seringa para a retirada da fase inferior no tubo, evitando a perturbação da interface. As fases foram então armazenadas apropriadamente sob refrigeração para análises dos componentes e construção dos diagramas.

2.3.3. Quantificação de PEG

A concentração de PEG foi determinada através de extração líquido-líquido, utilizando clorofórmio como solvente. Inicialmente, foram pesados aproximadamente 2 g de cada fase em tubos Eppendorf® de 15 mL, posteriormente, foi adicionada quantidade suficiente de hidróxido de sódio 1N para atingir o pH11, garantindo a dissociação completa do poliacrilato nas fases. Foi adicionado aos tubos 3mL de clorofórmio, em seguida, foram agitados em vortex e centrifugados a 4000×g por 5 minutos. A fase inferior, contendo PEG, foi coletada e armazenada em tubos Eppendorf®, previamente secos e pesados. A fase superior foi submetida a mais duas extrações para que todo o PEG existente fosse extraído. Por fim, os tubos contendo PEG + clorofórmio foram levados para estufa a 105°C por 12 horas para evaporação do clorofórmio e a massa de PEG foi obtida pesando os tubos secos. As análises foram realizadas em duplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão.

2.3.4. Quantificação do poliacrilato de sódio

Para o poliacrilato de sódio, o método de quantificação utilizado foi afotometria de chama. A determinação foi feita de maneira indireta, pela quantificação de sódio. Antes da análise, foi construída uma curva analítica para o sódio. A curva foi preparada com soluções de 0,1 a 0,75 mg.kg⁻¹, enquanto as fases foram diluídas de modo que a concentração estivesse dentro da faixa de calibração. Cada fase foi analisada em duplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão.

2.3.5. Quantificação de água

A quantidade de água presente nas fases foi determinada através da técnica de liofilização. Alíquotas de aproximadamente 1 g foram retiradas de cada fase e transferidas para vidros previamente pesados. As amostras foram congeladas e secas no liofilizador à temperatura de -32°C por 14 h. Após a secagem, os vidros foram pesados para a determinação da diferença de massa correspondente à água evaporada. As análises foram realizadas em duplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão.

2.3.6. Quantificação do cloreto de potássio

Para o cloreto de potássio, o método de quantificação utilizado foi afotometria de chama. A determinação foi feita de maneira indireta, pela quantificação do teor de potássio. Antes da análise, foi construída uma curva analítica para o potássio, que foi previamente seco em estufa por 2 h a 105°C. A curva foi preparada com soluções de 0,1 a 0,75 mg.kg⁻¹, enquanto as fases foram diluídas de modo que a concentração estivesse dentro da faixa de calibração. Cada fase foi analisada em duplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão.

2.3.7. Determinação da viscosidade

A viscosidade das fases, η , foi avaliada em um reômetro rotacional (HAAKE MARS, ThermoElectronCorp., Alemanha), equipado com banho termostático (Phoenix 2C30P, ThermoElectronCorp., Alemanha) e com sensor tipo cilindro concêntrico de 20 mm de diâmetro (Z 20 DIN) e *gap* anular de 0,85 mm. Foram feitas 100 leituras durante 120 segundos a uma taxa de deformação constante de 100 s⁻¹. O valor médio de η foi obtido através do *software Rheonwin4 Data Manager* com uma incerteza de $\pm 0,01$ mPa.s. A análise foi realizada a 25 °C ($\pm 0,15$ °C).

2.3.8. Determinação da densidade

Os valores de densidades foram medidos em um densímetro de tubo vibratório Anton Paar DMA – 5000 (Anton – Paar, Graz, Austria) com precisão de $\pm 5 \times 10^{-6}$ g.cm⁻³ na faixa de 0

a 3 g.cm^{-3} . A calibração do aparelho foi feita periodicamente sob pressão atmosférica, de acordo com as especificações, utilizando água deionizada e ar seco.

2.4 Delineamento Experimental e Análises Estatísticas

Os experimentos para obtenção dos diagramas de equilíbrio e da determinação da densidade e viscosidade das fases foram conduzidos no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com duas repetições, em duplicata cada repetição. A partir dos resultados das linhas de amarração, ajustou-se um modelo exponencial decrescente de três parâmetros para construção das curvas binodais. Os resultados das densidades e viscosidade foram submetidos à análise de regressão linear. Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico Statistical Analysis System® versão 9.0, procedimento GLM (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa. A confiabilidade do modelo matemático obtido foi avaliada, verificando-se a falta de ajustamento do modelo (FAJ), o coeficiente de determinação (R^2) em relação aos tratamentos e o nível de significância estatístico ($p < 0,05$) pelo teste de Fisher (F). Os coeficientes do modelo foram analisados empregando o procedimento GLM (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e o nível de significância dos coeficientes da regressão foi obtido pelo teste de Student (t).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estimativa dos desvios padrões encontrados para as análises dos SAB's, formados por PEG 2000, poliacrilato de sódio 8000, cloreto de potássio e água, foram de 0,124 para quantificação do PEG, 0,065 para a quantificação do NaPA, 0,115 para a quantificação do cloreto de potássio e 0,377 para a quantificação da água. Já para os SAB's formados por PEG 2000, poliacrilato de sódio 15000, cloreto de potássio e água, foram de 0,091 para quantificação do PEG, 0,110 para a quantificação do NaPA, 0,099 para a quantificação do cloreto de potássio e 0,479 para a quantificação da água. Os desvios padrões encontrados são considerados baixos, quando comparados com valores encontrados por Carvalho (2007) e Machado (1999).

As composições globais e de equilíbrio, da fase superior e da fase inferior, dos SAB's formados por PEG 2000, poliacrilato de sódio 8000, cloreto de potássio e água, e PEG 2000, poliacrilato de sódio 15000, cloreto de potássio e água são mostradas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Para cada diagrama, foram determinados dados para quatro linhas de amarração.

Tabela 3: Frações mássicas (%m/m) para sistemas formados por PEG 2000 g.mol⁻¹ (w₁), poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹(w₂), cloreto de potássio (w₃) e água (w₄), em diferentes valores de pH.

Linhas de amarração	Composição global				Fase superior				Fase inferior			
	w ₁	w ₂	w ₃	w ₄	w ₁	w ₂	w ₃	w ₄	w ₁	w ₂	w ₃	w ₄
pH 7,0												
1	0,074	0,079	0,007	0,839	0,116	0,045	0,0063	0,831	0,027	0,114	0,0085	0,850
2	0,087	0,093	0,008	0,811	0,147	0,042	0,0059	0,815	0,015	0,145	0,0107	0,829
3	0,099	0,098	0,009	0,795	0,184	0,042	0,0048	0,769	0,012	0,159	0,0134	0,815
4	0,114	0,108	0,010	0,769	0,223	0,042	0,0037	0,731	0,008	0,173	0,0153	0,804
pH 9,0												
1	0,063	0,085	0,007	0,844	0,111	0,045	0,0076	0,837	0,021	0,130	0,0114	0,849
2	0,082	0,092	0,010	0,816	0,140	0,043	0,0067	0,818	0,015	0,145	0,0114	0,828
3	0,091	0,088	0,009	0,812	0,166	0,040	0,0044	0,807	0,015	0,154	0,0120	0,819
4	0,098	0,104	0,008	0,790	0,189	0,040	0,0045	0,776	0,012	0,171	0,0128	0,804

Os balanços de massa apresentaram erro médio relativo de 1,75 % para o balanço de massa global, de 1,16 % para o PEG, de 1,47 % para o poliacrilato de sódio, 1,21 para o cloreto de potássio e de 1,16 % para a água. Quando se traça a linha de amarração, verifica-se o alinhamento dos pontos relativos às fases e a mistura global. Quanto menor os erros no balanço de massa, mais alinhados estão os pontos.

Tabela 4: Frações mássicas (%m/m) para sistemas formados por PEG 2000 g.mol⁻¹ (w₁), poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹(w₂), cloreto de potássio (w₃) e água (w₄), em diferentes valores de pH.

Linhas de amarração	Composição global				Fase superior				Fase inferior			
	w ₁	w ₂	w ₃	w ₄	w ₁	w ₂	w ₃	w ₄	w ₁	w ₂	w ₃	w ₄
pH 7,0												
1	0,081	0,082	0,009	0,828	0,135	0,0432	0,0070	0,814	0,0270	0,125	0,0121	0,8385
2	0,090	0,091	0,008	0,811	0,156	0,0434	0,0041	0,796	0,0182	0,142	0,0126	0,8185
3	0,099	0,096	0,008	0,797	0,188	0,0402	0,0039	0,768	0,0119	0,154	0,0129	0,8216
4	0,112	0,106	0,009	0,774	0,219	0,0395	0,0016	0,740	0,0052	0,174	0,0130	0,8078
pH 9,0												
1	0,072	0,086	0,009	0,834	0,123	0,0457	0,0053	0,827	0,0222	0,127	0,0129	0,8462
2	0,087	0,092	0,009	0,817	0,161	0,0402	0,0013	0,797	0,0082	0,148	0,0119	0,8422
3	0,098	0,097	0,009	0,799	0,181	0,0401	0,0019	0,777	0,0080	0,155	0,0127	0,8340
4	0,116	0,105	0,010	0,769	0,226	0,0428	0,0056	0,726	0,0069	0,172	0,0141	0,8170

Pode ser observado na Tabela 3 e 4 que a fração mássica do cloreto de potássio é maior na fase inferior, rica em poliacrilato de sódio, independente da massa molar do polímero e do pH do sistema. Pode ser observado também que as frações mássicas da água nas fases são próximas. De acordo com Carvalho *et al.* (2004), as interações PEG-água são caracterizadas pela formação de camada de solvatação ao redor das moléculas de PEG, diminuindo a entropia translacional das moléculas de água. Esse comportamento do PEG em solução aquosa pode explicar o fato do sal apresentar-se em maior concentração na fase inferior dos sistemas, na qual a concentração do poliacrilato de sódio é maior e a água encontra-se mais disponível para solvatar os seus íons.

3.2. Efeito do pH

As Figuras 3 e 4 mostram as linhas de amarração ao variar o pH dos sistemas compostos por PEG 2000/NaPA 8000 e PEG 2000/NaPA 15000, respectivamente.

Observando a Figura 3 e a Tabela 5, pode-se constatar uma diferença significativa do comprimento da linha de amarração, sendo este maior para o sistema formado por PEG 2000 g.mol⁻¹/NAPA 8000g.mol⁻¹/KCl/água em pH 7,0. Já a inclinação da linha de amarração (Tabela 7) para estes sistemas não apresentou diferença significativa. Na Figura 4 e nas Tabelas 6 e 8, foi observado que não houve diferença significativa do comprimento de amarração e para a inclinação da linha de amarração para os sistemas compostos por PEG 2000 g.mol⁻¹/NAPA 15000g.mol⁻¹/KCl/água em diferentes valores de pH.

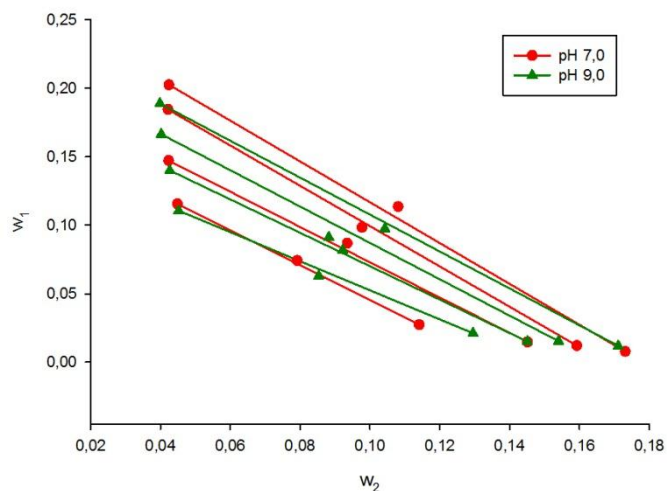


Figura 3: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹(w₁), poliacrilato de sódio 8000g.mol⁻¹ (w₂), cloreto de potássio e água, nos pH's 7,0 e 9,0.

De acordo com Silva e Loh (2006), o comprimento de linha de amarração está associado à seletividade do sistema. Quanto menor o comprimento da linha de amarração, CLA, associada a uma dada composição global do sistema, mais próximo a 1 será o valor do coeficiente de partição da biomolécula de interesse, portanto, menos seletiva a extração. Entretanto, com o aumento do CLA, a transferência da proteína tende a uma das fases, isto é, o valor do coeficiente de partição torna-se cada vez mais distante de 1, para mais ou para menos. Esse comportamento é resultante do aumento na diferença da composição entre as fases que gera,consequentemente, o incremento das contribuições entrópicas e entálpicas na transferência da proteína para uma das fases.

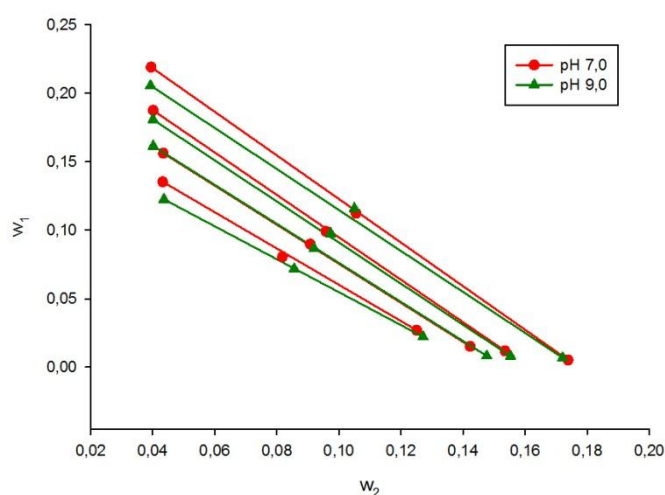


Figura 4: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹(w₁), poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹(w₂), cloreto de potássio e água, nos pH's 7,0 e 9,0.

Nas Tabelas 5 e 6, estão apresentados os comprimentos das linhas de amarração para os sistemas compostos por PEG 2000/NaPA 8000 e PEG 2000/NaPA 15000, respectivamente.

Tabela 5: Comprimento das linhas de amarração para PEG 2000 g.mol⁻¹/NaPA 8000g.mol⁻¹/Cloreto de potássio/Água em diferentes valores de pH.

Linhas de amarração	pH			
	7,0		9,0	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	11,2	0,2069	12,3	0,0014
2	16,8	0,0103	16,2	0,1785
3	20,8	0,0179	17,8	0,1090
4	25,1	0,1861	22,0	0,5744

Tabela 6: Comprimento das linhas de amarração para PEG 2000 g.mol⁻¹/NaPA 15000g.mol⁻¹/Cloreto de potássio/Água em diferentes valores de pH.

Linhas de amarração	pH			
	7,0		9,0	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	13,592	0,4373	12,958	1,5827
2	16,978	0,2308	18,718	0,4571
3	20,906	0,0403	20,776	0,1013
4	25,266	0,1275	25,415	0,5902

Nas Tabelas 7 e 8, estão apresentados as inclinações das linhas de amarração para os sistemas compostos por PEG 2000/NaPA 8000 e PEG 2000/NaPA 15000, respectivamente.

Tabela 7: Inclinação das linhas de amarração para PEG 2000 g.mol⁻¹/NaPA 8000g.mol⁻¹/Cloreto de potássio/Água em diferentes valores de pH.

Linhas de amarração	pH			
	7,0		9,0	
	Média	Desvio	Média	Desvio
1	1,3	± 0,0025	1,1	± 0,0027
2	1,3	± 0,018	1,3	± 0,3487
3	1,5	± 0,0094	1,6	± 0,0695
4	1,6	± 0,0082	1,3	± 0,0303

Tabela 8: Inclinação das linhas de amarração para PEG 2000 g.mol⁻¹/NaPA 15000g.mol⁻¹/Cloreto de potássio/Água em diferentes valores de pH.

Linhas de amarração	pH			
	7,0		9,0	
	Média	Desvio	Média	Desvio
1	1,3	± 0,175	1,3	± 0,2434
2	1,4	± 0,0518	1,4	± 0,0639
3	1,5	± 0,0022	1,5	± 0,0010
4	1,6	± 0,0576	1,7	± 0,0859

3.3. Efeito da massa molar

Os diagramas de fases, Figuras 5 e 6, apresentam a influência da massa molar do poliácrlato de sódio sobre os sistemas estudados.

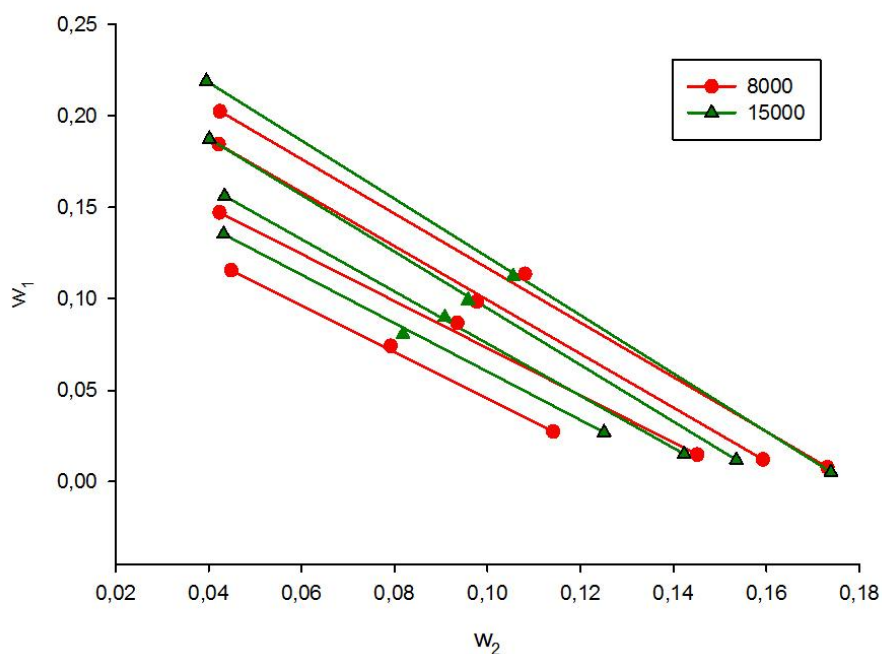


Figura 5: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹(w₁), poliácrlato de sódio 8000 g.mol⁻¹(w₂) e 15000g.mol⁻¹(w₂), cloreto de potássio e água, em pH7,0.

Com os dados apresentado na Figura 5 e nas Tabelas 5 a 8, pode-se observar que não houve diferença significativa entre o comprimento e a inclinação das linhas de amarração dos sistemas compostos por PEG 2000 g.mol⁻¹/NAPA 8000g.mol⁻¹/KCl/água e PEG 2000 g.mol⁻¹/NAPA 15000g.mol⁻¹/KCl/água em pH 7,0.

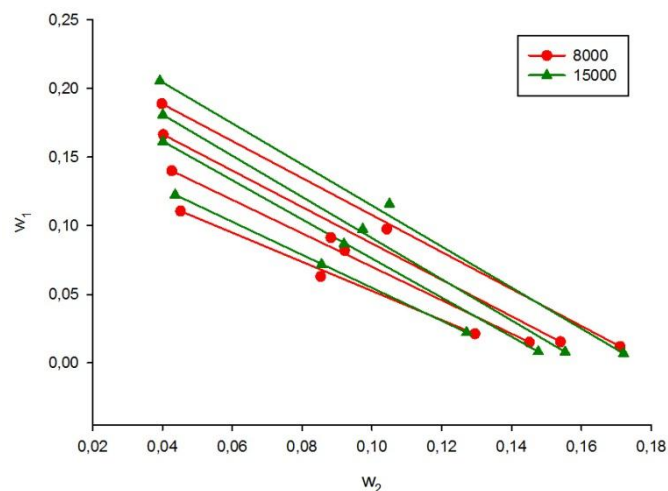


Figura 6: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietilenoglicol $2000\text{g.mol}^{-1}(w_1)$, poliacrilato de sódio $8000\text{ g.mol}^{-1}(w_2)$ e $15000\text{g.mol}^{-1}(w_2)$, cloreto de potássio e água, em pH 9,0.

Com os dados apresentado na Figura 6 e nas Tabelas 5 a 8, pode-se observar que houve diferença significativa entre o comprimento e a inclinação das linhas de amarração dos sistemas estudados, sendo que seus valores foram maiores para os sistemas compostos por PEG 2000 g.mol^{-1} /NAPA 15000g.mol^{-1} /KCl/água.

De acordo com Carvalho (2004), a inclinação da linha de amarração é uma medida de como as composições das fases variam com a modificação de propriedades do sistema. O valor da inclinação é calculado pela relação entre a variação da quantidade do PEG e a variação da quantidade de NaPA nas duas fases em equilíbrio (DP / DN). Nesse caso, o aumento da ILA ocorreu ao aumento da quantidade de PEG na fase superior. Comportamento similar foi verificado por Carvalho (2004).

3.4. Propriedades físico-químicas das fases

Na Tabela 9 e 10 são apresentados os dados obtidos para densidade e viscosidade das fases superior e inferior para sistemas compostos por PEG 2000 g.mol^{-1} /NAPA 8000g.mol^{-1} /KCl/água e PEG 2000 g.mol^{-1} /NAPA 15000g.mol^{-1} /KCl/água em pH 7,0 e 9,0, respectivamente. Os resultados foram submetidos à análise de regressão linear múltipla, sendo ajustados modelos matemáticos que predizem o comportamento das variáveis dependentes (viscosidade e densidade) em função dos fatores estudados pH, concentração de PEG e concentração de NaPA, conforme visto na Tabela 11 e 12.

Tabela 9: Densidade e viscosidade para sistema composto por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água em diferentes valores de pH.

Linhas de Amarração	pH 7,0				pH 9,0			
	$\rho/g.cm^{-3}$		$\eta/Pa.s$		$\rho/g.cm^{-3}$		$\eta/Pa.s$	
	superior	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior	inferior
1	1,04324	1,09247	0,00341	0,00595	1,04320	1,0870	0,00329	0,00450
2	1,04460	1,10901	0,00392	0,00709	1,04492	1,1027	0,00354	0,00644
3	1,04554	1,12548	0,00454	0,00865	1,04783	1,1189	0,00413	0,00797
4	1,04832	1,13891	0,00462	0,01130	1,06048	1,1344	0,00483	0,00965

Tabela 10: Densidade e viscosidade para sistema composto por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água em diferentes valores de pH.

Linhas de Amarração	pH 7,0				pH 9,0			
	$\rho/g.cm^{-3}$		$\eta/Pa.s$		$\rho/g.cm^{-3}$		$\eta/Pa.s$	
	superior	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior	inferior
1	1,04146	1,08359	0,00342	0,00740	1,04141	1,0905	0,00337	0,00757
2	1,04368	1,10273	0,00378	0,00983	1,04149	1,1038	0,00379	0,01010
3	1,04403	1,11563	0,00435	0,01268	1,04371	1,1158	0,00439	0,01271
4	1,04665	1,12874	0,00515	0,01630	1,04740	1,1309	0,00525	0,01690

Observa-se na Tabela 9 que as densidades das fases superior e inferior do sistema composto por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água variaram de 1,0432 g.cm⁻³ a 1,06048g.cm⁻³ e 1,0870 g.cm⁻³ a 1,13891 g.cm⁻³, respectivamente. As viscosidades para o sistema supracitado variaram de 0,00329 Pa.s a 0,00483 Pa.s para a fase superior e 0,0045 Pa.s a 0,01130 Pa.s para a fase inferior. Para o sistema composto por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água (Tabela 10), as densidades variaram de 1,04146 g.cm⁻³ a 1,0474 g.cm⁻³ e 1,08359 g.cm⁻³ a 1,1309 g.cm⁻³ para as fases superior e inferior, respectivamente. As viscosidades variaram de 0,00337 Pa.s a 0,00525 Pa.s para a fase superior e 0,00740 a 0,01690 para a fase inferior.

De acordo com a variação citada anteriormente, observa-se uma diferença de densidade entre as fases. A fase inferior rica em poliacrilato de sódio é mais densa que a fase superior rica em polietilenoglicol. Foi verificado um aumento da densidade com a elevação da concentração dos constituintes dos SABs, isto é, de PEG e NaPA, sendo que o sistema que apresentou a maior diferença de densidade (7,95%) foi o sistema composto por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água em pH 7,0, que originou a linha de amarração 4.

Foi observado também diferença de viscosidade entre as fases. A fase inferior rica em poliacrilato de sódio é mais viscosa que a fase superior rica em polietilenoglicol. Foi verificado um aumento da viscosidade com a elevação da concentração dos constituintes dos SABs, isto é, de PEG e NaPA, sendo o sistema que apresentou a maior diferença de viscosidade (68,93%) foi o sistema composto por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água em pH 9,0, que originou a linha de amarração 4. De acordo com Rao *et al.* (1991), alta diferença de viscosidade entre as fases é benéfica em termos operacionais, porque diminui o tempo de separação de fases.

Machado (1999), estudando sistemas formados por PEG/maltodextrina, verificaram que a densidade e a viscosidade da fase inferior dos seus sistemas foram maiores que as da fase superior. Verificaram também que essas propriedades aumentaram com a elevação da concentração e da massa molar dos constituintes do sistema, comportamento semelhante ao encontrado neste trabalho.

O modelo geral linear foi ajustado aos dados experimentais das propriedades densidade (ρ) e viscosidade (η) em função da concentração de PEG (w_1), concentração de NaPA(w_2) e pH (w_3). O modelo geral linear, Equação 3, foi avaliado e os parâmetros não significativos foram eliminados com base no teste t (Student) com $p > 0,05$

$$\gamma = \beta_0 + \beta_1 w_1 + \beta_2 w_2 + \beta_3 w_3 + \beta_4 w_1 w_2 + \beta_5 w_1 w_3 + \beta_6 w_2 w_3 \quad [3]$$

Na Equação 3, γ é a propriedade em estudo, os subscritos 1, 2 referem-se às concentrações de PEG e NaPA, respectivamente, e o 3 ao valor de pH em estudo. Na Tabela 9 e 10 são apresentados os valores dos coeficientes polinomiais, obtidos na regressão para densidade e viscosidade dos sistemas compostos por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água e polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água, respectivamente.

De acordo com a Tabela 11 e 12, todos os fatores em estudo (concentração de PEG, NaPA e pH) afetaram significativamente a densidade ($p < 0,05$). Para a fase superior dos sistemas formados por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água, o efeito da concentração de PEG, o valor do pH e a interação entre a concentração de PEG e valor do pH foram significativos ($p < 0,05$). Para a fase inferior foram significativos ($p < 0,05$) a concentração do PEG, do NaPA e a interação concentração de PEG e concentração de NaPA. Para a fase superior dos sistemas formados por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água, foram significativos ($p < 0,05$) o efeito da concentração do PEG e do NaPA. Para a fase inferior, apenas a concentração do NaPA foi significativo ($p < 0,05$).

Tabela 11. Coeficientes da Equação 3 para sistemas compostos por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água.

Densidade							
Fase	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	R ²
Superior	1052,16	-0,8825	-	-2,0418	-	0,1905	0,97
Inferior	1035,65	40,720	8,259	-	-4,86	-	0,86

Viscosidade							
Fase	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	R ²
Superior	1,794	0,1406	-	-	-	-	0,85
Inferior	-5,724	9,354	1,325	-	-0,940	-	0,90

* Os valores dos coeficientes devem ser divididos por 1000

Tabela 12. . Coeficientes da Equação 3 para sistemas compostos por polietilenoglicol 2000g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/cloreto de potássio/água.

Densidade							
Fase	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	R ²
Superior	1019,4	0,6763	3,004	-	-	-	0,92
Inferior	978,71	-	8,706	-	-	-	0,94

Viscosidade							
Fase	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	R ²
Superior	0,857	0,1919	-	-	-	-	0,96
Inferior	-15,92	-	1,845	-	-	-	0,93

* Os valores dos coeficientes devem ser divididos por 1000

Segundo as Tabelas 11 e 12, verificou-se que, para todos os sistemas estudados, o efeito do pH não interferiu significativamente ($p < 0,05$) na viscosidade. Para as fases superiores dos sistemas formados por polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/ cloreto de potássio/água e polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/ cloreto de potássio/água, somente o efeito da concentração do PEG afetou a viscosidade. Para a fase inferior formada por polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹/ cloreto de potássio/água, o efeito da concentração do PEG, da concentração do NaPA e da interação entre esses fatores influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a viscosidade. Já para a fase inferior, composta por polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹/ cloreto de potássio/água, apenas o efeito da concentração de NaPA influenciou significativamente ($p < 0,05$) a viscosidade.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se chegar às seguintes conclusões:

- A concentração de sal foi maior na fase inferior dos sistemas estudados e a concentração de água nas fases foi próxima;
- Para sistemas compostos de polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 8000 g.mol⁻¹ / cloreto de potássio/água, o comprimento da linha de amarração foi maior em pH 7,0;
- Para sistemas compostos de polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹ / cloreto de potássio/água, não houve diferença significativa do comprimento da linha de amarração para os valores de pH em estudo;
- Em pH 7,0, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) do TLL entre os sistemas formados por diferentes massas molares dos polímeros;
- Em pH 9,0, houve diferença significativa ($p > 0,05$) do TLL, sendo que o sistema formado por polietilenoglicol 2000 g.mol⁻¹/poliacrilato de sódio 15000 g.mol⁻¹ / cloreto de potássio/água apresentou um maior comprimento;
- Para a ILA, apenas em pH 9,0 houve diferença significativa dessa propriedade para diferentes massas molares de NaPA;
- Os resultados obtidos para densidade e viscosidade foram submetidos à análise de regressão linear múltipla, obtendo-se modelos matemáticos que predizem o comportamento destas variáveis em função do pH, concentração de PEG e da concentração de NaPA.

5. REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P-A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**, 2nd edition, Wiley, New York, 1971.
- ASENJO, J.A. **Separation Processes in Biotechnology**. Marcell Dekker Inc., New York, 801p., 1990.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D. E.; SHARP, K. A.; VAN ALSTINE, J. M.; WEBBER, T. J. Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISCHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase system**. Orlando: Academic Press, 1985.
- BLAZQUEZ, G.; CAMACHO, F.; GONZALEZ – TELLO; ALARCÓN, F. J. Partition coefficients of α -amylase in aqueous two – phase systems PE + MgSO₄·7H₂O + H₂O at 298 K. **Biochemistry Biophysical Acta**, n. 1379, p. 191-197, 1998.
- CARVALHO, C.P. **Estudo do Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Poli (Etileno) Glicol, Sais e Água**. 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- CASCONE, O.; ANDREWS, B. A. and ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 13, p. 629, 1991.
- COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Xylanase Recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 629, p. 70-72, 1998.
- 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**, 110, 23540 – 23546, 2006b.
- DA SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning *J. Chem. Eng. Data*, v. 46, p. 251-255, 2001.
- DA SILVA, L.H.M., MEIRELLES, A.J.A. Bovine serum albumin, α -lactalbumin and β -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous-two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, p. 398-401, 2000.
- DA SILVA, M. C. E.; DA SILVA, L. H.M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. C. R.; MINIM, L. A. Sistema Aquoso Bifásico: Uma Alternativa Eficiente para Extração de Íons. **Quim.Nova**, Vol. 29, No. 6, 1332-1339, 2006a.
- DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemistry Engineering**, v. 47, n. 135, p. 89-135, 1992.

FARIA, J. T., SAMPAIO, F. C., CONVERTI, A., PASSOS, F. M. L., MINIM, V. P. R., MINIM, L. A. Use of response surface methodology to evaluate the extraction of *Debaryomyces hansenii* xylose reductase by aqueous two-phase system. **J. Chromat. B**, in press (doi:10.1016/j.jchromb.2009.07.023).

FERREIRA, G. B.; EVANGELISTA, A. F.; JUNIO, J. B.S.; SOUZA, R. R.; CURVELO SANTANA, J. C.; TAMBOURGI, E. B.; JORDÃO, E. Partitioning Optimization of Proteins from *Zea mays* Malt in ATPS PEG 6000/CaCl₂. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 557-564, 2007.

FILHO, E. S. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. Liquid – Liquid Equilibrium for Ternary Systems Containing a Sugar + a Synthetic Polymer + Water. *J. Chem. Eng. Data*. 47, 1346 – 1350, 2002.

FORCINITI, D. and HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. *Fluid Phase Equilibria*, v. 61, p. 243- 262, 1991.

GIRALDO-ZUÑIGA A.D. **Sistemas aquosos polietileno glicol-sal: Separação de -lactoglobulina e -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator Graesser**. Dissertação Mestrado, UFV; Viçosa; 2000.

GRABER, T. A., GÁLVEZ, M. E., GALEQUILLOS, H. R., BENEDÍ, J. A. Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + lithium sulfate at different temperatures. Experimental determination and correlation. *J. Chem Eng Data*, 49, 1661-1664, 2004.

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.

GUOQIANG, D. KAUL, R., MATTIASSON, B. Purification of *Lactobacillus bulgaricus* D-lactate dehydrogenase by precipitation with an anionic polymer. *Biosepar.*, 3:333-341, 1993.

HAGHTALAB, A.; MOKHTARANI, B. The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K₂HPO₄ or Na₂SO₄). *Fluid Phase Equilibria.*, 215, 151-161, 2004.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems: A general overview. *Molecular Biotechnology*, v. 19, p. 269-277, 2001.

HUDDLESTON, J. G., WILLAUER, H. D., BOAZ K. R., ROGERS, R. D. Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. **J. Chromatogr. B**, 711, p. 237-244, 1998.

HUGHES, P., LOWE, C. R. Purification of proteins by aqueous two-phase partition in novel acrylic co-polymer systems. *Enz. Microb. Technol.*, 10:115-122, 1988.

JOHANSSON, H-O, ISHII, M., MINAGUTI, M., FEITOSA, E., PENNA, T.C.V., PESSOA JR., A. Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-poly(acrylate) aqueous two-phase systems. *Sep. Pur. Technol.*, 62, 1, 166-174, 2008a.

JOHANSSON, H – O; MAGALDI, E. F.; PESSOA JR, A. P. protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two – phase systems. **Journal of Chromatography A**, 1178 145–153, 2008b.

LI, M.; ZHU, Z.-Q.; MEI, L. M. Liquid-Liquid Equilibria for Hydroxy propyl Starch + Poly(ethyleneglycol) + Water at 25 °C. *J. Chem. Eng. Data*. 41, 500-503, 1996.

LU, M.; TJERNELD, F. Interaction between tryptophan residues and hydrophobically modified dextran effect on partitioning of peptides and proteins in aqueous two – phase systems. **Journal of Chromatography**, v. 766, p. 99-108, 1997.

MACHADO, F. L. C. **Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietileno glicol-maltodextrina-água**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 1999.

NERLI, B. B.; ESPSRIZ, M.; PICÓ, A. Thermodynamic study of forces involved in bovine sérum albumin and ovalbumin partitioning in aqueous two – phase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p. 468-474, 2000.

OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA JUNIOR, A. Partition behavior and partial purification of hexokinase in aqueous twophase polyethylene glycol/citrate systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105-108, p. 787-797, 2003.

OLIVEIRA, L. A.; SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; TAMBOURGI, E. B. Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 766, p. 27-36, 2001.

PESSOA, JR. e KILIKIAN, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. Barueri: Manole, 2005, 444 p.

PLANAS, J.; KOZLOWSKI, A.; HARRIS, J. M.; TJERNELD, F.; HAHN – HAERDAL, B. Novel polymer – polymer conjugates for recovery of lactic acid by aqueous two – phase extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 66, n. 4, p. 211-218, 1999.

RITO – PALOMARES, M.; NERETE, A.; ENRIQUE, .; SERRANO – CARREON, L. Aroma compounds recovery from mycelial cultures in e aqueous two – phases process. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 403-408, 2000.

SARAVANAN, S.; REENA, J. A.; RAO, J. R.; MURUGESAN, T.; NAIR, B. U. Phase Equilibrium Compositions, Densities, and Viscosities of Aqueous Two-Phase Poly(ethylene glycol) + Poly(acrylic acid) System at Various Temperatures. **Journal of Chemistry Engineer Data**, 51, 1246-1249, 2006.

SARAVANAN, S; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol) –poly (acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. *Process Biochemistry*, 43, 905-911, 2008.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com colunas de disco perfurados e rotativos**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2000.

SAS Institute Inc. Getting Started with the SASR 9,0 ADX Interface for Design of Experiments. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SAVE, S. V.; PANARKAR, V. G.; KUMAR, S. V. Intensification of mass transfer in aqueous two – phase systems. *Biotechnology and Bioengineering.*, v. 41, p. 72-78, 1993.

SÉ, R. A. G.; AZNAR, M. Liquid-Liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + potassium phosphate at four temperatures: Experimental determination and thermodynamic modeling. *J. Chem. Eng. Data*, 47, 1401-1405, 2002.

SIMONET, F.; GARNIER, C. DOUBLIER, J. L. Partition of proteins in the aqueous guar/dextran two – phase system. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 591 – 600, 2000.

SNYDER, S. M.; COLE, K. D.; SZLAG, D. C. Phase Compositions, Viscosities, and Densities for Aqueous Two-Phase Systems Composed of Polyethylene Glycol and Various Salts at 25 °C. *J. Chem. Eng. Data*, v. 37, p. 288-274, 1992.

TJERNELD, F. Aqueous Two-Phase Partitioning on an Industrial Scale, in *Poly (Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, ed. Harris J.M; Plenum Press, New York, 1992.

TRUUST, H.; JOHANSSON, G. Fractionation of wheat proteins by counter – current distribution using aqueous two – phase systems containing propionic acid. **Journal of Chromatography B.**, v. 680 p. 71-80, 1996.

TUBÍO 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. *J. Chem. Eng. Data*.50, 1392- 1395, 2005.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293-301, 2004.

VENÂNCIO, A.; ALMEIDA, C.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two – phase system. *Bioseparation*, v. 5, n. 5, p. 253-258, 1995.

VENÂNCIO, A.; ALMEIDA, C.; TEIXEIRA, J. A. Enzyme purification with aqueous two – phase systems: Comparison between systems composed of pure polymers and systems composed of crude polymers. **Journal of Chromatography B.**, v. 680, p. 131 – 136, 1996.

VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p. 237-240, 1994.

VOROS, N.; PROUST, P.; FREDENSLUND, A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib*, 90, 333-35, 1993.

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.

WU, Y.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. Separation of endopolygalacturonase using aqueous two – phase partitioning. **Journal of Chromatography B.**, n. 743, p. 271 – 279, 2000.

YANKOV, D. S.; TRUSLER, J.P.M.; STATEVA, R. P.; CHOLAKOV, G. St. Influence oh pH an acids solutes on the phase behavior of aqueous solutions containing poly (ethylene glycol) an poly (ethyleneimine). **Biochemical Engineering Journal**, 48, 104-110, 2009

ZAFARANI-MOATAR, M.; SADEGHI, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate.Experiment and correlation.*Fluid Phase Equilib.*181, 95-112, 2001.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMIDI, A. A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two phase poly (ethylene glycol)-potassium citrate system.*J. Chem. Eng. Data.*, 48, 262-265.2004.

ZAFARANI-MOATTAR, M.; GASEMI, J. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate.Experiment and correlation.*Fluid Phase Equilib*, 2002, 198, 281-291.

ZASLAVSKY, B. Y. *Aqueous two-phase partitioning physical chemistry and bioanalytical applications*; Marcel Dekker, New York, 1995.

ZASLAVSKY, B. Y., Bioanalytical applications of partitioning in aqueous polymer two-phase systems. **Analytical Chem**, v.15, p.765-773, 1992.