



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

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO TERMODINÂMICA PARA PREDIÇÃO DA**  
**PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

**ITAPETINGA**  
**BAHIA- BRASIL**

**2020**

**OLGA REINERT RAMOS GANDOLFI**

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO TERMODINÂMICA PARA PREDIÇÃO DA  
PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Tese apresentado à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos.

**Orientadora:** Renata Cristina Ferreira Bonomo

**Co-Orientador:** Cristiane Martins Veloso

Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Sérgio de Sousa Castro

**ITAPETINGA  
BAHIA - BRASIL**

**2020**

660.634 Gandolfi, Olga Reinert Ramos.

G187m Modelagem e simulação termodinâmica para predição da partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos. / Olga Reinert Ramos Gandolfi. – Itapetinga-BA: UESB, 2020.

121f.

Tese apresentado à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos. Sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação da Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Cristiane Martins Veloso, Prof. D. Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e Prof. D. Sc. Sérgio de Sousa Castro.

1. Modelagem termodinâmica. 2. Sistema Aquoso Bifásico – Partição de proteína. 3. UNIFAC - Universal Functional Activity Coefficient. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Veloso, Cristiane Martins. IV. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. V. Castro, Sérgio de Sousa. VI. Título.

**CDD(21): 660.634**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Modelagem termodinâmica
2. Sistema Aquoso Bifásico – Partição de proteína
3. UNIFAC - Universal Functional Activity Coefficient

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** MODELAGEM E SIMULAÇÃO TERMODINÂMICA PARA PREDIÇÃO DA PARTIÇÃO DE BIOMOLÉCULAS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.

**Autor (a):** OLGA REINERT RAMOS GANDOLFI

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

**Coorientador (a):** Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Prof.ª Dr.ª Cristiane Martins Veloso

Prof. Dr. Sérgio Sousa Castro

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



Prof. Dr. Sérgio Sousa Castro  
UESB



Prof.ª Dr.ª Cristiane Martins Veloso  
UESB



Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior  
UESB



Prof.ª Dr.ª Rosana Moura de Oliveira  
Membro Externo - IFBAIANO



Prof.ª Dr.ª Renata Cristina Ferreira Bonomo  
Orientadora - UESB  
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 17 de abril de 2020.

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”.*

*(Mahatma Gandh)*

*A Deus*

*Aos meus amados pais*

*Aos meus queridos irmãos*

*Ao meu namorado Gabriel*

*Ao meu sobrinho Daniel*

*Dedico!!*

## **Agradecimentos**

*Agradeço primeiramente a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar nas dificuldades na conclusão de mais uma etapa preciosa em minha vida.*

*Aos meus pais Estefano e Kátia, que sempre me incentivaram a estudar, pelos ensinamentos e valores que fizeram de mim o que sou hoje, por entender as minhas falhas e momentos de afastamento e pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. Amo vocês!*

*Aos meus irmãos Karine, Tamille e Jorge, por compartilharem momentos inesquecíveis, pelas experiências divididas e por sempre torcerem por mim. Ao meu sobrinho e afilhado Daniel, por mostrar que pequenos momentos fazem a diferença.*

*Ao meu companheiro Gabriel, por estar sempre ao meu lado e principalmente pelo incentivo, força e ajuda na execução do experimento, não me deixando desanimar durante os momentos mais difíceis do doutorado, por idas e vindas na UESB nunca me deixando sozinha, por todo amor, carinho e compreensão que foram primordiais na concretização deste trabalho. Amo você!*

*Agradeço à minha orientadora, professora Renata Bonomo, pela excelente orientação desde a graduação, mestrado e agora no doutorado. Pela amizade, oportunidades e pela confiança depositada em mim e por todo conhecimento compartilhado ao longo deste tempo.*

*Ao meu co-orientador Sérgio Castro pelas imensas contribuições e ensinamentos, pela amizade e por acompanhar e ajudar desde a elaboração do projeto. Todo seu conhecimento e suporte foram fundamentais no desenvolvimento desse trabalho.*

*Aos membros da banca Sérgio, Cristiane, Baraquizio e Rosana por aceitarem fazer parte da avaliação deste trabalho e pelas contribuições dadas.*

*Ao professor Rafael Fontan, pela amizade, pelas sugestões, apoio e pelos inúmeros conhecimentos passados durante toda a realização do trabalho.*

*Aos professores e alunos do laboratório de Engenharia de Processos (LEP) pela companhia, ajuda e momentos de descontração. Em especial à Rui, Izabella, Letícia, Beatriz e Vanessa, pela amizade e pelos muitos auxílios prestados no experimento.*

*À Marília e Mariana pela amizade desde a graduação e por dividirem comigo tantas alegrias e tristezas durante todo esse tempo.*

*Aos meus familiares e aos amigos conquistados durante esse tempo, em especial à Grazielly, Ben-Hur e Rafael pelos momentos de felicidade e pela torcida por essa conquista.*

*Aos meus sogros Aurea e Francisco por estarem sempre presentes ajudando e torcendo por mim, tornando essa jornada mais fácil.*

*Não poderia deixar de agradecer a academia Casca Grossa, pelos momentos de descontração e pelas porradas diárias.*

*À Universidade Estadual da Bahia (UESB) em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL) pela oportunidade de aprendizado, pela estrutura de laboratórios e pelos servidores que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.*

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

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio ao experimento.*

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

*Muito Obrigada!!*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	17
1. Introdução.....	19
2. Revisão Bibliográfica .....	21
2.1. Sistema Aquoso Bifásico.....	21
2.2. Partição de Solutos em Sistemas Aquosos Bifásicos .....	24
2.3. Modelagem e Teoria da Formação dos SAB.....	28
2.4. Método UNIFAC (UNIQUAC Functional-group Activity Coefficient).....	32
2.5. Modelos Aplicados a Partição de Proteínas em SAB.....	37
2.6. Teoria de Flory-Huggins para Soluções Poliméricas .....	38
2.7. Teoria de Johansson de Coladoradores .....	42
3. Objetivos.....	47
3.1. Objetivo Geral .....	47
3.2. Objetivos Específicos .....	47
4. Material e Métodos .....	48
4.1. Determinação dos Diagramas de Fase.....	48
4.2. Determinação das Linhas de Amarração .....	48
4.3. Determinação do Efeito Salting-Out .....	50
4.4. Determinação do Volume Efetivo de Exclusão ( <i>EEV</i> ).....	50
4.5. Determinação da Energia de Interação em SAB .....	51
4.6. Partição das Proteínas.....	54
4.7. Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos da Partição .....	55
4.7.1. Determinação da Entalpia de Transferência ( $\Delta trH$ ).....	55
4.7.2. Determinação da Energia Livre de Gibbs de Transferência ( $\Delta trG$ ).....	56
4.7.3. Determinação da Entropia de Transferência ( $\Delta trS$ ).....	56
4.8. Modelagem e Simulação da Partição.....	56
5. Resultados e Discussão.....	62
5.1. Diagramas de Equilíbrio.....	62
5.1.1. Efeito Salting-Out dos Sistemas e Volume Efetivos de Exclusão ( <i>VEE</i> ).....	75
5.1.2. Modelagem Termodinâmica dos SAB .....	78
5.2. Partição das Proteínas.....	85
5.3. Determinação da Variação de Entalpia e Entropia no Processo da Partição da Lisozima	92

5.4. Modelagem Termodinâmica da Partição da Lisozima .....	94
5.4.1. Parâmetros de Interação pelo Modelo UNIFAC .....	94
5.5.2. Parâmetros Termodinâmicos do Modelo Proposto .....	103
Interações de Longo Alcance .....	103
Contribuições Entálpicas do Processo de Partição .....	104
Contribuições Entrópica do Processo de Partição .....	105
6. Conclusão .....	107
7. Referências .....	108

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição global dos sistemas formado por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ e $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) + água, expressas em porcentagem mássica (%m/m).....	49
<b>Tabela 2.</b> Grupos de contribuição de cada componente e quantidade dos grupos que se repetem. ....	51
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros $R_K$ e $Q_K$ utilizados neste trabalho. ....	53
<b>Tabela 4.</b> Valores dos parâmetros a, b, c e d da Eq. (57) para o SAB PEG (4000 e 6000) ( $w_1$ ) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ e $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) ( $w_2$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas, $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ e $p = 0.1 \text{ Mpa}^b$ .....	68
<b>Tabela 5.</b> Linhas de amarração em fração mássica para o SAB formado por PEG 4000 ( $w_1$ ) + $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ( $w_2$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ e $p = 0.1 \text{ Mpa}^a$ .....	70
<b>Tabela 6.</b> Linhas de amarração em fração mássica para o SAB formado por PEG 6000 ( $w_1$ ) + $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ( $w_2$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ e $p = 0.1 \text{ Mpa}^a$ .....	71
<b>Tabela 7.</b> Linhas de amarração em fração mássica para o SAB formado por PEG 4000 ( $w_1$ ) + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ( $w_2$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ e $p = 0.1 \text{ Mpa}^a$ .....	72
<b>Tabela 8.</b> Linhas de amarração em fração mássica para o SAB formado por PEG 6000 ( $w_1$ ) + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ( $w_2$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ e $p = 0.1 \text{ Mpa}^a$ .....	73
<b>Tabela 9.</b> Valores dos parâmetros da Eq. (64) para os sistemas PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ e $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ e pressão $p = 0.1 \text{ MPa}^b$ .....	74
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros de ajuste ( $\beta$ e $k$ ) do efeito salting-out e do volume efetivo de exclusão ( $V_{213}^*$ e $f$ ) para os SAB para os sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ e $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ e pressão $p = 0.1 \text{ MPa}^b$ .....	76
<b>Tabela 11.</b> Parâmetros de interação ( $a_{ij}$ e $a_{ji}$ ) de grupo e energia de interação ( $T_{ij}$ e $T_{ji}$ ) para sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ nas temperaturas (20, 25, 30 e 35) $^\circ\text{C}$ . ....	79
<b>Tabela 12.</b> Desvios nas composições dos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) + $\text{H}_2\text{O}$ , pelo modelo UNIFAC.....	82

<b>Tabela 13.</b> Coeficiente de partição da lisozima ( $K_p$ ) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ) nos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $Na_2SO_4$ e $Na_3C_6H_5O_7$ ) + $H_2O$ , em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ } ^\circ C$ . .....	87
<b>Tabela 14.</b> Coeficiente de partição da $\alpha$ -lactoalbumina ( $K_p$ ) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ) nos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $Na_2SO_4$ e $Na_3C_6H_5O_7$ ) + $H_2O$ , em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ } ^\circ C$ . .....	89
<b>Tabela 15.</b> Coeficiente de partição da albumina sérico bovina ( $K_p$ ) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ) nos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $Na_2SO_4$ e $Na_3C_6H_5O_7$ ) + $H_2O$ , em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ } ^\circ C$ . .....	91
<b>Tabela 16.</b> Parâmetros termodinâmicos para a lisozima em SAB formados por PEG 4000 + sal ( $Na_2SO_4$ ou $Na_3C_6H_5O_7$ ) + $H_2O$ , em diferentes temperaturas $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ } ^\circ C$ . .....	92
<b>Tabela 17.</b> Parâmetros de interação ( $a_{ij}$ e $a_{ji}$ ) entre os grupos de contribuição da proteína com os grupos de contribuição dos componentes do sistema. ....	94
<b>Tabela 18.</b> Valores dos coeficientes de atividade do termo de Debye-Hückel para $Na_2SO_4$ , nas 3 linhas de amarração. ....	103
<b>Tabela 19.</b> Valores dos coeficientes de atividade UNIFAC residual para PEG, $Na_2SO_4$ e $H_2O$ nas 3 linhas de amarração. ....	104
<b>Tabela 20.</b> Valores dos coeficientes de atividade do termo Residual de Johansson para PEG, $Na_2SO_4$ , $H_2O$ e Lisozima, nas 3 linhas de amarração. ....	105
<b>Tabela 21.</b> Valores dos coeficientes de atividade do termo UNIFAC Combinatorial para PEG, $Na_2SO_4$ e $H_2O$ , nas 3 linhas de amarração. ....	106
<b>Tabela 22.</b> Valores dos coeficientes de atividade do termo Combinatorial Johansson para PEG, $Na_2SO_4$ e $H_2O$ , nas 3 linhas de amarração. ....	106

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do diagrama de fase. ....	22
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da exclusão entre os volumes ocupados por duas moléculas. ....	24
<b>Figura 3.</b> Microcalorímetro de titulação isotérmica. ....	26
<b>Figura 4.</b> Termograma de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC). ....	27
<b>Figura 5.</b> Conceito dos grupos de contribuição. ....	31
<b>Figura 6.</b> Modelo reticular de uma solução ideal das moléculas de um soluto (círculos verdes) e de um solvente (círculos brancos) se distribuem segundo uma rede. ....	39
<b>Figura 7.</b> Modelo reticular de distribuição de uma solução polimérica. As moléculas de um soluto (círculos verdes) e de um solvente (círculos brancos) se distribuem segundo uma rede. ....	40
<b>Figura 8.</b> Fluxograma do modelo proposto neste trabalho .....	61
<b>Figura 9.</b> Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica do sistema PEG 4000 g·mol <sup>-1</sup> (w <sub>1</sub> ) + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (w <sub>2</sub> ) (A), PEG 6000 g·mol <sup>-1</sup> (w <sub>1</sub> ) + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (w <sub>2</sub> ) (B), PEG 4000 g·mol <sup>-1</sup> (w <sub>1</sub> ) + Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (w <sub>2</sub> ) (C) e PEG 6000 g·mol <sup>-1</sup> (w <sub>1</sub> ) + Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (w <sub>2</sub> ) (D), em diferentes T = 20 (•), 25 (◦), 30 (▼) e 35 (Δ) °C e p=0.1 Mpa. ....	63
<b>Figura 10.</b> Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica do sistema PEG 4000 g·mol <sup>-1</sup> (•) ou PEG 6000 g·mol <sup>-1</sup> (◦) (w <sub>1</sub> ) + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (w <sub>2</sub> ) em diferentes temperaturas: 20 °C (A), 25 °C (B), 30 °C (C) e 35 °C (D) e p=0.1 Mpa. ....	64
<b>Figura 11.</b> Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica do sistema PEG 4000 g·mol <sup>-1</sup> (•) ou PEG 6000 g·mol <sup>-1</sup> (◦) (w <sub>1</sub> ) + Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (w <sub>2</sub> ) em diferentes temperaturas: 20 °C (A), 25 °C (B), 30 °C (C) e 35 °C (D) e p=0.1 Mpa. ....	65
<b>Figura 12.</b> Curvas binodais expressas em fração mássica do sistema PEG 4000 g·mol <sup>-1</sup> (w <sub>1</sub> ) + sal (w <sub>2</sub> ) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (•) e Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (◦) em diferentes temperaturas: 20 °C (A), 25 °C (B), 30 °C (C) e 35 °C (D) e p=0.1 Mpa. ....	66
<b>Figura 13.</b> Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica do sistema PEG 6000 g·mol <sup>-1</sup> (w <sub>1</sub> ) + sal (w <sub>2</sub> ) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (•) e Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (◦) em diferentes temperaturas T= 20 °C (A), 25 °C (B), 30°C (C) e 35 °C (D) e p=0.1 Mpa. ....	67
<b>Figura 14.</b> Linhas de amarração em unidade de fração mássica par o SAB PEG 4000 (w <sub>1</sub> ) + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (w <sub>2</sub> ) a diferentes temperaturas T = 20°C (A), 25°C (B), 30°C (C) e 35°C (D). Linhas de amarração experimental (—); linhas de amarração correlacionadas pelo modelo UNIFAC (- - -). LA1 (•); LA2 (◦) e LA3 (▲). ....	82

**Figura 15.** Linhas de amarração em unidade de fração mássica par o SAB PEG 6000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $w_2$ ) a diferentes temperaturas  $T = 20^\circ\text{C}$  (A),  $25^\circ\text{C}$  (B),  $30^\circ\text{C}$  (C) e  $35^\circ\text{C}$  (D). Linhas de amarração experimental (—); linhas de amarração correlacionadas pelo modelo (- - -). LA1 (●); LA2 (○) e LA3 (▲). ..... 83

**Figura 16.** Linhas de amarração em unidade de fração mássica par o SAB PEG 4000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $w_2$ ) a diferentes temperaturas  $T = 20^\circ\text{C}$  (A),  $25^\circ\text{C}$  (B),  $30^\circ\text{C}$  (C) e  $35^\circ\text{C}$  (D). Linhas de amarração experimental (—); linhas de amarração correlacionadas pelo modelo UNIFAC (- - -). LA1 (●); LA2 (○) e LA3 (▲). ..... 84

**Figura 17.** Linhas de amarração em unidade de fração mássica par o SAB PEG 6000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $w_2$ ) a diferentes temperaturas  $T = 20^\circ\text{C}$  (A),  $25^\circ\text{C}$  (B),  $30^\circ\text{C}$  (C) e  $35^\circ\text{C}$  (D). Linhas de amarração experimental (—); linhas de amarração correlacionadas pelo modelo UNIFAC (- - -). LA1 (●); LA2 (○) e LA3 (▲). ..... 85

## RESUMO

GONDOLFI, O. R. R. **Modelagem e simulação termodinâmica para predição da partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos**. Itapetinga – BA: UESB, 2020. 121 p. (Projeto de Tese – Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos).\*

Para otimizar a aplicação dos sistemas aquosos bifásicos (SAB) no processo de purificação é necessário o conhecimento das interações que ocorrem no processo de transferência da proteína nas fases. O conhecimento teórico aliado à modelagem e à simulação podem ajudar a escolher os sistemas que apresentem melhores valores de partição. Diante disto, o objetivo deste trabalho é propor um modelo para predição dos coeficientes de partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos, utilizando o modelo UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient) combinado ao modelo proposto por Johansson e colaboradores. Para isto, primeiramente foram obtidos dados de equilíbrio de sistemas compostos por polietilenoglicol (PEG 4000 g.mol<sup>-1</sup> e PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup>), sal (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>) e água em diferentes temperaturas T = (20, 25, 30 e 35) °C, totalizando 16 diagramas de fases, com três linhas de amarração em cada diagrama. Os diagramas de fase foram determinados mediante a técnica turbidimétrica e as linhas de amarração pela regra da alavanca. Posteriormente foi realizada a partição de proteínas modelo ( $\alpha$ -lactoalbumina, lisozima e albumina sérico bovina (BSA)). Observou-se que a temperatura não apresentou efeito nas composições de equilíbrio de fase dos SAB. A massa molar do polímero exerceu influência nos diagramas de fase, observando maior região bifásica com o PEG 6000. Foi verificado que os sistemas compostos por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> apresentaram maior região bifásica quando comparado com os sistemas formados por C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>. O comprimento da linha de amarração (CLA) aumentou com o aumento da composição global dos constituintes em todos os sistemas estudados. Além disso, foram determinados a capacidade salting-out e o volume efetivo de exclusão (VEE) dos sistemas. Foi observado que nos sistemas compostos por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o efeito salting-out foi maior que nos sistemas formados por C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>. O VEE para um mesmo sal foi maior nos sistemas formados por PEG 6000 quando comparados com o PEG 4000. Além disso, os dados de equilíbrio dos sistemas foram modelados termodinamicamente utilizando o modelo Universal Functional Activity Coefficient (UNIFAC) e foi observado valores baixos dos desvios global (2,970%). A lisozima,  $\alpha$ -lactalbumina e BSA migraram preferencialmente para a fase inferior na maioria dos sistemas. Foi utilizado também o modelo UNIFAC para determinação dos parâmetros de interação entre os grupos de contribuição da proteína com os componentes do sistema. Posteriormente foi proposto um modelo para prever o coeficiente de partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos, utilizando o modelo

UNIFAC combinado ao modelo proposto por Johansson e colaboradores. Foi verificado que o modelo apresentou valores dos coeficientes de atividade para os componentes do sistema (PEG, sal e água) e para a proteína (lisozima). Os coeficientes de atividade residuais e combinatoriais do modelo de Johansson foram muito altos.

**Palavras-chave:** coeficiente de atividade; transferência de massa; interações entálpica; interações entrópicas; Debey-Hückel; UNIFAC e método de contribuição de grupos.

---

\* Orientadora: Renata Cristina Ferreira Bonomo, Dra., UESB. Co-orientadores: Cristiane Martins Veloso Dra., UESB; Rafael da Costa Ilhéu Fontan Dr., UESB; Sérgio de Sousa Castro Dr., UESB.

## ABSTRACT

GONDOLFI, O. R. R. Modeling and simulation for prediction of biomolecule partitioning in aqueous two-phase systems. Itapetinga – BA: UESB, 2020. 121 p. (Thesis Project – Doctorate Degree in Food Engineering and Science).\*

To optimize the application of aqueous two-phase systems (ATPS) in the purification process, it is necessary to know the interactions that occur in the protein transfer process in the phases. Theoretical knowledge combined with modeling and simulation can help to choose the systems that present the best partition values. In view of this, the objective of this work is to propose a model for predicting the partition coefficients of biomolecules in two-phase aqueous systems, using the UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient) model combined with the model proposed by Johansson and collaborators. For this purpose, equilibrium data for systems composed of polyethylene glycol (PEG 4000 g.mol<sup>-1</sup> and PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup>), salt (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>) and water at different temperatures T = (20, 25, 30 and 35) °C were first obtained, totaling 16 phase diagrams, with three tie-line in each diagram. The phase diagrams were determined using the turbidimetric technique and tie-lines using the lever rule. Afterwards it was performed model proteins partition ( $\alpha$ -lactalbumin, lysozyme and bovine serum albumin (BSA)). It was observed that the temperature did not have effect on the ATPS phase equilibrium compositions. The molar mass of the polymer influenced the phase diagrams, observing a larger biphasic region with PEG 6000. It was found that the systems composed of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> showed a greater biphasic region when compared to the systems formed by C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>. The tie-line lengths (*TLL*) increased with the increase in the overall composition of the constituents in all systems studied. In addition, the salting-out capacity and the effective exclusion volume (*EEV*) of the systems were determined. It was observed that the systems composed of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> the salting-out effect was greater than in the systems formed by C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>. The *EEV* for the same salt was higher in the systems formed by PEG 6000 when compared to the PEG 4000. In addition, the equilibrium data of the systems were thermodynamically modeled using the Universal Functional Activity Coefficient (UNIFAC) model and low values of the deviations overall (2.970%) were observed. Lysozyme,  $\alpha$ -lactalbumin and BSA migrated preferentially to the lower phase in most systems. The UNIFAC model was also used to determine the parameters of interaction between the groups of contribution of the protein with the components of the system. Subsequently, a model was proposed to predict the protein partition coefficient in aqueous two-phase systems, using the UNIFAC model combined with the model proposed by Johansson and collaborators. It was verified that the model presented values of the activity coefficients for the components of the system (PEG, salt and water) and for the protein (lysozyme). The residual and combinatorial activity coefficients of the Johansson model were very high.

**Key-words:** Activity coefficient; mass transfer; enthalpic interactions; entropic interactions; Debye-Hückel; UNIFAC and group contribution method.

---

\* Advisor (a): Renata Cristina Ferreira Bonomo, Dra., UESB. Co-advisor (a): Cristiane Martins Veloso Dra. UESB; Rafael da Costa Ilhéu Fontan Dr. UESB; Sérgio de Sousa Castro Dr. UESB.

## 1. Introdução

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) são formados espontaneamente após a mistura de duas soluções aquosas de componentes estruturalmente diferentes (como dois polímeros, um polímero e um sal, entre outros), acima de uma concentração crítica, à uma temperatura e pressão especificada (AZEVEDO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2018). Desde o trabalho pioneiro de Albertsson (1986), vários trabalhos de partição, extração ou purificação de solutos de interesse industrial por sistemas aquosos bifásicos têm sido realizados (GONÇALVES et al., 2018; GÓMES e MACEDO, 2019). A principal vantagem deste método para extração de materiais biológicos é o fato das duas fases formadas serem compostas principalmente por água, o que fornece um ambiente favorável à manutenção da estrutura e/ou atividade das biomoléculas (AZEVEDO et al., 2009; BARROS et al., 2014; CHICAROUX e ZEINER, 2019; GÓMES e MACEDO, 2019).

Devido às características vantajosas, os SAB são objeto de estudo de vários pesquisadores. Existem na literatura, trabalhos sobre a partição de proteínas (BARROS et al., 2016), enzimas (NASCIMENTO et al., 2018), aminoácidos (GÓMES e MACEDO, 2019), corantes (ALVARENGA et al., 2015), ácido nucleico (NAZER et al., 2017), entre outros.

Para a utilização dos SAB no processo de extração é necessário o conhecimento dos diagramas de fase. Esses diagramas podem ser obtidos experimentalmente ou podem ser preditos através de informações dos componentes da mistura e de suas interações. A determinação dos diagramas pelos modelos termodinâmicos diminui o tempo de experimentos, além de reduzir custos com materiais. Vários modelos para o cálculo do valor da energia livre de Gibbs em excesso têm sido propostos, correlacionando os dados de equilíbrio de fase e determinando coeficientes de atividade. Dentre eles destacam-se os modelos UNIFAC, NRTL, UNIQUAC e ASOG (GEBREYOHANNES et al., 2014; HAMTA et al., 2017; NAZER et al., 2017; DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019). O modelo UNIFAC é um dos mais empregados e utiliza o conceito do método de contribuição de grupos para o cálculo do coeficiente de atividade dos componentes presentes na mistura, dividindo em contribuições entálpica e entrópica. Neste modelo, os coeficientes de atividade são calculados a partir da contribuição de vários grupos que formam as moléculas do sistema (SMITH et al., 2007). Com isso, é possível prever o comportamento de equilíbrio químico em outros sistemas que não foram estudados experimentalmente, mas que contém os mesmos grupos de contribuição de sistemas já estudados (OISHI e PRAUSNITZ, 1978).

Para otimizar a aplicação dos SAB na purificação de biomoléculas, é importante desenvolver uma abordagem termodinâmica sistemática, do ponto de vista teórico e

experimental, a fim de determinar as interações intermoleculares responsáveis pelo processo de transferência da mesma entre as fases (RENGIFO et al., 2016). Diante disso, correlações e predição de partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos receberam ampla atenção nos últimos anos e procedimentos úteis para prática foram descritos por diversos pesquisadores (DIAMOND e HSU, 1990; EITEMAN et al., 1991; COUTINHO e PESSOA 2004; ANDREWS et al., 2005; HAGHTALAB e MOKHTARANI, 2005; MADEIRA et al., 2013; PEREZ et al., 2013; BARROS et al., 2014; BARROS et al., 2016; NAZER et al., 2017; PADILHA et al., 2017; WU et al., 2017). A maioria dos modelos propostos para partição de proteínas em SAB utilizam modelos empíricos que descrevem apenas a partição do soluto estudado nos sistemas avaliados e muitos modelos descrevem a partição em sistemas contendo dois polímeros. Desta forma, surge a necessidade de se propor um modelo que descreva de maneira geral a partição de biomoléculas em SAB e explique as possíveis energias que estão associadas à migração diferencial da proteína nas fases. Já outros pesquisadores estão utilizando o modelo proposto por Johansson et al. (1998) para explicar as contribuições entálpica e entrópica de forma qualitativa que ocorrem no processo de partição (MAGESTE et al., 2009; DE SOUSA et al., 2009; MAGESTE et al., 2012; ALVARENGA et al., 2015; JIMENEZ et al., 2016 e RENGIFO et al., 2016).

Portanto o desenvolvimento de um modelo que possa prever de forma qualitativa e quantitativa a partição de solutos em SAB torna-se necessário, pois não existe na literatura um modelo geral para predição do coeficiente de partição de proteínas e biomoléculas em sistema aquoso bifásico. A determinação dos parâmetros termodinâmicos de partição pode contribuir de maneira rápida e eficaz para escolha do melhor sistema para a partição, além de reduzir o tempo e os custos com os materiais utilizados na determinação experimental. Diante disso, neste trabalho foi proposto um modelo para prever o coeficiente de partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos, utilizando o modelo UNIFAC combinado ao modelo proposto por Johansson e colaboradores.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Sistema Aquoso Bifásico

A pureza e qualidade das proteínas e o custo dos processos biotecnológicos dependem em grande parte das etapas de downstream utilizada. As técnicas tradicionais empregadas para a extração de proteínas, como eletroforese, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade, geralmente, são complexas, de alto custo e difíceis de escalonar. Portanto, os pesquisadores têm desenvolvido métodos de separação que são ambientalmente seguros e de baixo custo, tais como a extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos (ZAFARANI-MOATTAR et al., 2019).

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) são formados quando dois ou mais compostos são misturados acima de uma determinada concentração crítica, formando duas fases imiscíveis. Podem ser formados por polímero-polímero, polímero-sal, álcool-sal e ainda de líquido iônico-sal, entre outros (VENTURA et al., 2011; RUIZ-RUIZ et al., 2012; PIMENTEL et al., 2017; WU et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018).

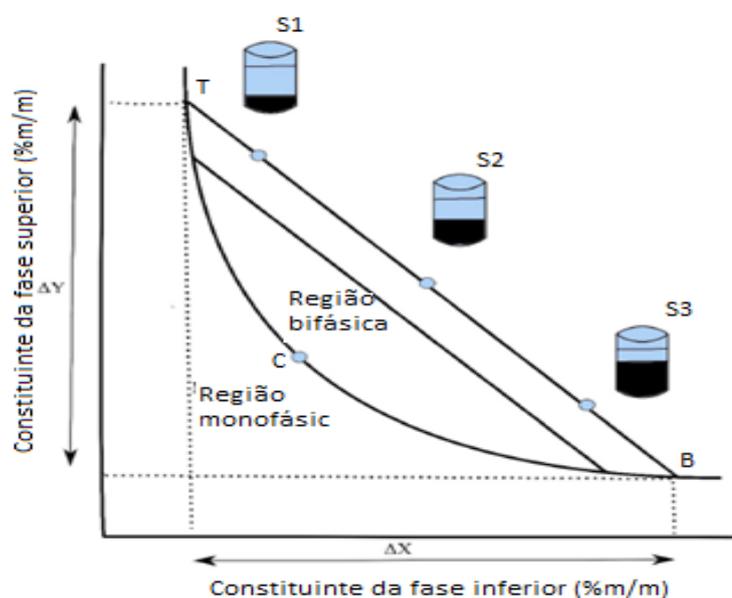
Este sistema foi reportado pela primeira vez pelo microbiologista holandês Beijerinck em 1896, o qual descobriu que soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel misturadas em determinadas faixas de temperatura e concentração formavam misturas turvas e, em repouso, separavam-se espontaneamente em duas fases líquidas límpidas (DA SILVA e LOH, 2006; WU et al., 2017). Entretanto, foi somente no final da década de 1950 que Albertsson aplicou um SAB na separação de materiais biológicos, como proteínas. Desde então, as pesquisas nesta área têm se aprofundado, tornando a utilização dos SAB uma ferramenta na partição, extração, purificação ou concentração de compostos, como corantes (MAGESTE et al., 2009; MAGESTE et al., 2012), enzimas (NASCIMENTO et al., 2018), proteínas (ALCÂNTARA et al., 2014; SAMPAIO et al., 2017), ácido nucleicos (EVERBERG et al., 2006), íons (DA SILVA et al., 2006), peptídeos (SOUZA Jr et al., 2014), entre outros.

Para a utilização de um sistema aquoso bifásico em um processo de extração é necessário o conhecimento das concentrações dos constituintes das fases do sistema, que são representadas nos diagramas de equilíbrio de fase. Segundo Kabiri-Badr e Cabezas Jr (1996), estes diagramas de fase tem grande importância para os estudos de separação de biomoléculas, visto que são utilizados como ferramenta básica de ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração e/ou purificação.

A Figura 1 apresenta um exemplo de diagrama de fase que é baseado nas composições (peso ou molar) de dois agentes formadores de fase (componente 1 e 2), fornecendo um

conjunto de dados úteis sobre o sistema em equilíbrio, como as concentrações mínimas dos componentes 1 e 2 necessários para a formação das duas fases delimitadas pela curva binodal, as concentrações dos componentes 1 e 2 nas fases superior e inferior e a razão de volume das fases. Embora os SAB sejam sistemas ternários, compostos por dois componentes formadores de fase e água, eles geralmente são expressos em coordenadas retangulares na qual a concentração de água é omitida (PEREIRA e COUTINHO, 2020). Os diagramas ternários descritos na Figura 1, dividem a região bifásica (acima da curva binodal) da região monofásica (abaixo da curva binodal) (DA SILVA e LOH 2006; IQBAL et al., 2016).

**Figura 1.** Representação esquemática do diagrama de fase.



Fonte: IQBAL et al. (2016).

As composições das fases em equilíbrio são representadas pelas linhas de amarração (LA), que conectam dois pontos na curva binodal, que corresponde à concentração dos componentes 1 e 2 nas fases superior e inferior. Um conjunto de pontos que se situa na região bifásica e que esteja em uma mesma linha de amarração (ex: S1, S2 e S3) 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).

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 geralmente é utilizado para expressar a influência da composição do sistema na partição dos solutos e é calculado pela Eq. (1) (DA SILVA e LOH, 2006).

$$CLA = \sqrt{[\Delta Y]^2 + [\Delta X]^2} \quad (1)$$

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

Segundo Pei et al. (2009), a medida que o valor do *CLA* aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, que pode favorecer a extração e/ou partição do soluto de interesse.

Outro parâmetro importante para caracterização dos SAB é a inclinação da linha de amarração (*ILA*). A *ILA* é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química, como temperatura, massa molar, por exemplo. O valor da *ILA* é obtido a partir da Eq. (2).

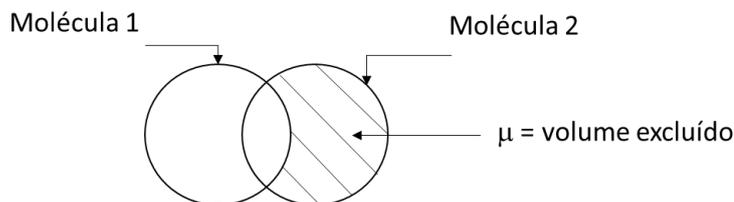
$$ILA = [\Delta Y]/[\Delta X] \quad (2)$$

O ponto C presente na Figura 1 é chamado de ponto crítico. Neste ponto as propriedades físico-químicas (composição e volume, entre outras) das duas fases são teoricamente iguais e neste ponto o *CLA* é igual a zero. Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases (ALBERTSSON, 1971; IQBAL et al., 2016).

Outro parâmetro para análise do SAB é a determinação do efeito salting-out. A capacidade salting-out de um sal refere-se à capacidade do mesmo em induzir a segregação da outra substância para a fase oposta (SOSA et al. 2017). Desta forma, quanto maior o efeito salting-out de um sal, menor concentração do mesmo é necessária para formar as fases do sistema. De acordo com Prausnitz (1999), a adição de um eletrólito forte em um sistema pode alterar a partição dos componentes nas fases em equilíbrio. As complexas interações entre os íons do eletrólito e as moléculas de um solvente polar, como a água, podem alterar a solubilidade de um determinado componente. Então, o efeito “salting out” ocorre quando o eletrólito diminui a solubilidade do soluto, enquanto que o efeito “salting in” é descrito pelo aumento da solubilidade do mesmo.

Juntamente com o efeito salting-out, a determinação do volume efetivo de exclusão (*VEE*) pode contribuir para a análise do processo de formação do SAB. O volume efetivo de exclusão está relacionado com uma espécie de espaços vazios disponíveis para interações moleculares, e de acordo Wang et al. (2010) o *VEE* caracteriza a afinidade de uma molécula de PEG por uma molécula de sal. Em geral uma molécula em solução tende a excluir as outras do volume que ela ocupa (Figura 2).

**Figura 2.** Representação esquemática da exclusão entre os volumes ocupados por duas moléculas.



Fonte: Canevarolo Jr. (2002)

A incompatibilidade termodinâmica de mistura e a separação de fases se devem principalmente ao efeito do volume efetivo de exclusão. O tamanho das moléculas 1 e 2 representam seu raio de rotação. Essas moléculas podem aproximar-se uma da outra até uma distância mínima equivalente à soma dos seus raios. Como as moléculas não são interpenetráveis e os seguimentos dos dois compostos não podem ocupar o mesmo espaço simultaneamente, elas promovem a exclusão mútua do seu respectivo espaço como mostra a área sombreada da Figura 2. Esse espaço inclui a camada de hidratação que envolve cada molécula, dessa forma, o volume efetivo de exclusão ao redor de cada molécula só é acessível às moléculas do solvente e não ao outro composto (DAMODARAN, 2009). Quando a concentração da Molécula 1 aumenta, o espaço disponível para a 2 na solução diminui em decorrência do aumento do volume total de exclusão. Em consequência disso as Moléculas 2 são forçadas a se agregar, separando-se em uma fase carregando consigo uma porção do solvente.

A determinação desses parâmetros (efeito salting-out, *VEE*, *CLA* e *ILA*) são importantes para compreender melhor o mecanismo de separação de fases. A partir desses diagramas de fase é possível obter as informações necessárias para aplicá-los no processo de partição. Cada diagrama possui características únicas devido as interações que ocorrem com os componentes do sistema. A formação dos diagramas de fase é influenciada por diferentes fatores, como temperatura, pressão, constituintes do sistema, peso molecular do polímero, tipo de eletrólito, entre outros (IQBAL et al., 2016).

## 2.2. Partição de Solutos em Sistemas Aquosos Bifásicos

Mesmo com inúmeros estudos e resultados de experimentos de partição (ALCÂNTARA et al., 2014; AZIZ et al., 2017; NAZER et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018, SAMPAIO et al., 2017), ainda não se compreende totalmente as forças motrizes que governam a distribuição das proteínas nos sistemas aquosos bifásicos. Portanto, surge a necessidade de

compreender melhor tais forças, visto que isto é imprescindível para aplicações práticas (RENGIFO et al., 2016).

A distribuição de solutos entre as duas fases aquosas de um SAB é caracterizada pelo coeficiente de partição,  $K_p$ , definido como:

$$K_p = \frac{c_{FS}}{c_{FI}} \quad (3)$$

Onde:  $c_{FS}$  e  $c_{FI}$  são as concentrações do soluto na fase superior (FS) e na fase inferior (FI) no equilíbrio.

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-ZUÑIGA, 2001; CHAIWUT et al., 2010).

As forças motrizes que determinam o comportamento de particionamento de solutos nos SAB não são muito bem entendidas, principalmente porque existem poucos estudos termodinâmicos descrevendo tal força na distribuição do soluto nos SAB. Desta forma, determinar os parâmetros termodinâmicos de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$ ) é fundamental para compreender e otimizar o processo de partição.

No processo de partição de um soluto em um sistema aquoso bifásico, o potencial químico do soluto  $i$  na fase superior ( $\mu_i^{FS}$ ) é igual ao potencial químico do componente  $i$  na fase inferior ( $\mu_i^{FI}$ ), quando o sistema se encontra em equilíbrio termodinâmico, ou seja:

$$\mu_i^{FS} = \mu_i^{FI} \quad (4)$$

O potencial químico do soluto na fase superior e inferior são expressos pelas Eq. (5) e (6), respectivamente:

$$\mu_i^{FS} = \mu_i^0(FS) + RT \ln a_i^{FS} \quad (5)$$

$$\mu_i^{FI} = \mu_i^0(FI) + RT \ln a_i^{FI} \quad (6)$$

Onde  $\mu_i^0(FS)$  e  $\mu_i^0(FI)$  são os potenciais químicos padrão do soluto  $i$  na fase superior e inferior, respectivamente,  $a_i^{FS}$  e  $a_i^{FI}$  a atividade do soluto  $i$  em cada uma das fases, R a constante dos gases ideais e T a temperatura absoluta do sistema. Igualando e reorganizando as Eq. (5) e (6), obtêm-se a Eq. (7):

$$\mu_i^0(FS) - \mu_i^0(FI) = RT \ln \frac{a_i^{FI}}{a_i^{FS}} \quad (7)$$

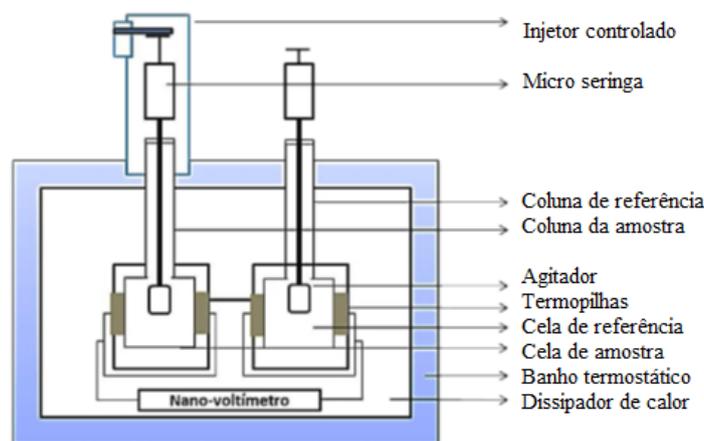
Nesta equação é possível observar que o termo da esquerda representa a variação da energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ), quando um mol do soluto é transferido da fase inferior para a fase superior do sistema, que pode ser observado na Eq. (8):

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln K_p \quad (8)$$

Desta forma, conhecendo o coeficiente de partição do soluto em uma temperatura específica é possível determinar  $\Delta_{tr}G$ .

No processo de transferência do soluto em um SAB, a variação de entalpia de transferência ( $\Delta_{tr}H$ ), é uma função de estado que permite determinar em que fase encontram-se os componentes com os quais o soluto apresenta interações intermoleculares mais fortes. A  $\Delta_{tr}H$  associada à mistura e reação de duas soluções de composições diferentes pode ser determinada utilizando a microcalorimetria de titulação isotérmica. Desta forma, os processos físicos e químicos podem ser acompanhados pela liberação ou absorção de energia (HEERKLOTZ e SEELIG, 2000).

**Figura 3.** Microcalorímetro de titulação isotérmica.



Fonte: Rengifo (2015).

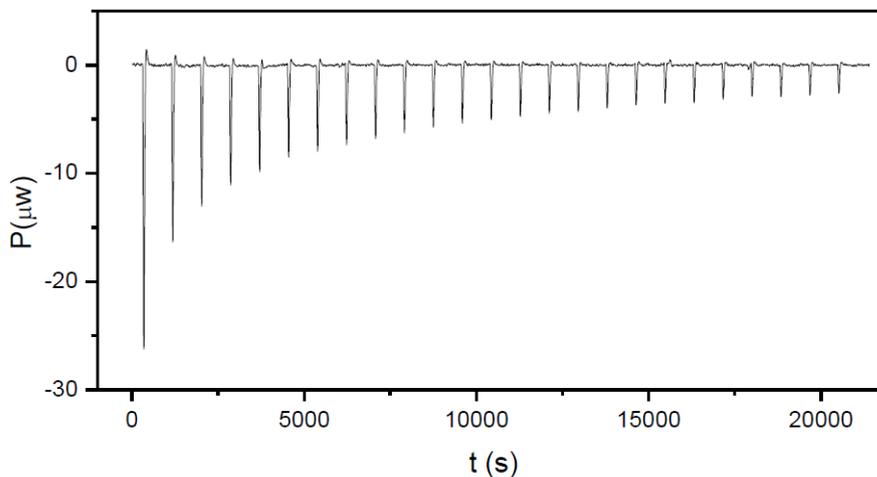
Em um calorímetro de titulação isotérmica (Figura 3), ocorre a mistura de duas soluções dentro de uma célula calorimétrica que se encontra em equilíbrio térmico com sua vizinhança num ambiente de temperatura altamente controlada. A solução titulante é adicionada dentro da célula calorimétrica por meio de um injetor controlado mecanicamente. A solução no interior da célula se encontra em constante agitação. Quando as duas soluções são misturadas, processos termodinâmicos envolvendo o rompimento e a formação de interações passam a ocorrer e a temperatura do sistema é variada de uma dada quantidade. O equilíbrio térmico é novamente alcançado quando é transferida energia na forma de calor entre o sistema e a vizinhança.

Essa quantidade de energia é detectada por termopilhas localizadas lateralmente às células calorimétricas, provocando uma diferença de potencial elétrico entre seus terminais, permitindo determinar a quantidade de energia na forma de calor absorvida ou liberada pelo sistema ( $dq$ ) por unidade de tempo ( $dt$ ) (Eq. (9)).

$$P = \frac{dq}{dt} \quad (9)$$

Desta maneira, é possível plotar um gráfico de potência em função do tempo (Figura 4).

**Figura 4.** Termograma de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC).



Fonte: Rengifo (2015).

Cada medida de fluxo de energia gera um pico que representa a energia associada à injeção de um pequeno volume da solução da seringa na solução presente na célula de amostra. A integral da curva de potência versus tempo fornece a quantidade de energia na forma de calor para cada injeção e conseqüentemente a variação de entalpia.

$$\Delta_{tr}H = q = \int_{t_1}^{t_2} P dt \quad (10)$$

Conhecendo os valores de  $\Delta_{tr}G$  e  $\Delta_{tr}H$  determinados pela Eq. (8) e pela microcalorimetria de titulação isotérmica, respectivamente, pode-se determinar os valores de  $\Delta_{tr}S$  para a partição de um soluto em um SAB, através da Eq. (11)

$$T\Delta_{tr}S = \Delta_{tr}H - \Delta_{tr}G \quad (11)$$

Assim, para otimizar a aplicação dos SAB na purificação de proteínas, é importante desenvolver uma abordagem termodinâmica sistemática, do ponto de vista teórico e experimental, a fim de determinar as interações intermoleculares responsáveis pelo processo de transferência da mesma entre as fases do SAB (RENGIFO et al., 2016). E para sua aplicação no processo de separação e/ou purificação é necessário o conhecimento dos diagramas de equilíbrio de fase. Esses diagramas podem ser obtidos experimentalmente ou a partir de modelos termodinâmicos. Segundo Asenjo e Andrews (2011) a separação de duas fases aquosas é dominada pelo equilíbrio termodinâmico do sistema e essa separação de fases depende dos constituintes do sistema e conseqüentemente das interações intermoleculares e das

contribuições entrópicas no processo de mistura. Tais interações entre os componentes do sistema refletem nas características físico-químicas das fases formadas, como por exemplo a concentração de água na fase superior e inferior, bem como a distribuição dos diferentes componentes no sistema, do volume de cada fase, da diferença de potencial elétrico, entre outras. O conhecimento e entendimento da formação das fases é imprescindível para o desenvolvimento de modelos que possam prever o equilíbrio de fases.

### 2.3. Modelagem e Teoria da Formação dos SAB

O mecanismo molecular por trás da separação de fase é governado pelo equilíbrio termodinâmico do sistema, de acordo com o tipo e a natureza química dos componentes formadores de fase. Desta forma, a formação das duas fases dos sistemas aquosos bifásicos dependerá das interações intermoleculares entre os constituintes formadores do sistema e das variações entrópicas resultantes do processo de mistura, expresso em termos de energia livre de mistura ( $\Delta_{mix}G$ ). Termodinamicamente, quando ( $\Delta_{mix}G < 0$ ), um sistema homogêneo é formado, caso contrário, o sistema procurará alcançar um novo estado de interações e configuração que leve a menor energia livre de Gibbs para o sistema, formando duas fases (alcançar o equilíbrio termodinâmico) (DA SILVA e LOH, 2006).

As relações de equilíbrio são decisivas no cálculo da força motriz para transferência de massa e na quantificação das composições das fases do sistema. De modo geral, o equilíbrio de fases é representado pela contribuição de isofugacidade, dada por (RODRIGUES e GONÇALVES, 2016):

$$\hat{f}_i^\alpha = \hat{f}_i^\beta = \dots = \hat{f}_i^\pi \quad (12)$$

Onde:  $\hat{f}_i^\alpha$ ,  $\hat{f}_i^\beta$  e  $\hat{f}_i^\pi$  são as fugacidades do componente  $i$  na fase  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi$ , respectivamente.

As fugacidades são geralmente representadas pelo coeficiente de fugacidade, quando há uma fase vapor envolvida, ou pelo coeficiente de atividade, quando há fase líquida envolvida. No equilíbrio líquido-líquido, as fugacidades são representadas pelo coeficiente de atividade, através da Eq. (13).

$$x_i^\alpha \gamma_i^\alpha = x_i^\beta \gamma_i^\beta \quad (13)$$

Onde:  $x_i^\alpha$  e  $x_i^\beta$  são as frações molares do componente  $i$  nas fases  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente;  $\gamma_i^\alpha$  e  $\gamma_i^\beta$  é o coeficiente de atividade do componente  $i$  nas fases  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente.

Esses coeficientes de atividade são calculados por modelos de energia livre de Gibbs em excesso. Os coeficientes de atividade da fase líquida estão relacionados à energia livre de Gibbs molar em excesso ( $G^E$ ) através das seguintes relações (SMITH et al., 2007):

$$RT \ln \gamma_i = \left( \frac{\partial G^E}{\partial n_i} \right)_{T,P,n_{j \neq i}} \quad (14)$$

$$\ln \gamma_i = \frac{G^E}{RT} \quad (15)$$

Onde: R é a constante dos gases ideais ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ); T é a temperatura (K);  $G^E$  é a energia livre de Gibbs de excesso;  $\gamma_i$  é o coeficiente de atividade do componente  $i$ ,  $n_i$  é o número de moles do componente  $i$ .

A magnitude dos coeficientes de atividade determina a forma das curvas de equilíbrio de fases; ou seja, a determinação de seus valores é primordial para a descrição termodinâmica do equilíbrio de fases. Estas quantidades medem o afastamento da solução do comportamento ideal e estão relacionadas com o arranjo molecular na solução e com a formação ou quebra de ligações entre as moléculas no processo de mistura e podem ser calculadas usando um dos vários modelos existentes (AGUIAR, 2009).

Diferentes modelos termodinâmicos para o cálculo do coeficiente de atividade a partir da energia livre de Gibbs em excesso estão disponíveis na literatura (DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019). Em geral, os modelos da literatura podem ser classificados como modelos semi-empíricos (Margules, Ridlich-Kister e Van Laar), modelo teórico, que incluem o conceito de composição local (Wilson, NRTL e UNIQUAC) e os modelos de contribuição de grupos (UNIFAC e ASOG) (GEBREYOHANNES et al., 2014).

O desenvolvimento de modelos teóricos do comportamento molecular de soluções líquidas são baseadas no conceito de composição local. Esse conceito fundamenta-se na ideia de que, no interior de uma solução líquida, composições locais, diferentes da composição global da mistura, são supostamente responsáveis pelas orientações moleculares de curto alcance e não aleatórias que resultam de diferenças no tamanho molecular e das forças intermoleculares dos componentes (SMITH et al., 2007). O primeiro modelo com esse conceito foi introduzido por G. M. Wilson em 1964, com a publicação de um modelo para o comportamento de soluções, conhecida como equação de Wilson (WILSON, 1964). A partir desta equação outros modelos surgiram, como o modelo NRTL (Non-Random-Two-Liquid) de Renon e Prausnitz (RENON e PRAUSNITZ, 1968) e o modelo UNIQUAC (UNIversal QUAsi-Chemical) de Abrams e Prausnitz (1975). Posteriormente, surgiu o modelo UNIFAC, baseado na equação UNIQUAC, no qual os coeficientes de atividade são calculados a partir da contribuição de vários grupos que formam as moléculas do sistema (FREDENSLUND et al., 1975, 1977).

O modelo de Wilson fornece uma boa representação do excesso de energia livre de Gibbs para uma variedade de misturas e é particularmente útil para compostos ou soluções

polares com tendência a se associar a solventes não polares. No entanto, a equação de Wilson não pode descrever sistemas com miscibilidade parcial e, portanto, não é útil para cálculos de extração líquido-líquido (DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019).

A equação NRTL (Non-Randon Two-Liquid) de Renon e Prausnitz (1968) também é baseada no conceito de composição local. Ao contrário da equação de Wilson, o modelo NRTL é aplicável à sistemas parcialmente miscíveis, isto é, para descrever os dados de equilíbrio líquido-líquido. Esse modelo utiliza frações molares para o cálculo dos coeficientes de atividade, entretanto, para sistemas poliméricos a utilização de frações mássicas é mais apropriada, devido ao alto valor da massa molecular das cadeias dos polímeros, a fração molar dele é extremamente pequena (OISHI e PRAUNZNIT, 1978).

O modelo proposto por Abrams e Prausnitz (1975) é baseada no conceito de composição local, que considera a teoria quase-química de Guggenheim (1952) para misturas de componentes de diferentes tamanhos. Essa equação foi chamada de teoria Quase-química Universal, ou pelas siglas em inglês, UNIQUAC. Uma grande vantagem dessa equação é que ela precisa de apenas dois parâmetros ajustáveis para cada par de componentes da mistura, como a equação de Wilson, mas é aplicável aos cálculos de *ELL*. A equação UNIQUAC parte da hipótese que o coeficiente de atividade pode ser separado em duas partes, uma parte combinatorial, que descreve as contribuições geométricas de tamanho e forma das moléculas e precisa apenas de dados dos componentes puros e uma parte residual, que expressa as interações intermoleculares responsáveis pela entalpia de mistura e inclui a introdução de dois parâmetros ajustáveis para cada par de moléculas.

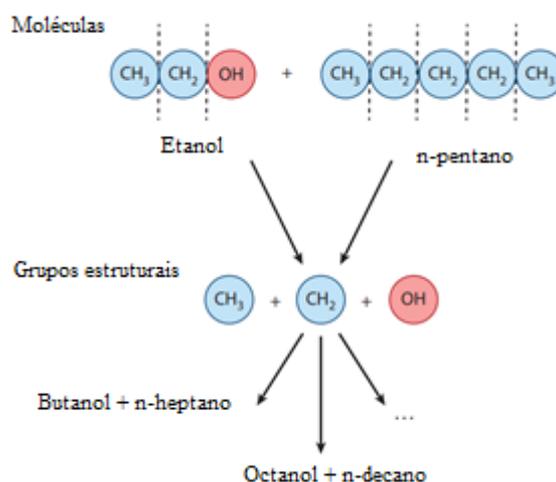
Ao se comparar as equações proposta por Wilson, NRTL e UNIQUAC, pode-se observar que os modelos NRTL e UNQUAC diferentemente do modelo de Wilson (inapropriado para sistemas de miscibilidade parcial), são aplicáveis a análise de equilíbrio líquido-líquido (*ELL*), equilíbrio líquido-vapor (*ELV*) e equilíbrio líquido-líquido-vapor (*ELLV*). Por outro lado, o modelo UNIQUAC apresenta outra vantagem significativa: devido ao fato de que as concentrações dos componentes são uma função das frações de volume e área, em vez de frações molares, desta forma, tal modelo pode ser aplicado a uma ampla gama de soluções, incluindo moléculas pequenas e grandes, típicas de sistemas poliméricos (DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019).

Segundo Le Maguer (1992) o modelo UNIQUAC original, apesar de sua ampla aplicabilidade, falha na avaliação de substâncias polares altamente não ideais, especialmente sistemas contendo água. No entanto, uma característica importante do modelo UNIQUAC é

que ele é a base do método UNIFAC, um método de contribuição de grupo que é utilizado com sucesso em sistemas polares (DANIELSKI e STRAGEVITCH, 2019).

O método de contribuição de grupos é conhecido como método aditivo, em que a estrutura molecular de um composto é dividida em grupos, que consistem em átomos individuais ou coleção de átomos, e os parâmetros de interação binária entre duas moléculas são estimados através da soma dos parâmetros de interação entre vários pares de grupo em cada uma das moléculas (KHALIFA e LUE, 2017; GANI, 2019). Um exemplo da divisão dos grupos pode ser observado na Figura 5 para sistemas formados por etanol-n-pentano.

**Figura 5.** Conceito dos grupos de contribuição.



Fonte: Adaptado de Gmehling et al. (2015).

Segundo Perumalsamy e Murugesan, (2009) o método de contribuição de grupos é mais efetivo na predição dos coeficientes de atividade dos componentes em comparação com outros métodos. Entretanto, a eficiência deste método depende da divisão das moléculas em números de grupos que interagem entre si.

No método de contribuição de grupos a suposição fundamental é que o logaritmo do coeficiente de atividade é assumido como tendo duas contribuições, uma parte combinatorial, devido a diferenças de tamanho e forma das moléculas (entrópica) e uma parte residual, essencialmente devido a interações de energia (entálpica) (FREDENSLUND et al., 1977; PERUMALSAMY e MURUGESAN, 2009; GMEHLING et al., 2015; ROBLES et al., 2016).

O primeiro método que utilizou o conceito de contribuição de grupo para predição do equilíbrio líquido-líquido foi o método ASOG (Analytical Solution of Groups), desenvolvido por Derr e Deal (1969). Neste método, o termo combinatorial é calculado pela equação de Flory-Huggins e o termo residual é calculado utilizando a equação de Wilson. Outro modelo que utiliza o método de contribuição de grupos é o modelo UNIFAC (UNIQUAC Functional-

Group Activity Coefficients). Este modelo é um dos mais utilizados no *ELL* e é mais detalhado na seção seguinte, pois foi o utilizado neste trabalho para calcular o coeficiente de atividade.

#### 2.4. Método UNIFAC (UNIQUAC Functional-group Activity Coefficient)

O modelo UNIFAC proposto por Fredenslund, Jones e Prausnitz (1975) foi originalmente desenvolvido para a predição do equilíbrio líquido-vapor, entretanto devido à sua flexibilidade e confiabilidade foi aplicado aos mais variados sistemas (BARRETO et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2018). Devido a esta razão, o modelo é um dos mais utilizados dentre o modelo de contribuição de grupos em SAB compostos por PEG e sal (NAZER et al., 2017; HAMTA et al., 2017; BAKHSHI et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018a; NASCIMENTO et al., 2018b; BARRETO et al., 2019). Além disso, outra vantagem deste modelo é que ele permite representar uma quantidade muito grande de misturas partindo de uma pequena quantidade de grupos (DOMAŃSKA et al., 2014; MAGNUSSEN et al., 1981; HANSEN et al., 1991).

No modelo UNIFAC, o coeficiente de atividade do componente  $i$  na solução ( $\gamma_i$ ) é dividido em coeficiente de atividade combinatorial ( $\gamma_i^C$ ) e coeficiente de atividade residual ( $\gamma_i^R$ ), como mostrado na Eq. (16):

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^C + \ln \gamma_i^R \quad (16)$$

A parte combinatorial leva em consideração a influência do tamanho e da forma das moléculas na mistura, e pode ser identificada como uma contribuição entrópica. Cada grupo funcional é caracterizado por dois parâmetros de estrutura: um em relação ao volume de Van der Waals ( $r_i$ ) e outro com a área superficial de Van der Waals ( $q_i$ ).

A parte combinatorial  $\ln \gamma_n^C$  do modelo UNIFAC é calculada pela Eq. (17):

$$\ln \gamma_n^C = \frac{G_C^E}{RT} = \ln \frac{\varphi_i}{X_i} + \frac{z}{2} q_i \ln \frac{\theta_i}{\varphi_i} + l_i - \frac{\varphi_i}{X_i} \sum_j X_j l_j \quad (17)$$

Onde:

$$\varphi_i = \frac{r_i X_i}{\sum_j r_j X_j} \quad (18)$$

$$\theta_i = \frac{q_i X_i}{\sum_j q_j X_j} \quad (19)$$

$$l_i = \frac{z}{2} (r_i - q_i) - r_i + 1 \quad (20)$$

Onde,  $z$  é o número de coordenação, geralmente adotado igual a 10;  $\varphi_i$  é a fração de volume da molécula  $i$ ;  $\theta_i$  é a fração de superfície da molécula  $i$ .

Os parâmetros  $r_i$  e  $q_i$  são calculadas como a soma dos parâmetros de área e volume dos grupos:

$$r_i = \sum_k V_k^{(i)} R_k \quad (21)$$

$$q_i = \sum_k V_k^{(i)} Q_k \quad (22)$$

que, por sua vez, são calculados a partir da área superficial e volume dos grupos de Van der Waals, dados por Bondi (1968):

$$R_k = \frac{V_{wk}}{15,17} \quad (23)$$

$$Q_k = \frac{A_{wk}}{2,5 \times 10^9} \quad (24)$$

Onde:  $V_{wk}$  é o volume de Van der Waals do grupo  $k$  na molécula  $i$ ;  $A_{wk}$  é a área superficial de Van der Waals do grupo  $k$  na molécula  $i$ . Os fatores de normalização 15,17 e  $2,5 \times 10^9$  foram determinados por Abrams e Prausnitz (1975), correspondendo ao volume e à área superficial externa de uma unidade  $\text{CH}_2$  em polietileno.

A contribuição da parte residual é considerada como sendo a soma das contribuições individuais de cada grupo do soluto presente na solução menos a soma das contribuições individuais dos mesmos grupos no componente puro (FREDENSLUND et al., 1975), como pode ser observada na Eq. (25). Este termo constitui a chamada “solução por grupo”, onde as contribuições individuais de cada grupo são funções da concentração e da temperatura (WILSON e DEAL, 1962). Esse termo leva em consideração as interações energéticas entre os grupos de contribuição que compõem as moléculas da mistura e pode ser identificado como uma contribuição entálpica.

$$\ln \gamma_i^R = \frac{G_R^E}{RT} = \sum_k v_k^{(i)} (\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)}) \quad (25)$$

Onde  $v_k^{(i)}$  é o número de grupos  $k$  presente na espécie  $i$ ;  $\Gamma_k$  é o coeficiente de atividade da parte residual do grupo  $k$  na solução;  $\Gamma_k^{(i)}$  é o coeficiente de atividade residual do grupo  $k$  numa solução referência contendo unicamente moléculas do tipo  $i$  e  $k = 1, 2, \dots, n$ , onde  $n$  é o número de diferentes grupos na mistura.

Os coeficientes de atividade residuais,  $\Gamma_k$ , são dados pela Eq. (26):

$$\ln \Gamma_k = Q_k \left[ 1 - \ln \left( \sum_m \theta_m \Psi_{mk} \right) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{km}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}} \right] \quad (26)$$

Em que  $\theta_m$  é a fração de área do grupo  $m$ , que pode ser calculada pela Eq. (27).

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad (27)$$

Onde,  $X_m$  é a fração molar do grupo  $m$  na mistura, conforme mostra a Eq. (28).

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_j^N V_j^{(i)} X_i} \quad (28)$$

Os termos do tipo  $\Psi_{mk}$ , que aparecem na Eq. (26) são os parâmetros de interação energética entre os grupos  $i$  e  $j$ , dados pela Eq. (29).

$$\Psi_{ij} = \exp \left[ -\frac{u_{ij} - u_{ji}}{RT} \right] = \exp \left( -\frac{a_{ij}}{RT} \right) \quad (29)$$

Os parâmetros energéticos de interação entre os grupos  $i$  e  $j$  são representado por  $u_{ij}$  e o seu valor é a soma de todos os grupos presentes na mistura. Parâmetros de interação de grupo  $a_{ij}$  podem ser estimados a partir dos dados experimentais de equilíbrio de fase.

Ao longo dos anos algumas modificações no modelo UNIFAC original foram sugeridas, em vista de algumas limitações observadas. As modificações realizadas acrescentam algum termo à equação de forma a levar em consideração alguns efeitos não estimados, como por exemplo interações eletrostáticas. Kikic et al. (1991) sugeriram a adição de um termo referente as interações de longo alcance (forças colombianas) no coeficiente de atividade representada pela teoria de Debye-Hückel. Nessa abordagem o sal é considerado como um grupo de cátion e ânion.

Sendo assim, o coeficiente de atividade  $\gamma_n$  pode ser calculado pela Eq. (30):

$$\ln \gamma_n = \ln \gamma_n^{D-H} + \ln \gamma_n^C + \ln \gamma_n^R \quad (30)$$

Onde:  $\ln \gamma_n^{D-H}$  é o termo de Debye-Hückel,  $\ln \gamma_n^C$  é a contribuição combinatorial do modelo UNIFAC e  $\ln \gamma_n^R$  a contribuição residual do modelo UNIFAC.

O termo de Debye-Hückel  $\ln \gamma_n^{D-H}$  é calculado a partir da Eq. (31) como descrito por Macêdo et al. (1990).

$$\ln \gamma_n^{D-H} = \frac{G_{D-H}^E}{RT} = \frac{2AM_n d_s}{b^3 d_n} \left[ 1 + b\sqrt{I} - \frac{1}{1 + b\sqrt{I}} - 2\ln(1 + b\sqrt{I}) \right] \quad (31)$$

Onde  $M_n$  é a massa molar do solvente  $n$ ,  $I$  é o comprimento iônico,  $d_n$  é a densidade do solvente  $n$ , enquanto a densidade da mistura do solvente  $d_s$  é calculada pela Eq. (32):

$$d_s = \frac{M_s}{\sum_n x'_n M_n / d_n} \quad (32)$$

Onde  $x'_n$  é a fração molar do solvente  $n$  livre do sal e  $M_s - \sum_n x'_n M_n$  é a massa molar da mistura líquida.

Os parâmetros  $A$  e  $b$  são dados pelas Eq. (33) e (34) (KIKIC et al., 1991).

$$A = 1,327757 \times 10^5 d_s^{1/2} / (\varepsilon T)^{3/2} \quad (33)$$

$$b = 6,359696 d_s^{1/2} / (\varepsilon T)^{1/2} \quad (34)$$

Onde  $d_s$  é a densidade da água,  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do solvente na mistura e T é a temperatura.

Dados da composição de sistemas aquosos bifásicos são necessários para o projeto de equipamentos de extração e para o desenvolvimento de modelos termodinâmicos e de transferência de massa do processo (SÉ e AZNAR, 2002). O desenvolvimento de um modelo termodinâmico adequado para o processo permite a predição de resultados do sistema evitando-se um excessivo número de práticas experimentais que demandam tempo e recursos financeiros. Segundo Santiago et al. (2010) a modelagem termodinâmica é essencial para o projeto, otimização e operação de processos. Diante disto, estudos da modelagem de SAB têm sido realizados, dentre eles:

Zafarani-Moattar et al. (2004) utilizaram o modelo UNIQUAC com e sem o termo de Debye-Hückel, que considera as interações de longo alcance, para correlacionar e prever as linhas de amarração de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol e citrato de sódio. Eles verificaram que a utilização do modelo UNIQUAC sem o termo de Debye-Hückel gerou um desvio padrão de 6% e com a utilização do termo de Debye-Hückel o desvio padrão baixou para 2%, mostrando a importância da adição deste termo.

Perumalsamy e Murugesan (2009) determinaram dados de equilíbrio de sistemas formados por polietilenoglicol 2000, citrato de sódio e água em diferentes temperaturas T= (298,15, 308,15 e 318,15) K bem como os parâmetros de interação utilizando os modelos ASOG e UNIFAC. Posteriormente, utilizaram os modelos ASOG e UNIFAC para prever dados de equilíbrio de sistemas formados por PEG 2000-citrato de sódio e PEG 6000-citrato de sódio e água nas diferentes temperaturas T= (298,15, 308,15 e 318,15) K. Eles verificaram que o modelo UNIFAC apresentou melhor concordância dos dados das linhas de amarração quando comparados com os dados experimentais (PEG 2000) ou da literatura (PEG 6000).

Andrade et al. (2011) determinaram dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos compostos por copolímero L64 – sal (tartarato de sódio, succinato de sódio, citrato de sódio ou citrato de amônio) – água. Eles utilizaram os dados experimentais dos sistemas para estimar os parâmetros de interação dos modelos NRTL e UNIFAC e verificaram que os dois modelos apresentaram bons ajustes, com desvio médio global de 1,05% e 0,87%, respectivamente. Sendo que o modelo UNIFAC apresentou menor desvio.

Hamta et al. (2017) apresentaram dados de equilíbrio de sistemas formados por PEG 6000 e carbonato de sódio em diferentes temperaturas T = (293,15, 303,15 e 313,15) K. Os

autores correlacionaram os dados com o modelo UNIQUAC, UNIQUAC estendido (E-UNIQUAC) e e-NRTL a fim de obterem os parâmetros de interação binária entre os componentes. Eles observaram que todos os modelos estudados e-NRTL, E-UNIQUAC e UNIQUAC apresentaram baixos desvios 1,26%, 1,37% e 3,46%, respectivamente. Posteriormente os autores utilizaram os parâmetros de interação obtidos (nos sistemas contendo o PEG 6000 e carbonato de sódio) a fim de obter dados de equilíbrio em sistemas contendo PEG (1000, 3350, 4000 e 8000) e carbonato de sódio, utilizando o modelo E-UNIQUAC. Eles verificaram que os dados de equilíbrio líquido-líquido podem ser preditos satisfatoriamente utilizando os parâmetros ajustados no trabalho.

Pimentel et al. (2017) avaliaram dados de equilíbrio de sistemas compostos por 2-propanol- sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$ ) - água em diferentes temperaturas (293,15-323,15) K, correlacionaram os dados experimentais utilizando o modelo UNIFAC e obtiveram desvios médio global de 0,68%.

Nascimento et al. (2018a) estudaram dados de equilíbrio de sistemas contendo polietilenoglicol 1500  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e citrato de sódio em diferentes valores de pH (4, 5, 6 e 7) e nas temperaturas de 30°C e 40°C. Os dados de equilíbrio foram determinados e correlacionados pelo método UNIFAC para obtenção dos parâmetros de interação, onde observaram desvio médio global de 5,28%.

Embora os sistemas aquosos bifásicos já venham sendo investigados há vários anos, sua modelagem continua sendo campo ativo de investigação, pois cada modelo tem suas peculiaridades e limitações. Vários modelos têm sido utilizados para predição dos dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos (ZAFARANI-MOATTAR et al., 2004; PERUMALSAMY e MURUGESAN, 2009; ANDRADE et al., 2011; PIMENTEL et al., 2017; ZHENG et al. 2019). Porém para aplicação dos SAB além do entendimento dos diagramas de fase é necessário também o conhecimento da transferência da biomolécula nas fases. Desta maneira, vários pesquisadores estão empenhados em particionar e modelar a transferência de massa dos solutos nestes sistemas (DIAMOND e HSU, 1990; EITEMAN et al., 1991; COUTINHO e PESSOA, 2004; ANDREWS et al., 2005; HAGHTALAB e MOKHTARANI, 2005; MAGESTE et al., 2009; DE SOUSA et al., 2009; MAGESTE et al., 2012; MADEIRA et al., 2013; PEREZ et al., 2013; BARROS et al., 2014; BARROS et al., 2016; JIMENEZ et al., 2016; RENGIFO et al., 2016; NAZER et al., 2017; PADILHA et al., 2017; WU et al., 2017).

## 2.5. Modelos Aplicados a Partição de Proteínas em SAB

A fim de explicar e/ou otimizar a partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos, foram propostos alguns modelos teóricos, que na sua maioria são derivados, principalmente, da teoria de Flory-Huggins e do modelo de expansão virial, e utilizam uma abordagem termodinâmica estatística para determinar como os parâmetros termodinâmicos de transferência dependem das propriedades dos SAB (BARROS et al., 2014; BARROS et al., 2016).

Desta forma, para possibilitar melhor previsibilidade e otimização do processo de partição, é necessário modelar a partição da proteína no sistema aquoso bifásico. Diferentes modelos estão sendo sugeridos por pesquisadores para prever o particionamento nos SAB (DIAMOND e HSU, 1990; EITEMAN et al., 1991; COUTINHO e PESSOA, 2004; ANDREWS et al., 2005; HAGHTALAB e MOKHTARANI, 2005; MADEIRA et al., 2013; PEREZ et al., 2013; BARROS et al., 2014; BARROS et al., 2016; NAZER et al., 2017; PADILHA et al., 2017; WU et al., 2017).

Madeira et al. (2013) realizaram um estudo para predição da distribuição de aminoácidos em sistemas aquosos bifásicos contendo dois polímeros e utilizaram uma função matemática para descrever as interações soluto-solvente (energia de solvatação linear) que governam a transferência do soluto. E verificaram que os resultados obtidos pelo modelo tiveram boa concordância com os valores determinados experimentalmente.

Barros et al. (2014) estudaram a modelagem de partição de 11 aminoácidos em diferentes sistemas aquosos bifásicos composto por dois polímeros. Os autores desenvolveram um modelo semi-empírico utilizando um método eletrostático contínuo para prever o coeficiente de partição formado por diferentes pares de polímeros não iônicos. O modelo proposto assume que os efeitos eletrostáticos e os efeitos não polares são as principais forças que explicam os fenômenos da partição, sendo essas forças aditivas e derivadas a partir de dados experimentais e cálculos eletrostáticos. Os autores verificaram que o modelo proposto apresentou bom desempenho e que oferece uma boa perspectiva de aplicação em proteínas. Barros et al. (2016) estenderam os estudos de partição para proteínas. Os autores avaliaram a partição de 14 proteínas globulares com diferentes propriedades nos sistemas polímero-polímero e utilizaram o modelo semi-empírico proposto anteriormente por Barros et al. (2014) para prever e estudar o comportamento da partição. Eles verificaram que com a utilização do modelo foi possível prever a fase preferida das proteínas estudadas, mas não para quantificar a proteína.

Nazer et al. (2017) estudaram a partição de oligonucleótido em sistemas aquosos bifásicos e correlacionaram com o método de contribuição de grupo utilizando UNIFAC-FV

(volume livre) e verificaram que o modelo pode correlacionar a partição do oligonucleotídeo com precisão dos valores experimentais e calculados variando de 1.42% a 24%.

Padilha et al. (2017) estudaram a predição do coeficiente de partição de invertase em sistemas aquosos bifásicos utilizando redes neurais e verificaram que o modelo utilizado pôde prever os coeficientes de partição da mesma.

Como pode ser observado, vários pesquisadores estão propondo modelos para predição do valor do coeficiente de partição, porém a maioria dos modelos avaliam a partição em sistemas contendo dois polímeros ou a partição de aminoácidos ou proteínas e não descrevem as possíveis contribuições entálpica e entrópica que são responsáveis pelo processo de transferência da proteína nas fases. No entanto, outros pesquisadores estão utilizando o modelo proposto por Johansson et al. (1998) para explicar as contribuições entálpica e entrópica que ocorrem no processo de partição de forma qualitativa (MAGESTE et al., 2009; DE SOUSA et al., 2009; MAGESTE et al., 2012; ALVARENGA et al., 2015; JIMENEZ et al., 2016 e RENGIFO et al., 2016).

O modelo desenvolvido por Johansson et al. (1998) é derivado da teoria de Flory-Huggins e, relaciona o coeficiente de partição do soluto com contribuições entálpica e entrópica. Nos próximos tópicos serão discutidos os fundamentos da teoria de Flory-Huggins e o modelo proposto Johansson e colaboradores.

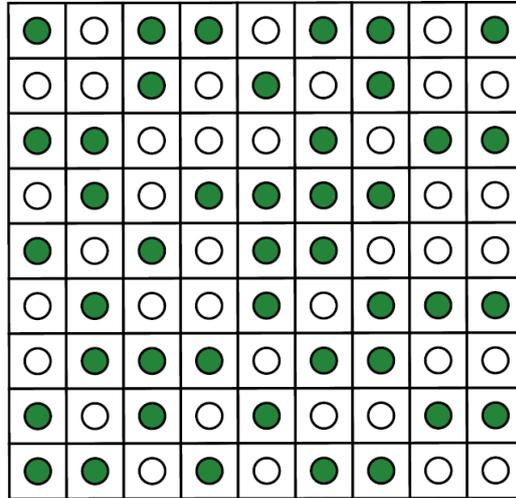
## **2.6. Teoria de Flory-Huggins para Soluções Poliméricas**

O modelo de Flory-Huggins (FLORY, 1942; HUGGINS, 1942) foi o pioneiro na representação termodinâmica de sistemas poliméricos e descreve o comportamento de soluções poliméricas. Em uma solução polimérica, o soluto é um polímero que apresenta uma massa molar muito maior do que a massa molar do solvente, portanto, soluções poliméricas apresentam grande desvio de comportamento quando comparadas a soluções ideais. Desta forma, para entender os fundamentos da teoria de Flory-Huggins é necessário compreender as propriedades de uma solução ideal (FLORY, 1953).

A teoria das soluções ideais considera que as interações entre as diferentes moléculas presentes na solução são desprezadas. Nesta teoria, a entropia de mistura de uma solução ideal pode ser derivada considerando-se uma solução binária com dois tipos de molécula com dimensões similares e a distribuição das mesmas, em solução ocorre de forma aleatória em que o soluto se distribui pelo solvente obedecendo a um modelo reticular. Neste caso, a entropia de mistura é superior em relação à entropia de soluções de componentes individuais devido ao

maior número de arranjos entre as moléculas na solução. Este número de configurações pode ser obtido considerando-se uma rede como a da Figura 6.

**Figura 6.** Modelo reticular de uma solução ideal das moléculas de um soluto (círculos verdes) e de um solvente (círculos brancos) se distribuem segundo uma rede.



Fonte: Mishra et al. (2017).

Para uma situação ideal como descrita na Figura 6, as moléculas que compõem a solução podem ser trocadas de posição livremente, e o número de configurações possíveis para o sistema ( $\Omega$ ) é dado pela Eq.:

$$\Omega = \frac{n_0!}{n_1! n_2!} \quad (35)$$

Em que  $n_0$  é o número de sítios do sistema,  $n_1$  é o número de partículas do soluto e  $n_2$  é o número de partículas do solvente.

O valor da entropia de mistura ( $\Delta_{mix}S$ ) para uma solução ideal pode ser então obtido através da relação de Boltzman, dada pela Eq. (36).

$$\Delta_{mix}S = k \ln \Omega \quad (36)$$

Onde  $k$  é a constante de Boltzman e  $\Omega$  como definido anteriormente é o número de configurações possíveis para o sistema.

A Eq. (36) pode ser reescrita empregando a aproximação de Stirling  $\ln(n!) = n \ln(n) - n$ . Desta forma, a entropia de mistura para uma solução ideal pode ser dada pela Eq. (37).

$$\Delta_{mix}S = k[(n_1 + n_2) \ln(n_1 + n_2) - n_1 \ln(n_1) - n_2 \ln(n_2)] \quad (37)$$

Rearranjando a Eq. (37), obtemos a seguinte Eq.:

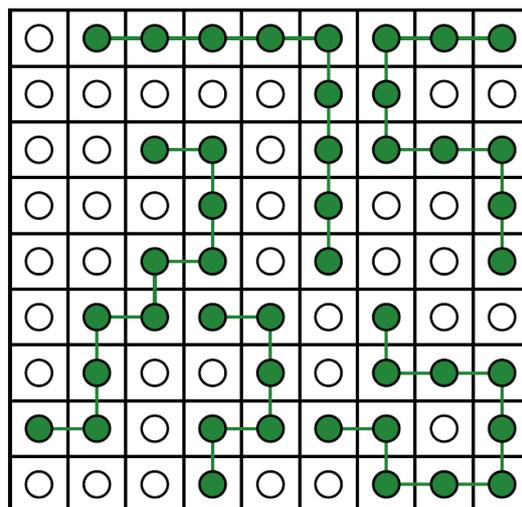
$$\Delta_{mix}S = k(n_1 \ln(X_1) + n_2 \ln(X_2)) \quad (38)$$

Em que  $\Delta_{mix}S$  corresponde a variação de entropia de mistura para uma solução ideal,  $k$  é a constante de Boltzman,  $n_1$  e  $n_2$  representam o número de moléculas de soluto e solvente, respectivamente, e  $X_1$  e  $X_2$  as respectivas frações molares do soluto e do solvente.

Entretanto quando o soluto é um polímero (como as proteínas ou polietilenoglicol), com massa molecular muito superior ao do solvente, o comportamento de uma solução se difere muito de uma solução ideal, e o modelo discutido acima não pode ser empregado. Para contornar essa diferença de comportamento entre uma solução polimérica e uma solução ideal foi desenvolvida em 1941 pelos cientistas Flory (FLORY, 1942) e Huggins (HUGGINS, 1942) a teoria que é conhecida como Flory-Huggins.

Flory e Huggins representaram a mistura de um polímero em um solvente através de um modelo de rede, onde cada célula da rede estaria ocupada por uma molécula de solvente ou por um segmento da molécula do polímero. A teoria de Flory-Huggins considera o polímero como sendo uma macromolécula linear e flexível constituída de uma sequência de  $\nu$  segmentos idênticos. Para contornar a grande diferença de tamanho entre moléculas de polímero e do solvente, foi suposto que cada sítio da rede seria ocupado por uma molécula do solvente ou por um segmento de molécula de polímero, com o mesmo volume da molécula do solvente, já que cada sítio possui o mesmo tamanho. Em uma solução polimérica, vários sítios adjacentes da rede são ocupados pela molécula polimérica, uma vez que esta é composta pela união de vários segmentos (Figura 7).

**Figura 7.** Modelo reticular de distribuição de uma solução polimérica. As moléculas de um soluto (círculos verdes) e de um solvente (círculos brancos) se distribuem segundo uma rede.



Fonte: Mishra et al. (2017).

A partir do número de posições possíveis da molécula do polímero em uma rede, é estabelecido que a variação da entropia da mistura ( $\Delta_{mix}S$ ) é dada por:

$$\Delta_{mix}S = k(n_1 \ln(\phi_1) + n_2 \ln(\phi_2)) \quad (39)$$

Onde  $k$  é a constante de Boltzman,  $\phi_1$  e  $\phi_2$  são as frações volumétricas do solvente e do polímero, respectivamente.  $n_1$  é o número de partículas do soluto e  $n_2$  é o número de partículas do solvente.

A grande diferença entre a entropia de mistura da solução ideal e da teoria de Flory-Huggins é que, na solução ideal os logaritmos são as frações molares e na teoria de Flory-Huggins são substituídos por fração de volume.

Flory (1942) e Huggins (1942) propuseram uma expressão para a variação da entalpia de mistura ( $\Delta_{mix}H$ ) como sendo:

$$\Delta_{mix}H = z\Delta w_{12}y n_1 \phi_2 \quad (40)$$

Onde  $w_{12}$  é a energia de interação associada a mistura do polímero com solvente,  $y$  é o coeficiente de volume, obtido a partir da divisão do volume da molécula do polímero pelo volume da molécula de solvente,  $z$  é o número de coordenação,  $n_1$  é o número de moléculas do solvente e  $\phi_2$  é a fração volumétrica do polímero.

A partir da Eq. (40), Flory-Huggins definiram um parâmetro  $\chi$  denominado de parâmetro de interação Flory-Huggins. Este parâmetro pode ser calculado pela Eq. (41), e seu valor corresponde a uma quantidade adimensional que caracteriza a energia de interação entre moléculas do polímero e do solvente.

$$\chi = \frac{z\Delta w_{12}y}{kT} \quad (41)$$

Com a introdução do parâmetro de Flory-Huggins na Eq. (41), a variação da entalpia de mistura para uma solução polimérica é dada pela seguinte Eq.:

$$\Delta_{mix}H = kT\chi n_1 \phi_2 \quad (42)$$

A partir das Eqs. (39) e (42), pode-se obter o valor da variação da energia livre de Gibbs de mistura ( $\Delta_{mix}G$ ). O valor da variação da energia livre de Gibbs é dado pela Eq.:

$$\Delta_{mix}G = \Delta_{mix}H - T\Delta_{mix}S \quad (43)$$

Substituindo as Eqs. (39) e (42) na Eq. (43), o valor da  $\Delta_{mix}G$  para uma solução polimérica é dado por:

$$\Delta_{mix}G = kT[\chi n_1 \phi_2 + n_1 \ln(\phi_1) + n_2 \ln(\phi_2)] \quad (44)$$

Os fundamentos da teoria de Flory-Huggins foram utilizados como base, para o desenvolvimento do modelo de Johansson e colaboradores.

## 2.7. Teoria de Johansson de Coladoradores

O modelo proposto por Johansson e colaboradores propõe o coeficiente de partição do soluto em um conjunto de equações analíticas em termos de contribuições entrópicas e entálpicas. Este modelo é baseado na teoria de Flory-Huggins para soluções poliméricas.

Após o processo de partição de um soluto no sistema aquoso bifásico, o potencial químico do soluto  $i$  na fase superior ( $\mu_i^{FS}$ ) é igual ao potencial químico do soluto  $i$  na fase inferior ( $\mu_i^{FI}$ ), quando o sistema se encontra em equilíbrio termodinâmico, ou seja:

$$\mu_i^{FS} = \mu_i^{FI} \quad (45)$$

Onde:  $\mu_i^S$  é o potencial químico do componente  $i$  na fase superior e inferior.

O potencial químico do componente  $i$  na fase superior e é dado por:

$$\mu_i^{FS} = \left( \frac{\partial \Delta G_{mix}^{FS}}{\partial n_i^{FS}} \right)_{T,P,n_i \neq n_j} = \mu_i^0 + RT \ln \phi_i^{FS} + (\mu_i^{ex})^{FS} \quad (46)$$

Onde:  $\mu_i^0$  é o potencial químico do componente puro  $i$  na temperatura do sistema,  $\Delta G_{mix}^{FS}$  é a variação da energia livre de Gibbs de mistura do componente  $i$  na fase superior,  $n_i^{FS}$  é o número de mols do soluto  $i$  na fase superior,  $\phi_i^{FS}$  é a fração do soluto na fase (definido como  $\phi_i^{FS} = M_i n_i^{FS} / N$ , sendo  $M_i$  o grau de polimerização e  $N$  é o número total de moléculas) e  $\mu_i^{ex}$  é o potencial químico de excesso de  $i$  na fase superior.

Se, no entanto, a solução é infinitamente diluída, podemos supor que sua adição não alterará o equilíbrio das fases, o que simplifica a análise. A suposição de diluição infinita tem sido utilizada por um número de teóricos para derivar expressões analíticas aproximadas para o coeficiente de partição (JOHANSSON et al., 1998). Sob tais condições,  $K_p$  pode ser determinado diretamente a partir do diagrama de fase livre de soluto e aplicação de Eqs. (45) e (46) para soluto.

$$\ln K_p = \ln \left( \frac{\phi_P^{FS}}{\phi_P^{FI}} \right) = \frac{1}{RT} [(\mu_i^{ex})^{FI} - (\mu_i^{ex})^{FS}] \quad (47)$$

Onde,  $(\mu_i^{ex})^{FI}$  é o excesso de potencial químico de  $i$  na fase inferior associado ao excesso de entropia da mistura dos componentes formadores de fase, e às interações não ideais entre os componentes da fase inferior (soluto-polímero, polímero-solvente, etc) (JOHANSSON et al., 1998).

De acordo com Johansson et al. (1998) o modelo da variação da energia livre de Gibbs de mistura é dada pela Eq. (48):

$$\Delta_{mix}G = \Delta_{mix}H - T\Delta_{mix}S^c = NRT \sum_{i=1}^m \frac{\Phi_i}{M_i} \ln \Phi_i + N \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m \Phi_i \Phi_j w_{ij} \quad (48)$$

Considerando que não há contribuição entálpica ( $\Delta_{mix}H = 0$ ) e aplicando a Eq. (46) na Eq. (48), tem-se:

$$\mu_i - \mu_i^0 = T \left( \frac{\partial \Delta S^c}{\partial n_i^{FS}} \right)_{T,P,n_i \neq n_j} = RT \left[ \ln \Phi_i - \Phi_i + 1 - M_p \sum_{j=1}^m \frac{\Phi_j}{M_j} \right] \quad (49)$$

Onde:  $RT \ln \Phi_i$  é a variação não ideal da entropia molar parcial quando ocorre o processo termodinâmico de mistura do soluto  $i$  na fase; os outros 3 termos da Eq. (46) representam o  $\mu_i^{ex}$  da fase.

Portanto, o coeficiente de partição é definido pela seguinte Eq.:

$$\ln K_p = -(\phi_p^{FS} - \phi_p^{FI}) + M_p \left( \sum_{i \neq p}^m \frac{\phi_i^{FS}}{M_i} - \sum_{i \neq p}^m \frac{\phi_i^{FI}}{M_i} \right) \quad (50)$$

Em diluição infinita,  $\phi_p^{FS}$  e  $\phi_p^{FI}$  são muito pequenos e próximos, portanto  $(\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}) = 0$ . A contribuição entrópica para o coeficiente de partição de solutos em SAB, pode ser obtida observando que  $\frac{\phi_i^{FS}}{M_i} = \frac{n_i^{FS}}{N^{FS}} = \frac{n_i^{FS}}{\rho V^{FS}}$ .

Onde:  $N^{FS}$  é o número de sítios da rede da fase superior,  $\rho$  é o número de sítio por unidade de volume,  $V^{FS}$  é o volume da fase superior. Simplificando, a contribuição entrópica para partição é:

$$\ln K_p = \frac{M_p}{\rho} \left( \frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right) \quad (51)$$

Onde:  $n^{FS}$  e  $n^{FI}$  são o número total de moléculas nas fases superior e inferior, respectivamente.  $M_p$  é a massa molar soluto,  $\rho$  é o número de sítios da rede por unidade de volume e  $V^{FS}$  e  $V^{FI}$  são os volumes das fases superior e inferior, respectivamente.

A Eq. (51) mostra que haverá contribuição entrópica para a partição do soluto se houver diferença de densidade numérica entre as fases. Caso não exista essa diferença o soluto presente no SAB terá o mesmo número de possibilidades de distribuir-se espacialmente entre ambas as fases. Como força motriz, a entropia levará o soluto a particionar para a fase com maior número de moléculas por unidade de volume, pois nesta fase haverá um maior número de formas de distribuir as moléculas espacialmente, aumentando assim a contribuição da entropia configuracional para a minimização da energia livre de Gibbs do sistema. Na maioria dos sistemas aquosos bifásicos conhecidos, as moléculas de água estão presentes em grande maioria numérica nas fases e, portanto, são determinantes na densidade numérica das fases. Desta

forma, a contribuição entrópica fará o soluto tender a particionar para a fase que tenha maior conteúdo de moléculas por unidade de volume (DA SILVA e LOH, 2006).

Considerando agora que as contribuições entrópicas são negligenciáveis, isto é, SAB onde as densidades numéricas das fases são muito próximas, é a entalpia que determinará o comportamento de partição do soluto. Desta forma, o valor do  $K_p$  depende fundamentalmente da diferença dos valores da entalpia molar parcial do soluto,  $\bar{h}_p$ , apresentará na fase superior e inferior. À diluição infinita, a entalpia molar parcial do soluto  $p$  é dada por (JOHANSSON et al., 1998):

$$\begin{aligned}\bar{h}_p &= \left( \frac{\partial \Delta H_{mix}}{\partial n_p} \right)_{T,P,n_j \neq n_p} \\ &= -M_p \sum_{i=1(i \neq p)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq p)}^m \Phi_i \Phi_j w_{ij} + M_p \sum_{i=1(i \neq p)}^m \Phi_i (1 - \Phi_s) w_{ip}\end{aligned}\quad (52)$$

Aplicando a Eq. (52) na Eq. (47) e, considerando que na ausência de contribuição entrópica  $\mu_p^{ex} = \bar{h}_p$ , obtemos após rearranjos a seguinte expressão para o coeficiente de partição:

$$\begin{aligned}\ln K_p &= -\frac{M_p}{RT} \left[ \sum_{i=1(i \neq p)}^m (\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}) w_{ip} \right. \\ &\quad \left. - \sum_{i=1(i \neq p)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq p)}^m (\phi_i^{FS} \phi_j^{FS} - \phi_i^{FI} \phi_j^{FI}) w_{ij} \right]\end{aligned}\quad (53)$$

Onde:  $\phi_i^{FS}$  e  $\phi_i^{FI}$  são as frações de volume do componente  $i$  na fase superior (FS) e inferior (FI), respectivamente (sendo  $i$  água, polímero ou sal);  $M_p$  é a massa molar da proteína e  $w_{ip}$  e  $w_{ij}$  são a energia potencial do par  $i$ - $j$  e  $i$ -proteína.

A fração volumétrica do componente  $i$  na solução é dada pela seguinte Eq.:

$$\phi_i = \frac{M_i n_i}{N}\quad (54)$$

Onde:  $n_i$  é o número total de moléculas do componente  $i$ ;  $M_i$  é o grau de polimerização (isto é, o número de segmentos da cadeia) do componente  $i$  e  $N$  é o número total de sítios, e é dado pela Eq. (55):

$$N = \sum_{i=1}^m M_i n_i\quad (55)$$

Os termos  $w_{ip}$  e  $w_{ij}$  são definidos pela Eq. (56):

$$w_{ip} = Z_{12} \left[ w_{12} - \frac{1}{2}(w_{11} + w_{22}) \right] + Z_{13} \left[ w_{13} - \frac{1}{2}(w_{11} + w_{33}) \right] + Z_{23} \left[ w_{23} - \frac{1}{2}(w_{22} + w_{33}) \right] \quad (56)$$

onde:  $w_{ij}$  é a energia potencial de par devido a interações entre os componentes  $i$  e  $j$ , e  $Z_{ij}$  é o número de coordenação que os componentes  $j$  fazem ao redor de um componente  $i$ .

A Eq. (53) expressa todas as interações entálpicas que ocorrem dentro do sistema aquoso bifásico. A contribuição entálpica pode ser dividida em dois termos. O primeiro termo  $(\sum_{i=1}^m (i \neq p) (\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}) w_{ip})$ , refere-se a todos os tipos de interações que ocorrem entre o soluto e os componentes presentes na fase superior e inferior do SAB. O componente do sistema que interagir mais fortemente com o soluto, apresentará um valor de  $w_{ip}$  mais negativo, desta forma, contribuirá mais para a minimização da energia livre de Gibbs. Portanto, tal termo reflete a tendência de o soluto particionar para a fase que contenha a maior concentração do componente com o qual tem a maior interação.

O segundo termo da Eq. (53)  $(\sum_{i=1}^{m-1} (i \neq p) \sum_{j=i+1}^m (j \neq p) (\phi_i^{FS} \phi_j^{FS} - \phi_i^{FI} \phi_j^{FI}) w_{ij})$  representa a variação da energia associada à transferência da proteína da fase inferior para a fase superior, sendo a mesma, entretanto, independente da interação da proteína com os componentes das fases. Este termo energético só depende da interação que ocorre entre os componentes formadores das fases, que pode ser interpretado como um conteúdo energético de cada fase. Quando um soluto se transfere entre as fases, ele libera um volume na fase que estava possibilitando a interação entre os componentes desta fase, e ao chegar à outra fase ele formará uma cavidade impedindo, no volume ocupado, a interação entre os componentes desta fase. Desta forma, este termo define a auto energia de cada fase. A dependência de  $K_p$  com a auto energia das fases é relacionado ao fato de que a inserção do soluto em uma fase requer a quebra de interações entre os componentes da mesma para criar uma cavidade dentro da qual o soluto se encaixe. Se estas interações são atrativas, o rompimento das mesmas será energeticamente desfavorável. Se, contudo, as interações são repulsivas, a formação da cavidade é favorável. Consequentemente, o soluto irá particionar para a fase onde é menor o gasto energético para a formação da cavidade em que o mesmo será alojado (DE SOUSA et al., 2009).

Este modelo proposto por Johansson et al. (1998) pode ajudar a entender melhor os fatores que influenciam no processo de transferência da proteína nas fases. Diante disto, alguns pesquisadores estão utilizando este modelo para entender as forças envolvidas em tal processo de forma qualitativa. Alguns dos trabalhos são citados abaixo:

Mageste et al. (2009) analisaram a partição do corante carmim em sistema aquoso bifásico em sistemas compostos por polímero e sal e investigaram a influência do pH, massa

molar do polímero, comprimento da linha de amarração e natureza do eletrólito e utilizaram o modelo proposto por Johansson et al. (1998) para explicar os resultados. Eles atribuíram a partição do corante carmim para a fase superior às interações específicas entre o corante com a macromolécula, que é mais concentrada na fase superior.

De Sousa et al. (2009), realizaram um estudo termodinâmico do comportamento de partição da lisozima e conalbumina em sistemas aquosos bifásicos e avaliaram a influência do tipo de sal e concentração do polietilenoglicol. Os autores utilizaram o modelo proposto por Johansson et al. (1998) para explicar melhor as contribuições entálpicas e entrópicas associados à partição da lisozima e conalbumina.

Mageste et al. (2012), estudaram o processo de transferência da norbixina em sistemas aquosos bifásicos e utilizaram o modelo termodinâmico de Johansson et al. (1998) para descrever a distribuição do soluto em função das forças entálpicas e entrópicas. Eles verificaram que a transferência da norbixina para a fase superior é favorável do ponto de vista entálpico e entrópico.

Jimenez et al. (2016), particionaram o íon perclorato em sistemas aquosos bifásicos e analisaram os resultados obtidos com o modelo de Johansson et al. (1998) a fim de descrever o efeito das variáveis do sistema na partição do soluto.

Rengifo et al. (2016), estudaram as forças motrizes para a partição da quimosina em sistemas aquosos bifásicos compostos por macromolécula + eletrólito + água, determinando os parâmetros termodinâmicos por calorimetria de titulação isotérmica e aplicaram o modelo proposto por Johansson et al. (1998) de forma qualitativa para explicar a contribuição entálpica e entrópica sobre a partição. Eles atribuíram que a força motriz da transferência da quimosina da fase inferior para a fase superior foi a interação específica e intensa entre a quimosina e a macromolécula do sistema.

Como pode ser observado o modelo proposto por Johansson et al (1998) está sendo utilizado por diversos autores para explicar de forma qualitativa as contribuições entálpica e entrópica que regem o processo de transferência da partição em SAB e não foram verificados trabalhos que utilizaram este modelo de forma quantitativa.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Propor um modelo para prever o coeficiente de partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos, utilizando o modelo UNIFAC combinado ao modelo proposto por Johansson e colaboradores.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Obtenção de dados de equilíbrio de sistemas formados por polietileno glicol (4000 g.mol<sup>-1</sup> ou 6000 g.mol<sup>-1</sup>) e sal (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) em diferentes temperaturas T= (20, 25, 30 e 35) °C;
- Estimar parâmetros de interação entre os grupos de contribuição dos componentes formadores dos sistemas utilizando o modelo UNIFAC;
- Realizar a partição da  $\alpha$ -lactoalbumina, lisozima e albumina sérico bovina nos SAB estudados, avaliando a influência da massa molecular do polímero, do tipo de sal, da temperatura e da composição global do sistema;
- Determinar parâmetros termodinâmicos ( $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$ ) associados à partição da lisozima;
- Adaptar o modelo proposto por Johansson et al. (1998) ao método de contribuição de grupos;
- Propor um modelo para a partição de proteínas com a finalidade de explicar de forma qualitativa e quantitativa o processo de transferência de massa de biomoléculas em SAB;
- Simulação do processo de partição de solutos em sistemas aquosos bifásicos com a finalidade de validar o modelo.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Determinação dos Diagramas de Fase

As curvas binodais foram obtidas pelo método de titulação turbidimétrica (ALBERTSSON et al., 1986) à pressão atmosférica. Para preparo dos sistemas foram utilizadas soluções de polietilenoglicol 4000 g·mol<sup>-1</sup> (PEG 4000) ou polietilenoglicol 6000 g·mol<sup>-1</sup> (PEG 6000) (60% m/m), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (22% m/m) ou Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (40% m/m) em água. As curvas binodais foram obtidas em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C, totalizando 16 curvas binodais.

O procedimento consistiu em pesar (1.5 g) da solução de PEG (4000 e 6000) em tubos de vidro. O tubo contendo a solução de PEG foi levado ao banho termostático (Tecnal, Te-184, Piracicaba, Brasil) com precisão ± 0.1 K, onde foi incubado até atingir o equilíbrio térmico. Em seguida, foram adicionadas alíquotas da solução estoque do sal de (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>) (20µL) com uma pipeta automática, até ocorrer à turvação do sistema (solução bifásica), registrando seu valor. Em seguida o sistema foi titulado com água destilada até o desaparecimento da turvação, anotando o seu valor. Esse procedimento foi repetido continuamente até a obtenção dos pontos necessários para fazer a curva. A titulação turbidimétrica foi realizada em um banho termostático (Tecnal, Brasil).

A equação empírica não linear (Eq. (57)) proposta por Mistry et al. (1996) foi utilizada e correlacionada aos dados experimentais de cada binodal obtida, utilizando o software SigmaPlot v.11.0

$$w_1 = \exp(a + b (w_2)^{0,5} + cw_2 + d(w_2)^2) \quad (57)$$

Onde  $w_1$  e  $w_2$  são as composições em fração mássica do polietilenoglicol e sal, respectivamente, e  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  são constantes obtidas pela regressão dos dados experimentais.

Os parâmetros de ajustes foram obtidos a partir da correlação dos dados das binodais juntamente com os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e os desvios padrões correspondentes ( $std$ ) da Eq. (57).

### 4.2. 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 pontos acima da região bifásica, onde a linha de amarração vai passar (chamado ponto global). Foram selecionados três pontos globais para cada sistema, os quais podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição global dos sistemas formado por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) + água, expressas em porcentagem mássica (%m/m).

Ponto Global	PEG (4000 e 6000)	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$
1	17	7	12
2	20	8	14
3	23	9	16

Foram pesadas quantidades apropriadas dos componentes até um peso final de 40 g, em tubos graduados de 50 mL. O sistema foi agitado em vórtice (Model AP-56, Phoenix, Brazil) e centrifugados a  $2000 \times g$  por 10 minutos (Model Sp-701, SPLABOR, Brazil) para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso por 24 h em estufa B.O.D, à temperatura desejada para se assegurar o equilíbrio das fases. Após ter atingido o equilíbrio, as fases foram separadas e pesadas. As concentrações de cada componente nas fases coletadas foram estimadas pela regra da alavanca, que utiliza a relação entre a composição em massa da fase superior e a composição total do sistema (MERCHUK et al., 1998). Todos os sistemas foram preparados em duplicata.

As concentrações de cada componente nas fases coletadas foram determinadas pela regra da alavanca (MERCHUK et al., 1998), através da resolução de um sistema de quatro equações (Eqs. (58)-(61)) e quatro incógnitas  $[w_1]_b$ ,  $[w_1]_b$ ,  $[w_2]_b$ ,  $[w_2]_b$ , utilizando o solver do Excel:

$$[w_1]_{FS} = \exp(a + b[w_2]_{FS}^{0.5} + c[w_2]_{FS} + d[w_2]_{FS}^2) \quad (58)$$

$$[w_1]_{FI} = \exp(a + b[w_2]_{FI}^{0.5} + c[w_2]_{FI} + d[w_2]_{FI}^2) \quad (59)$$

$$\frac{[w_1]_{FS} - [w_1]}{[w_1] - [w_1]_{FI}} = \frac{m_{FI}}{m_{FS}} \quad (60)$$

$$\frac{[w_1] - [w_1]_{FS}}{[w_1]_{FI} - [w_1]} = \frac{m_{FI}}{m_{FS}} \quad (61)$$

Onde  $w_1$  e  $w_2$  são as frações mássicas do polietilenoglicol e do sal nas fases; os subscritos “FS” e “FI” representam as fases superior e inferior, respectivamente;  $m_{FS}$  e  $m_{FI}$  são as massas das fases superior e inferior, respectivamente.

O comprimento da linha de amarração (CLA) para os diferentes SAB foram determinados utilizando a seguinte Eq. (62):

$$CLA = [(w_1^{FS} - w_1^{FI})^2 + (w_2^{FS} - w_2^{FI})^2]^{0.5} \quad (62)$$

Onde:  $w_1$  e  $w_2$  são as frações mássicas do PEG e sal na fase superior “FS” e inferior “FI”, respectivamente.

A inclinação da linha de amarração (ILA) foi determinada pela Eq. (63):

$$ILA = \frac{w_1^{FS} - w_1^{FI}}{w_2^{FS} - w_2^{FI}} \quad (63)$$

Onde:  $w_1$  e  $w_2$  são as frações mássicas do PEG e sal na fase superior “FS” e inferior “FI”, respectivamente.

A confiabilidade dos dados das linhas de amarração foi verificada pelas equações empíricas propostas por Othmer-Tobias Eq. (64) (OTHMER e TOBIAS, 1942).

$$\ln\left(\frac{1 - w_1^{FS}}{w_1^{FS}}\right) = n + k_1 \ln\left(\frac{1 - w_3^{FI}}{w_3^{FI}}\right) \quad (64)$$

Onde  $w_1$  é a fração mássica de PEG na fase rica em PEG;  $w_2$  é a fração de sal na fase rica em sal; FS e FI refere-se a fase superior e inferior, respectivamente;  $k_1$  e  $n$ , são os parâmetros ajustados.

### 4.3. Determinação do Efeito Salting-Out

A equação modificada de Setschenow (Eq. 65), que é baseada na teoria binodal, tem sido utilizada com sucesso para avaliação do efeito salting-out através da correlação das linhas de amarração do sal e do polímero (GUAN et al., 1993).

$$\ln\left(\frac{w_1^{FI}}{w_1^{FS}}\right) = \beta + k(w_2^{FS} - w_2^{FI}) \quad (65)$$

Onde:  $w$  é a fração de massa para os dois solutos que formam o sistema, os índices "1" e "2" se referem à quantidade de PEG e sal respectivamente e os subscritos “FS” e “FI” representam as fases superior e inferior, respectivamente;  $k$  é o coeficiente salting-out;  $\beta$  é a constante relacionada ao coeficiente de atividade. Os parâmetros  $k$  e  $\beta$  foram calculados por análise de regressão da Eq. (65).

### 4.4. Determinação do Volume Efetivo de Exclusão (EEV)

O volume efetivo de exclusão foi calculado utilizando as frações moleculares experimentais das curvas binodais. Os dados foram ajustados no programa Origin 6 utilizando o método numérico de Levenberg-Marquadt de acordo com a Eq. (66).

$$\ln\left(V_{213}^* \frac{w_2}{M_2} + f_{213}\right) + V_{213}^* \frac{w_1}{M_1} = 0 \quad (66)$$

Uma das considerações da Eq. (66) é que se o valor de  $f_{213}$  for muito pequeno, este pode ser desconsiderado.

$$\ln\left(V_{213}^* \frac{w_2}{M_2}\right) + V_{213}^* \frac{w_1}{M_1} = 0 \quad (67)$$

Onde:  $V_{213}^*$  representa o EEV do sal;  $f_{213}$  representa a fração volumétrica efetiva do sal na fase polimérica, que inclui a influência da forma geométrica relativa, tamanho e interação de moléculas diferentes  $M$  e  $w$  representam a massa molecular e a fração de massa, os índices "1" e "2" se referem à quantidade de PEG e sal respectivamente, nas fases. Os valores de EEV foram calculados por análise de regressão das Eqs. (66) ou (67).

#### 4.5. Determinação da Energia de Interação em SAB

Os coeficientes de atividade e os parâmetros de interação dos grupos dos sistemas aquosos bifásicos, bem como dos grupos da lisozima foram preditos utilizando o modelo UNIFAC modificado por Kikic et al (1991). O modelo considera que o excesso de energia livre de Gibbs ( $G^E$ ), é formado por um termo combinatorial ( $G_C^E$ ), um termo residual ( $G_R^E$ ) e um termo de Debye-Huckel ( $G_{D-H}^E$ ). A modelagem termodinâmica primeiramente foi realizada com os grupos de contribuição do sistema aquoso bifásico e posteriormente com os grupos de contribuição da proteína (Lisozima).

Para realização da modelagem primeiramente é realizada a separação dos grupos de contribuição dos componentes presentes no sistema. A Tabela 2 apresenta os grupos de contribuição, bem como os valores das quantidades em que esses grupos aparecem na molécula de cada componente (PEG, sal, água e lisozima). Para a separação dos grupos da molécula de Lisozima, foi obtido a sequência de aminoácidos no banco de dados de proteínas (<https://www.rcsb.org/>), utilizando o código 1AKI e posteriormente fracionadas em grupos menores (grupos de contribuição).

**Tabela 2.** Grupos de contribuição de cada componente e quantidade dos grupos que se repetem.

Componente	Grupo	Quantidades de grupos
PEG 4000	CH <sub>2</sub>	2
	OH	2
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	90
PEG 6000	CH <sub>2</sub>	2
	OH	2
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	136
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na	2
	SO <sub>4</sub>	1
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Na	3
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	1

H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	1
Lisozima	CH <sub>2</sub>	65
	OH	17
	CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	84
	NH <sub>3</sub>	6
	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	19
	CH <sub>3</sub>	43
	Fenil	9
	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	12
	NH	18
	C=NH <sub>2</sub>	11
	NH <sub>2</sub>	28
	SH	8
	COOH	9
	CH	8
	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	12
	S	2
	C=CH	7
	NH=CH	1
	C=O	17
	Fenol	3
CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2	

Após a separação dos grupos, é necessário obter os valores de volume ( $R_K$ ) e área ( $Q_K$ ) da literatura, os quais podem ser observados na Tabela 3. Na modelagem UNIFAC é necessário utilizar os valores das concentrações dos componentes nas fases superior e inferior do sistema.

**Tabela 3.** Parâmetros  $R_K$  e  $Q_K$  utilizados neste trabalho.

Grupo k	$R_K$	$Q_K$	Referência
CH	0,447	0,228	Hansen et al. (1991)
CH <sub>2</sub>	0,674	0,540	Magnussen et al. (1981)
CH <sub>3</sub>	0,901	0,848	Hansen et al. (1991)
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	1,593	1,320	Ninni et al. (1999)
C=CH	0,889	0,556	Hansen et al. (1991)
COOH	1,301	1,224	Ninni et al. (1999)
C=O	0,463	0,240	Kurarnochi et al. (1997)
FENIL	3,022	2,132	Bondi et al. (1964)
FENOL	0,895	0,680	Hansen et al. (1991)
OH <sup>-</sup>	1,000	1,200	Magnussen et al. (1981)
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2,856	2,015	Weast, (1972)
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>	5,764	5,116	Andrade et al. (2011)
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	3,000	3,000	Bondi, (1968)
H <sub>2</sub> O	0,920	1,400	Magnussen et al. (1981)
SH	0,976	0,000	Bondi (1964)
S	0,712	0,000	Bondi (1964)
NH <sup>+</sup>	0,533	0,396	Ninni et al. (1999)
NH <sub>2</sub>	0,695	1,150	Kurarnochi et al. (1997)
NH <sub>3</sub>	0,824	0,778	Chen et al. (2013)
C=NH <sub>2</sub>	0,914	0,696	Ninne et al. (1999)
NH=CH	0,979	0,624	Hansen et al. (1991)
CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2,443	2,602	Gupta et al. (1990)
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	2,469	1,466	Geormenny (2005)
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	3,729	2,766	Geomeny et al. (2014)
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	3,263	2,986	Geomeny et al. (2014)
CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	4,062	3,491	Geomeny et al. (2014)

Os dados de equilíbrio líquido-líquido foram utilizados para estimar os parâmetros de interação dos grupos de contribuição através do modelo UNIFAC implementado no código Fortran TML-LLE 2.0 (AZNAR et al., 1998) que é baseado no método simplex modificado por Nelder e Mead (1965). O método consiste na minimização da função objetivo  $S$  das composições mostradas na Eq. (68).

$$S = \sum_k^D \sum_j^M \sum_i^{N-1} \left\{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \right\} \quad (68)$$

Onde  $D$  é o número de dados do sistema e  $N$  e  $M$  são os números de componentes e de linhas de amarração em cada número de dados, respectivamente.  $I$  e  $II$  referem-se às duas fases líquidas em equilíbrio, enquanto ‘exp’ e ‘calc’ referem-se aos valores experimentais e calculados da concentração na fase líquida.

Com os parâmetros de interação estimados pelo método, a comparação entre os valores preditos e experimentais de cada componente em cada uma das fases foi calculado através da raiz quadrada do desvio médio ( $\delta x$ ) dada por:

$$\delta x = 100 \sqrt{\frac{\sum_j^M \sum_i^{N-1} \left\{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \right\}}{2MN}} \quad (69)$$

Onde  $N$  e  $M$  são os números dos componentes e linhas de amarração em cada número de dados, respectivamente. Os subscritos  $I$  e  $II$  são as duas fases em equilíbrio, enquanto os subscritos  $exp$  e  $calc$  referem-se aos valores experimentais e calculados da fase líquida.

#### 4.6. Partição das Proteínas

Foi realizado a partição da lisozima,  $\alpha$ -lactalbumina e albumina sérica bovina nos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) e água, nas temperaturas de  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ . Os experimentos de partição das proteínas foram realizados utilizando as linhas de amarração pré-definida em tubos de centrífuga graduados de 15 mL. Foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  da solução de proteína diretamente na fase superior, durante a montagem dos sistemas, em um volume de 3 mL. Em seguida, foram adicionados 3 mL da fase inferior ao sistema. Para a lisozima e  $\alpha$ -lactalbumina foi utilizada a concentração de 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , enquanto para a albumina sérica bovina a concentração foi de 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os sistemas foram submetidos à agitação em vortex, centrifugados a  $2000 \times g$ , por 10 minutos, a fim de acelerar a separação de fases. Depois, os tubos foram mantidos em repouso, em estufa B.O.D., por 12 horas, nas temperaturas de operação estabelecidas. Posteriormente, as fases foram coletadas com seringas, para posterior determinação do teor de proteína. A concentração de proteína nas fases foi determinada pelo método de Bradford (1976) a 595 nm, em espectrofotômetro (Model 570 Libra BIOCHROM). Foi utilizada albumina sérica bovina como padrão. Para evitar interferência dos componentes da fase, as amostras foram analisadas em branco contendo a mesma composição de fase, mas sem a proteína.

O coeficiente de partição das proteínas ( $K_p$ ), que é a razão de entre a concentração de equilíbrio ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) na fase superior ( $C_s$ ) e inferior ( $C_i$ ) foi determinado como descrito pela Eq. (70).

$$K_p = \frac{C_s}{C_i} \quad (70)$$

#### 4.7. Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos da Partição

##### 4.7.1. Determinação da Entalpia de Transferência ( $\Delta_{tr}H$ )

As medidas da entalpia de transferência ( $\Delta_{tr}H$ ) foram realizadas utilizando um microcalorímetro de titulação isotérmica TAM III (TA instruments), com precisão de  $\pm 100$  nW. Alíquotas de 0,9 mL da fase superior e 0,9 mL da fase inferior foram adicionadas nas células de referência e na célula da amostra do calorímetro. Seis injeções de 10  $\mu\text{L}$  de solução de proteína  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram tituladas na célula da amostra, utilizando uma seringa Hamilton (100  $\mu\text{L}$ ) controlada por um instrumento para as injeções e uma hélice com agitação de 60 rpm foi utilizado durante todo o experimento. O intervalo entre as injeções foi de 60 minutos. As medidas foram realizadas nas temperaturas de  $20^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$  e  $35^\circ\text{C}$ . Para obter a energia de transferência da proteína entre as fases, descontou-se da energia total (descrita acima) a energia associada à interação da água com os constituintes do sistema. Para isto, um procedimento semelhante foi realizado pela titulação de água na ausência da proteína na célula da amostra que contém o SAB.

O fluxo de energia foi registrado durante todo o processo como uma curva de potência versus tempo, que foi integrada para obter o fluxo de calor associado à troca de entalpia de cada sistema (Eq. (71)).

$$\Delta H_{tr} = \int_{t_1}^{t_2} P(t). dt \quad (71)$$

Onde  $t$  é o tempo de formação dos picos em minutos e  $P(t)$  é a curva de potência  $\times$  tempo.

O valor do número de mols da proteína em estudo transferidos para a fase após cada injeção ( $N_{tfs}$ ) foi determinado pela Eq. (72):

$$N_{tfs} = \frac{K_p}{K_p + 1} * I * N_{add} \quad (72)$$

Onde  $K_p$  é o coeficiente de partição,  $I$  é o número de injeções e  $N_{add}$  é o número de mols adicionados em cada injeção.

A variação de entalpia de transferência foi determinada pela variação de entalpia dividido pelo  $N_{tfs}$  de acordo com a Eq. (73).

$$\Delta_{tr}H = \frac{\Delta_{tr}H}{N_{tfs}} \quad (73)$$

#### 4.7.2. Determinação da Energia Livre de Gibbs de Transferência ( $\Delta_{tr}G$ )

A variação da energia livre de Gibbs de transferência, que é definida como a mudança de energia livre de Gibbs molar associada ao processo de transferência das proteínas nos sistemas aquosos bifásicos, foi calculada de acordo com a Eq. (74).

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln k_p \quad (74)$$

Onde: T é a temperatura absoluta em que o ensaio foi realizado; R é a constante dos gases ideais; e  $k_p$  é o coeficiente de partição da proteína.

#### 4.7.3. Determinação da Entropia de Transferência ( $\Delta_{tr}S$ )

A variação da entropia de transferência ( $\Delta_{tr}S$ ) foi determinada por subtração utilizando a Eq.(75).

$$\Delta_{tr}G = \Delta_{tr}H - T\Delta_{tr}S \quad (75)$$

#### 4.8. Modelagem e Simulação da Partição

Para modelagem e simulação do coeficiente de partição das proteínas nos SAB foi sugerido um modelo onde foi utilizado o modelo proposto por Johansson et al., (1998) e o modelo UNIFAC. Para isto, primeiramente o modelo proposto por Johansson et al. (1998) foi adaptado ao método de contribuição de grupo. Posteriormente, o modelo de Johansson et al. (1998) foi adicionado ao modelo UNIFAC modificado por Kikic et al. (1991), a fim de levar em consideração as possíveis interações da proteína no sistema e as interações do sistema. A parte entrópica do modelo de Johansson foi adicionado a parte combinatorial do modelo UNIFAC e a parte entálpica do modelo de Johansson foi adicionado a parte residual do modelo UNIFAC. O modelo sugerido leva em consideração as contribuições entrópicas relacionadas com o tamanho e a forma das moléculas, bem como a contribuição entálpica, que considera as interações energéticas entre as moléculas e as interações de longo alcance dada pela contribuição de Debye-Hückel. Desta forma, o modelo proposto para a partição das proteínas modelo é:

$$\frac{g_E}{RT} = \frac{g_E^{Entrópico}}{RT} + \frac{g_E^{Entálpico}}{RT} + \frac{g_E^{D-H}}{RT} \quad (76)$$

Onde  $g_E$  é a energia livre de Gibbs em excesso,  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  a temperatura absoluta em K.

Onde por similaridade, obtém-se:

$$\gamma_i = \gamma_i^{Entrópico} + \gamma_i^{Entálpico} + \gamma_i^{D-H} \quad (77)$$

A contribuição entrópica do modelo sugerido leva em consideração a parte entrópica do modelo UNIFAC, que considera a influência do tamanho e forma das moléculas, e a contribuição entrópica do modelo de Johansson, que considera a diferença de densidade numérica das fases. A contribuição entrópica do modelo sugerido é:

$$\gamma_i^{Entrópico} = \gamma_i^{C Unifac} + \gamma_i^{Entrópica Johansson} \quad (78)$$

A contribuição entálpica do modelo sugerido considera a parte residual do modelo UNIFAC que considera as interações energéticas entre os grupos que compõem as moléculas do sistema e a contribuição entálpica do modelo de Johansson que considera as interações entálpica que ocorrem no processo de partição. A contribuição entálpica do modelo sugerido é:

$$\gamma_i^{Entálpico} = \gamma_i^{R Unifac} + \gamma_i^{Entálpica Johansson} \quad (79)$$

O termo  $\gamma_i^{D-H}$  é o coeficiente de atividade de Debye-Hückel que considera as interações de longo alcance.

Os coeficientes entrópicos ( $\gamma_i^{Entrópica Johansson}$ ) e entálpicos ( $\gamma_i^{Entálpica Johansson}$ ) do modelo de Johansson foram adaptados ao método de contribuição de grupo e são mostrados com mais detalhes abaixo.

O termo da contribuição entrópica do modelo de Johansson para o coeficiente de partição de proteína em sistema aquoso bifásico proposto pelo método de contribuição de grupos pode ser observado na Eq. (80).

$$\gamma_{Kp}^{C Johansson} = -\frac{M_M}{\rho} \left( \frac{n_k^{FS}}{V_k^{FS}} - \frac{n_k^{FI}}{V_k^{FI}} \right) \quad (80)$$

Onde:  $n_k^{FS}$  e  $n_k^{FI}$  são o número total dos grupos de contribuição nas fases superior e inferior, respectivamente,  $M_M$  é a massa molar do grupo de contribuição do soluto  $M$ ,  $\rho$  é o número de sítios da rede por unidade de volume dos grupos de contribuição e  $V_k^{FS}$  e  $V_k^{FI}$  são os volumes relativos de cada componente nas fases superior ( $FS$ ) e inferior ( $FI$ ), respectivamente.

$$M_M = \sum_k M_k^{(i)} \quad (81)$$

$$n_k^\lambda = x_k^\lambda \cdot \sum_k n_k^{(i)} \quad (82)$$

$$V_k^\lambda = x_k^\lambda \cdot \sum_k v_k^{(i)} R_k \quad (83)$$

$$\rho = (x_k^t - x_k^b) \cdot \frac{1}{R_k} \quad (84)$$

Onde:  $M_k^{(i)}$  é a massa molar do grupo de contribuição do soluto M;  $M_M$  é a massa molar do soluto;  $n_k^{(i)}$  é o número de grupos de contribuição do componente (i);  $v_k^{(i)}$  são os números de grupos de contribuição do componente (i);  $R_k$  são os volumes relativo do grupo de contribuição;  $x_k^\lambda$  é a fração molar dos componentes nas fases;  $\lambda$  representa a fase superior (FS) ou inferior (FI).

A contribuição entálpica do modelo de Johansson para a partição de solutos em sistema aquoso bifásico proposto pelo método de contribuição de grupos pode ser observado na Eq. (85):

$$\begin{aligned} \gamma_{KP}^{R \text{ Johansson}} = & -\frac{M_P}{RT} \left[ \sum_{i=1(i \neq p)}^m (\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}) w_{ip} \right. \\ & \left. - \sum_{i=1(i \neq p)}^{m-1} \sum_{j=i+1(i \neq p)}^m (\phi_i^{FS} \phi_j^{FS} - \phi_i^{FI} \phi_j^{FI}) w_{ij} \right] \quad (85) \end{aligned}$$

Onde:  $\phi_i^{FS}$  e  $\phi_i^{FI}$  são as frações de volume dos componente  $i$  na fase superior (FS) e inferior (FI), respectivamente (sendo  $i$  água, polímero ou sal);  $M_p$  é a massa molar do grupo de contribuição da proteína e  $w_{ip}$  e  $w_{ij}$  são a energia potencial do par  $i$ - $j$  e  $i$ -proteína,  $m$  é o número total de grupos do sistema.

A fração de volume de cada componente  $i$  no sistema é:

$$\phi_k^\lambda = \frac{X_i^\lambda \cdot \sum_k v_k^{(i)} R_k}{N \cdot \sum_{j=1}^3 v_k^{(j)} R_k} \quad (86)$$

Onde:  $X_i$  é a fração mássica do componente (i);  $v_k^{(i)}$  é o número de grupos de contribuição do componente  $i$ ;  $R_k$  é o volume de Van der Waals;  $\lambda$  representa a fase superior (FS) e inferior (FI).

$$N = \sum_{i=1}^3 M_i n_i \quad (87)$$

Onde:  $n_k^{(i)}$  é o número de grupos de contribuição do componente  $i$  e  $M$  é o grau de polimerização (isto é, o número de segmentos na cadeia) dos grupos de contribuição do componente  $i$ .

Os termos  $\varepsilon_{ip}$  ou  $\varepsilon_{ij}$  são definidos pela Eq. (88).

$$\varepsilon_{ip} = \sum_{i=1}^N Z_{ij} * \left[ u_{ij} - \frac{1}{2}(u_{ii} + u_{jj}) \right] \quad (88)$$

$Z$  é o número de grupos de contribuição vizinhos que interagem com o grupo do componente  $i$ ;  $\varepsilon_{ip}$  e  $\varepsilon_{ij}$  representam a energia envolvida na formação de um par potencial  $i-j$  e rompimento da interação  $i-i$  e  $j-j$ , respectivamente.

Segundo Magnussen, Rasmussen e Fredeslund (1981) a troca de energia,  $\varepsilon_{ip}$  ou  $\varepsilon_{ij}$ , entre os grupos podem ser calculados a partir da soma de parâmetros de interação do grupo  $a_{ij}$  e  $a_{ji}$  como pode ser visto nas equações abaixo:

$$a_{ij} = (u_{mn} - u_{nn})/R \quad a_{ji} = (u_{nm} - u_{mm})/R \quad (89)$$

$$a_{ij} + a_{ji} = \frac{\left[ u_{ij} - \frac{1}{2}(u_{ii} + u_{jj}) \right]^2}{R} = w_{ij} \frac{2}{R} \quad (90)$$

Onde  $u_{ij}$  representa a energia de interação entre os grupos  $i$  e  $j$ ;  $R$  é a constante universal dos gases.

A contribuição entálpica do modelo de Johansson expressa as interações que ocorrem no processo de transferência da proteína nas fases. O primeiro termo da Eq. (85) está relacionado com as interações que ocorrem entre os grupos da proteína com os grupos dos componentes do sistema. Este termo mostra a tendência da proteína particionar para a fase que contenha a maior concentração do componente a qual tem maior afinidade. O segundo termo da equação está relacionado com a variação de energia associada à transferência da proteína da fase inferior para a fase superior. Este termo depende das interações que ocorrem entre os componentes do sistema. Desta forma, quando a biomolécula é adicionada ao sistema ocorre quebra de interações entre os componentes de modo a criar uma cavidade para a proteína.

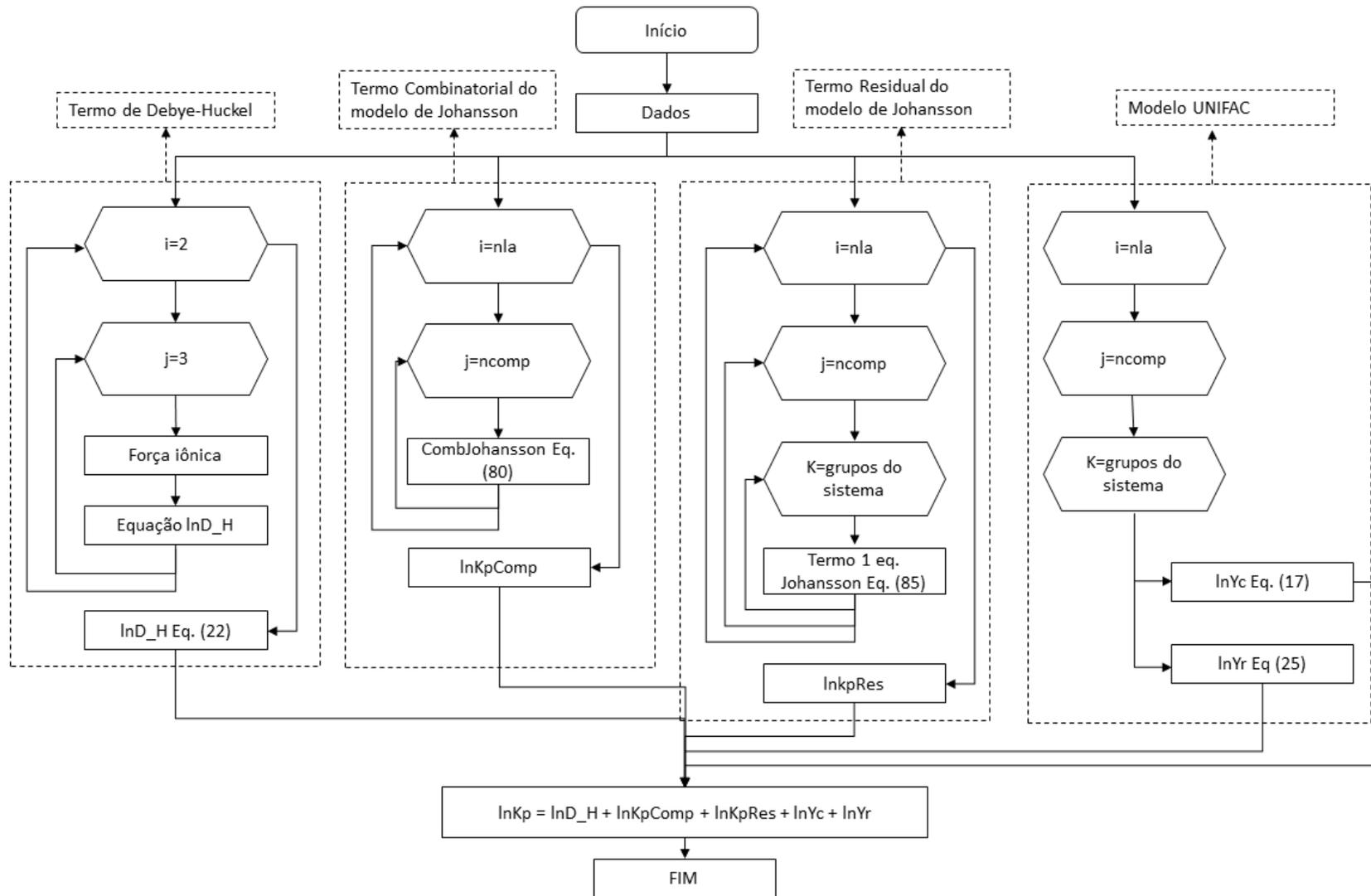
Desta forma, o coeficiente de partição da biomolécula está relacionado com os parâmetros entálpicos, entrópicos e com o termo de interações de longo alcance. Estas contribuições são muito importantes para que o processo de transferência de massa seja melhor entendido e quantificado.

O algoritmo utilizado seguiu o fluxograma que pode ser observado na Figura 8. A proteína utilizada na simulação foi a lisozima. Para isto, primeiramente foi obtido a sequência

de aminoácidos no banco de dados de proteínas, utilizando o código 1AKI (<https://www.rcsb.org/>). Posteriormente foram separadas em grupos de contribuição.

A simulação foi realizada utilizando o programa Scilab. Para obtenção dos parâmetros de interação entre os grupos foi utilizado o modelo UNIFAC. A predição do coeficiente de partição foi realizada utilizando o modelo sugerido.

**Figura 8.** Fluxograma do modelo proposto neste trabalho



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Diagramas de Equilíbrio

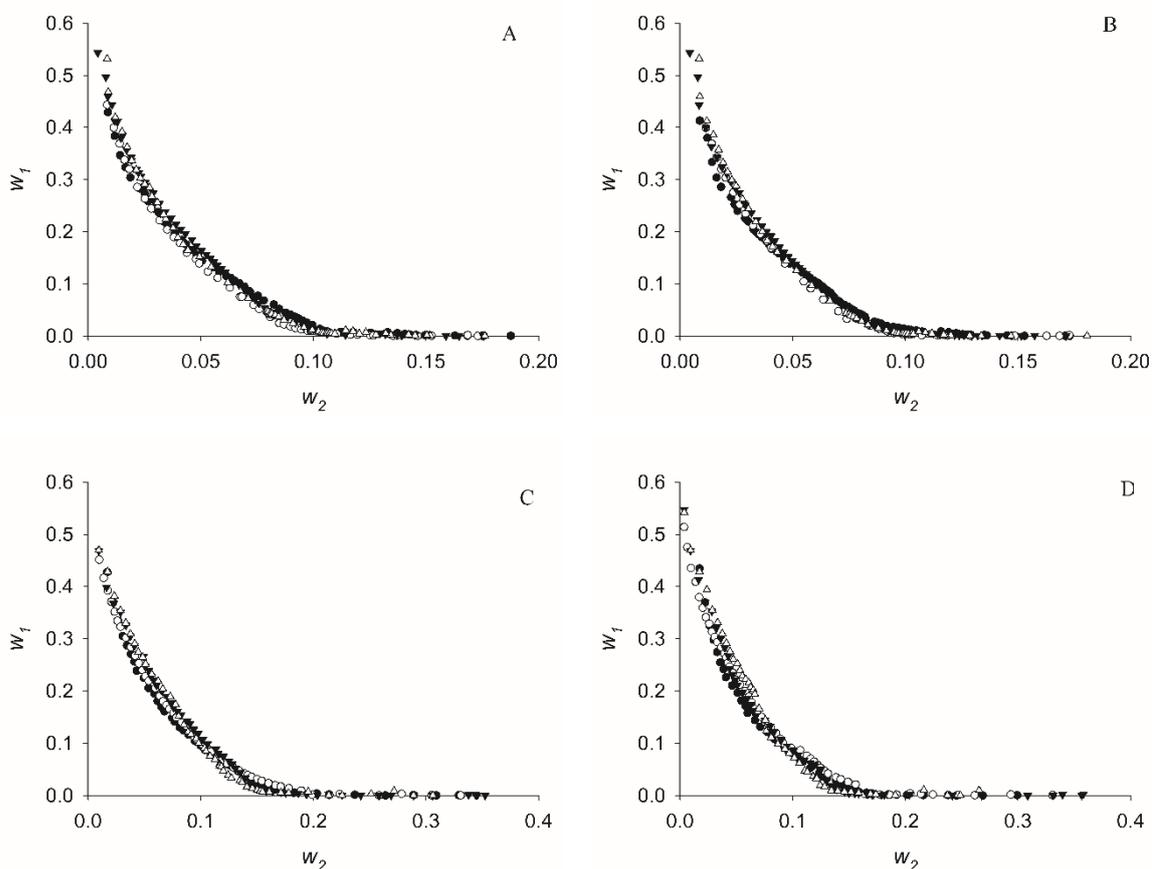
Os diagramas de equilíbrio para os sistemas PEG (4000 e 6000), sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) e água são apresentados na Figura 9 (A, B, C, D) em função da temperatura, nas Figuras 10 e 11 (A, B, C, D) em função da massa molar do polímero e nas Figuras 12 e 13 (A, B, C, D) em função do tipo de sal utilizado. 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 PEG e sal necessária para formar o SAB. Abaixo das curvas obtidas para cada condição estudada de temperatura, tipo de sal ou massa molar do polímero, a mistura dos constituintes do sistema encontra-se miscível, formando uma fase homogênea, enquanto acima das curvas verifica-se a formação de duas fases (IQBAL et al., 2016).

A formação de SAB resulta do processo de exclusão mútua entre o sal e o polímero, visto que ambos apresentam alta afinidade com a molécula de água. Sob pressão e temperatura constante, acima de uma concentração crítica, a extensão da exclusão aumenta, fazendo com que a fase inferior concentre em sal e a fase superior em polímero (DA SILVA et al., 2008; MURARI et al., 2015). Esse processo de segregação ocorre devido às interações mais favoráveis ocorrerem entre componentes similares (sal-sal e polímero-polímero) (PATRÍCIO et al., 2011).

Para todos os sistemas estudados, a temperatura não teve efeito nas composições de equilíbrio de fase dos SAB, em alguns sistemas foram observados apenas um pequeno aumento na região bifásica com o aumento da temperatura. Vários autores reportam que o aumento da temperatura desloca as curvas binodais, expandindo a região bifásica, o que implica em menores concentrações de sal e polímero necessário para formar um SAB (MURARI et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2018b). Para compreender melhor o efeito da temperatura no equilíbrio de fases é necessário uma análise geral das forças motrizes que governam o comportamento do sistema. À medida que a temperatura aumenta, as moléculas ficam mais agitadas, fazendo com que ligações sejam rompidas e formadas durante o processo de separação de fase, aumentando assim, a variação da entalpia. Entretanto, as entropias configuracional e conformacional do polímero também aumentam, devido ao processo de enovelamento da cadeia, expulsando as moléculas de água que formavam camadas de solvatação ao redor das moléculas de PEG e, desta forma possibilita as moléculas alcançarem inúmeras possibilidades de se rearranjarem. Desta forma, ocorre a transferência de água da fase superior para a fase

inferior. Em outras palavras, a separação de fase é facilitada com o aumento da temperatura, pois à medida que a temperatura aumenta observa-se maior diferença das propriedades físico-químicas entre as fases do sistema (FERREIRA et al., 2011; COSTA et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2018b). Mesmo a temperatura não apresentando um efeito marcante nos diagramas de equilíbrio, é possível que apresente efeito sobre as linhas de amarração (*CLA* e *ILA*) e conseqüentemente na partição do soluto nos SAB, visto que com o aumento da temperatura pode ocorrer maior mobilidade das moléculas do sistema.

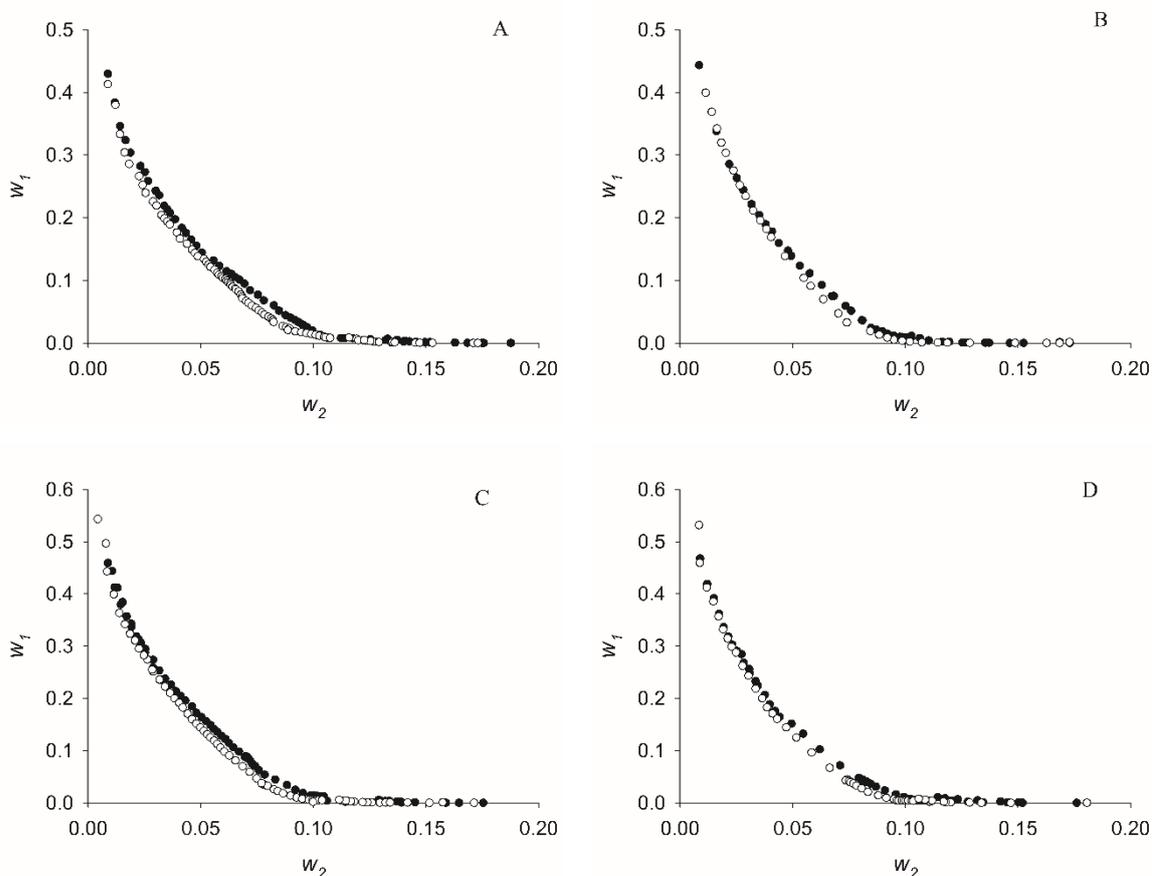
**Figura 9.** Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica do sistema PEG 4000 g·mol<sup>-1</sup> (w<sub>1</sub>) + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (w<sub>2</sub>) (A), PEG 6000 g·mol<sup>-1</sup> (w<sub>1</sub>) + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (w<sub>2</sub>) (B), PEG 4000 g·mol<sup>-1</sup> (w<sub>1</sub>) + Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (w<sub>2</sub>) (C) e PEG 6000 g·mol<sup>-1</sup> (w<sub>1</sub>) + Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (w<sub>2</sub>) (D), em diferentes T = 20 (•), 25 (◦), 30 (▼) e 35 (Δ) °C e p=0.1 Mpa.



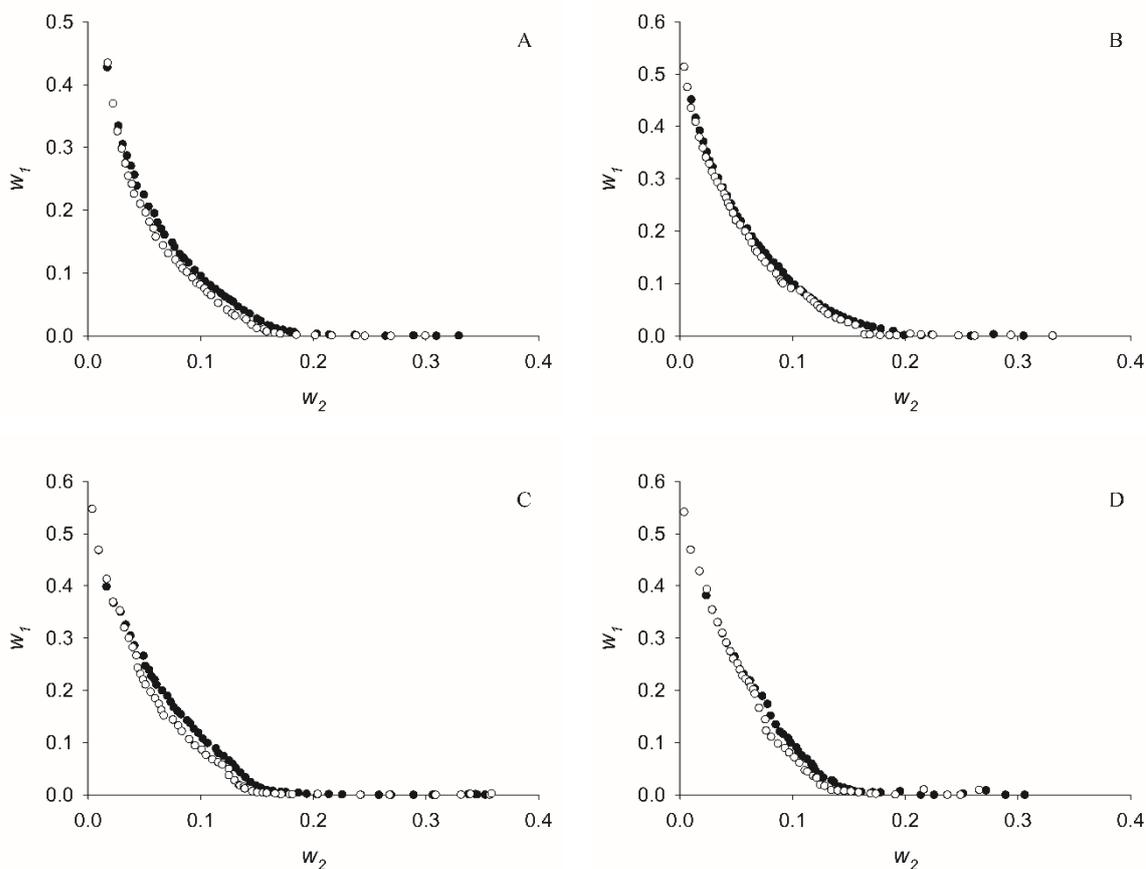
Ao se comparar os sistemas na mesma temperatura e variando a massa molar do polímero (Figura 10 e 11) pode-se observar que aqueles formados com PEG 6000 apresentaram maior região bifásica. Desta forma, para os sistemas formados por PEG 6000, menores concentrações de sal são necessárias para formação do SAB. À medida que a massa molecular do PEG aumenta, a cadeia carbônica cresce, e conseqüentemente aumenta a sua

hidrofobicidade, o que contribui para que o processo de segregação ocorra com menores quantidades de sal e polímero (MURARI et al., 2015). Desta forma, PEG com maior massa molar possui menor solubilidade em meio aquoso e, por isso, ocorre uma menor competição com os íons do sal pela molécula de água quando comparado com PEG com menor massa molecular. Este comportamento foi relatado por outros autores (MURARI et al., 2015; RENFIGO et al., 2015; BARBOSA et al., 2016; SAMPAIO et al., 2016; BARANI et al., 2018).

**Figura 10.** Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica do sistema PEG 4000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (•) ou PEG 6000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (◦) ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $w_2$ ) em diferentes temperaturas: 20 °C (A), 25 °C (B), 30 °C (C) e 35 °C (D) e  $p=0.1$  Mpa.

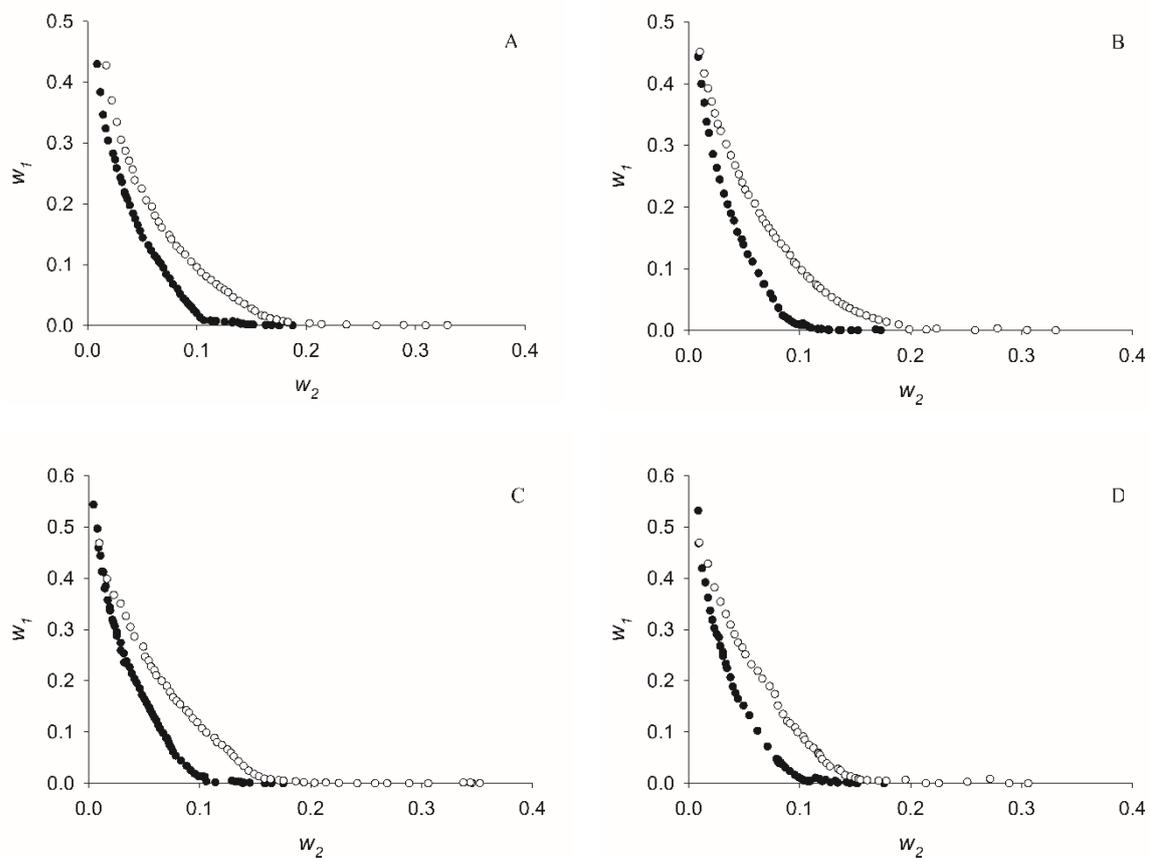


**Figura 11.** Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica do sistema PEG 4000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $\bullet$ ) ou PEG 6000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $\circ$ ) ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $w_2$ ) em diferentes temperaturas: 20 °C (A), 25 °C (B), 30 °C (C) e 35 °C (D) e  $p=0.1$  Mpa.

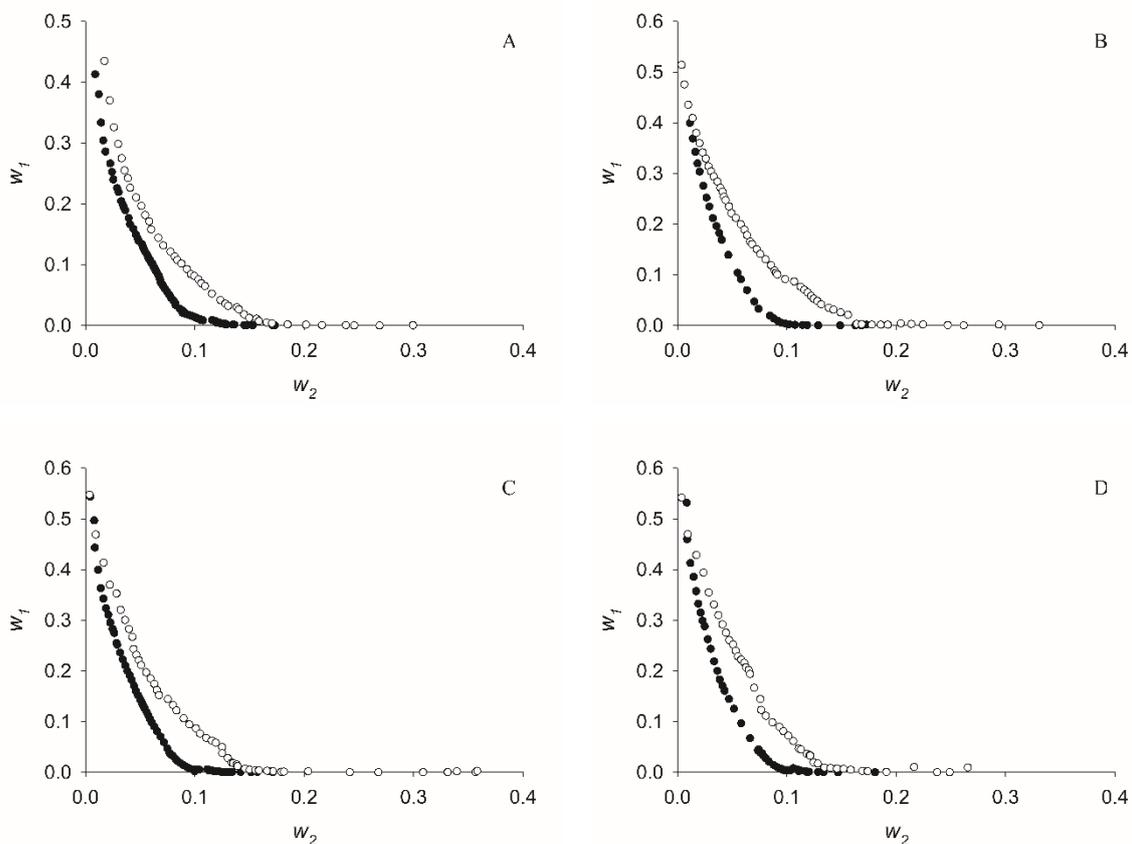


Nas Figuras 12 e 13 pode-se observar o efeito do sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), nas curvas binodais. Cada sal utilizado induz à uma segregação de fase com maior ou menor facilidade. Desta forma, os diagramas de equilíbrio formados por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  apresentaram uma maior região bifásica quando comparados com os diagramas formados por  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , verificando que o ânion exerce influência nas curvas binodais.

**Figura 12.** Curvas binodais expressas em fração mássica do sistema PEG 4000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $w_1$ ) + sal ( $w_2$ )  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $\bullet$ ) e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $\circ$ ) em diferentes temperaturas: 20 °C (A), 25 °C (B), 30 °C (C) e 35 °C (D) e  $p=0.1$  Mpa.



**Figura 13.** Curvas binodais expressas em unidade de fração mássica do sistema PEG 6000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $w_1$ ) + sal ( $w_2$ )  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $\bullet$ ) e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $\circ$ ) em diferentes temperaturas  $T= 20\text{ }^\circ\text{C}$  (A),  $25\text{ }^\circ\text{C}$  (B),  $30\text{ }^\circ\text{C}$  (C) e  $35\text{ }^\circ\text{C}$  (D) e  $p=0.1\text{ Mpa}$ .



A equação não linear (Eq. (57)) foi ajustada aos dados obtidos experimentalmente das curvas binodais dos sistemas estudados. Os valores obtidos para os parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$ , assim como o respectivo desvio padrão ( $sd$ ) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da equação ajustada estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores dos parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  da Eq. (57) para o SAB PEG (4000 e 6000) ( $w_1$ ) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) ( $w_2$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$  ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas,  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)$  °C e  $p = 0.1 \text{ Mpa}^a$ .

20 °C							
Sal	PEG	$A$	$b$	$C$	$d$	$R^2$	$sd^a$
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4000	0,395	-17,879	53,763	-381,564	0,999	0,004
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4000	0,713	-16,159	35,032	-146,391	0,999	0,003
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	6000	0,701	-23,578	78,656	-541,702	0,998	0,005
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	6000	1,513	-25,300	61,384	-221,289	0,999	0,003
25 °C							
Sal	PEG	$a$	$b$	$c$	$d$	$R^2$	$sd^a$
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4000	0,349	-16,732	50,072	-442,119	0,999	0,004
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4000	-0,271	-5,731	6,501	-85,965	0,999	0,002
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	6000	0,560	-20,074	66,570	-601,654	0,999	0,003
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	6000	-0,382	-4,767	3,726	-90,567	0,999	0,005
30 °C							
Sal	PEG	$a$	$b$	$c$	$d$	$R^2$	$sd^a$
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4000	0,037	-11,315	30,441	-339,794	0,998	0,007
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4000	-0,139	-7,982	18,251	-138,231	0,998	0,006
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	6000	0,196	-14,811	47,260	-483,014	0,998	0,008
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	6000	-0,381	-3,541	-1,228	-93,729	0,998	0,008
35 °C							
Sal	PEG	$a$	$b$	$c$	$d$	$R^2$	$sd^a$
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4000	0,551	-17,756	51,345	-427,318	0,998	0,008
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4000	-0,155	-7,715	19,463	-171,265	0,998	0,006
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	6000	0,674	-20,576	67,099	-587,567	0,997	0,009
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	6000	-0,325	-5,332	12,658	-193,765	0,999	0,007

<sup>a</sup>  $sd = (\sum_{i=1}^n (w_1^{cal} - w_1^{exp})^2 / n)^{0.5}$ , onde  $w_1$  representa a fração mássica de PEG e  $n$  é o número de dados da binodal.  $w_1^{exp}$  é a fração mássica de PEG,  $w_1^{cal}$  corresponde aos dados calculados utilizando a Eq. (57).

Com base nos valores de  $R^2$  pode-se verificar que o modelo ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais. Os valores dos parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  foram utilizados para estimar as composições dos componentes da fase superior e inferior pela regra da alavanca (Eqs. (58-61)), utilizando o solver do Excel. Nas Tabelas 5, 6, 7 e 8 estão apresentadas as composições de

equilíbrio de cada componente nas fases superior e inferior de cada sistema, expressas em fração mássica, obtidos pela regra da alavanca, bem como os valores do comprimento (*CLA*) e inclinação (*ILA*) das 3 linhas de amarração.

**Tabela 5.** Linhas de amarração em fração mássica para o SAB formado por PEG 4000 ( $w_1$ ) + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $w_2$ ) + H<sub>2</sub>O ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas T = (20, 25, 30 e 35) °C e p = 0.1 Mpa.<sup>a</sup>

LA	Superior			Inferior			CLA	ILA
	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>		
20°C								
1	0,2803±0,0007	0,0225±0,0001	0,6971±0,0006	0,0016±0,0001	0,1424±0,0003	0,8560±0,0003	0,3034	-2,3244
2	0,3466±0,0041	0,0145±0,0004	0,6389±0,0037	0,0002±0,0001	0,1693±0,0020	0,8306±0,0020	0,3794	-2,2377
3	0,4050±0,0006	0,0102±0,0001	0,5847±0,0006	0,0000±0,0001	0,1948±0,0003	0,8052±0,0003	0,4451	-2,1939
25°C								
1	0,2727±0,0105	0,0241±0,0015	0,7032±0,0090	0,0003±0,0001	0,1461±0,0053	0,8536±0,0052	0,2984	-2,2346
2	0,3516±0,0016	0,0149±0,0001	0,6336±0,0014	0,0000±0,0001	0,1659±0,0007	0,8341±0,0007	0,3826	-2,3277
3	0,4063±0,002	0,0108±0,0001	0,5829±0,0023	0,0000±0,0001	0,1933±0,0012	0,8067±0,0001	0,4454	-2,2262
30°C								
1	0,2758±0,0020	0,0288±0,0003	0,6954±0,0017	0,0020±0,0001	0,1355±0,0008	0,8626±0,0007	0,2939	-2,5668
2	0,3406±0,0002	0,0194±0,0001	0,6400±0,0002	0,0001±0,0001	0,1661±0,0001	0,8337±0,0001	0,3707	-2,3204
3	0,3929±0,0004	0,0137±0,0001	0,5934±0,0004	0,0000±0,0001	0,1977±0,0002	0,8022±0,0002	0,4338	-2,1345
35°C								
1	0,2912±0,0004	0,0247±0,0001	0,6840±0,0003	0,0013±0,0001	0,1330±0,0001	0,8657±0,0001	0,3095	-2,6790
2	0,3422±0,0026	0,0189±0,0003	0,6389±0,0023	0,0000±0,0001	0,1659±0,0012	0,8340±0,0012	0,3724	-2,3269
3	0,4005±0,0006	0,0140±0,0001	0,5855±0,0005	0,0000±0,0001	0,1925±0,0003	0,8075±0,0003	0,4385	-2,2432

<sup>a</sup>Para o CLA as incertezas para u são  $u(w)=0,0001$ ,  $u(T)=0,05$  K e  $u(p) = 5$  kPa.

**Tabela 6.** Linhas de amarração em fração mássica para o SAB formado por PEG 6000 ( $w_1$ ) + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $w_2$ ) + H<sub>2</sub>O ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas T = (20, 25, 30 e 35) °C e p = 0.1 Mpa. <sup>a</sup>

LA	Superior			Inferior			CLA	ILA
	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>		
20°C								
1	0,2934±0,0011	0,0181±0,0001	0,6885±0,0010	0,0004±0,0000	0,1413±0,0005	0,8583±0,0005	0,3178	-2,3792
2	0,3570±0,0025	0,0123±0,0002	0,6307±0,0024	0,0000±0,0000	0,1662±0,0012	0,8338±0,0012	0,3887	-2,3199
3	0,4084±0,0027	0,0094±0,0001	0,5822±0,0026	0,0000±0,0000	0,1939±0,0014	0,8061±0,0014	0,4481	-2,2140
25°C								
1	0,2806±0,0049	0,0230±0,0006	0,6964±0,0042	0,0001±0,0001	0,1423±0,0022	0,8576±0,0022	0,3049	-2,3510
2	0,3581±0,0019	0,0147±0,0002	0,6272±0,0018	0,0000±0,0000	0,1626±0,0008	0,8374±0,0008	0,3874	-2,4223
3	0,4088±0,0006	0,0112±0,0001	0,5800±0,0006	0,0000±0,0000	0,1914±0,0003	0,8086±0,0003	0,4467	-2,2689
30°C								
1	0,3020±0,0044	0,0221±0,0006	0,6759±0,0038	0,0007±0,0001	0,1315±0,0013	0,8678±0,0012	0,3205	-2,7543
2	0,3701±0,0004	0,0141±0,0001	0,6158±0,0003	0,0000±0,0001	0,1574±0,0001	0,8425±0,0001	0,3968	-2,5827
3	0,4213±0,0019	0,0101±0,0001	0,5886±0,0017	0,0000±0,0001	0,1861±0,0008	0,8139±0,0008	0,4566	-2,3941
35°C								
1	0,3034±0,0002	0,0222±0,0001	0,6743±0,0002	0,0003±0,0001	0,1307±0,0001	0,8689±0,0001	0,3219	-2,7935
2	0,3485±0,0036	0,0175±0,0003	0,6340±0,0033	0,0000±0,0001	0,1642±0,0016	0,8358±0,0016	0,3781	-2,3768
3	0,4089±0,0034	0,0129±0,0002	0,5782±0,0032	0,0000±0,0001	0,1891±0,0016	0,8109±0,0016	0,4453	-2,3200

<sup>a</sup>Para o CLA as incertezas para u são  $u(w)=0,0001$ ,  $u(T)=0,05$  K e  $u(p) = 5$  kPa.

**Tabela 7.** Linhas de amarração em fração mássica para o SAB formado por PEG 4000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $w_2$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$  ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ }^\circ\text{C}$  e  $p = 0.1 \text{ Mpa.}^a$

LA	Superior			Inferior			CLA	ILA
	$w_1$	$w_2$	$w_3$	$w_1$	$w_2$	$w_3$		
20°C								
1	0,3319±0,0005	0,0270±0,0001	0,6411±0,0005	0,0011±0,0001	0,2319±0,0003	0,7670±0,0003	0,3892	-1,6141
2	0,4043±0,0056	0,0191±0,0005	0,5766±0,0051	0,0001±0,0001	0,2692±0,0029	0,7307±0,0029	0,4752	-1,6162
3	0,4621±0,0037	0,0149±0,0002	0,5230±0,0035	0,0001±0,0001	0,3109±0,0021	0,6891±0,0021	0,5497	-1,5611
25°C								
1	0,3625±0,0004	0,0217±0,0001	0,6158±0,0003	0,0036±0,0001	0,2186±0,0001	0,7778±0,0001	0,4094	-1,8229
2	0,4074±0,0039	0,0152±0,0005	0,5774±0,0034	0,0004±0,0001	0,2709±0,0019	0,7286±0,0019	0,4807	-1,5912
3	0,4754±0,0129	0,0083±0,0010	0,5164±0,0119	0,0001±0,0001	0,3093±0,0067	0,6906±0,0067	0,5626	-1,5787
30°C								
1	0,3402±0,0065	0,0285±0,0014	0,6313±0,0051	0,0011±0,0001	0,2254±0,0024	0,7735±0,0023	0,3922	-1,7219
2	0,4091±0,0016	0,0161±0,0002	0,5748±0,0013	0,0001±0,0001	0,2692±0,0007	0,7307±0,0007	0,4810	-1,6156
3	0,4688±0,0017	0,0096±0,0001	0,5217±0,0115	0,0000±0,0000	0,3120±0,0009	0,6880±0,0009	0,5579	-1,5501
35°C								
1	0,3360±0,0114	0,0323±0,0026	0,6318±0,0088	0,0003±0,0001	0,2246±0,0041	0,7751±0,0040	0,3869	-1,7452
2	0,4086±0,0178	0,0181±0,0028	0,5733±0,0150	0,0000±0,0000	0,2680±0,0078	0,7320±0,0077	0,4790	-1,6351
3	0,4544±0,0021	0,0119±0,0002	0,5337±0,0019	0,0000±0,0000	0,3191±0,0012	0,6809±0,0012	0,5485	-1,4791

<sup>a</sup>Para o CLA as incertezas para  $u$  são  $u(w)=0,0001$ ,  $u(T)=0,05 \text{ K}$  e  $u(p) = 5 \text{ kPa}$ .

**Tabela 8.** Linhas de amarração em fração mássica para o SAB formado por PEG 6000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $w_2$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$  ( $w_3$ ) em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ }^\circ\text{C}$  e  $p = 0.1 \text{ Mpa.}^a$

LA	Superior			Inferior			CLA	ILA
	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>	w <sub>1</sub>	w <sub>2</sub>	w <sub>3</sub>		
20°C								
1	0,3415±0,0016	0,0162±0,0001	0,6422±0,0015	0,0001±0,0000	0,2373±0,0009	0,7626±0,0009	0,4067	-1,5445
2	0,4138±0,0037	0,0124±0,0002	0,5738±0,0035	0,0000±0,0000	0,2700±0,0020	0,7299±0,0020	0,4874	-1,6059
3	0,4734±0,0030	0,0101±0,0001	0,5164±0,0029	0,0000±0,0000	0,3085±0,0017	0,6915±0,0017	0,5596	-1,5869
25°C								
1	0,3171±0,0081	0,0282±0,0016	0,6548±0,0065	0,0008±0,0001	0,2415±0,0045	0,7577±0,0044	0,3815	-1,4825
2	0,3891±0,0062	0,0158±0,0009	0,5952±0,0053	0,0001±0,0000	0,2827±0,0036	0,7171±0,0036	0,4718	-1,4567
3	0,4705±0,0058	0,0068±0,0005	0,5227±0,0036	0,0000±0,0000	0,3136±0,0032	0,6864±0,0032	0,5617	-1,5339
30°C								
1	0,3502±0,0013	0,0261±0,0002	0,6236±0,0010	0,0010±0,0001	0,2222±0,0005	0,7768±0,0005	0,4006	-1,7812
2	0,4123±0,0018	0,0168±0,0002	0,5710±0,0016	0,0001±0,0001	0,2668±0,0008	0,7331±0,0008	0,4821	-1,6486
3	0,4743±0,0025	0,0095±0,0002	0,5162±0,0022	0,0000±0,0000	0,3087±0,0012	0,6913±0,0012	0,5608	-1,5854
35°C								
1	0,3589±0,0101	0,0287±0,0020	0,6124±0,0081	0,0001±0,0000	0,2160±0,0030	0,7839±0,0030	0,4048	-1,9154
2	0,4111±0,0094	0,0190±0,0016	0,5700±0,0078	0,0000±0,0000	0,2655±0,0038	0,7345±0,0038	0,4793	-1,6676
3	0,4821±0,0009	0,0088±0,0001	0,5090±0,0008	0,0000±0,0000	0,3048±0,0004	0,6952±0,0004	0,5657	-1,6291

<sup>a</sup>Para o CLA as incertezas para  $u$  são  $u(w)=0,0001$ ,  $u(T)=0,05 \text{ K}$  e  $u(p) = 5 \text{ kPa}$ .

Como observado, ocorre uma relação de exclusão entre o PEG e sal formando as duas fases, pois verifica-se que a fase superior é rica por PEG e a fase inferior rica por sal, sendo a água o componente majoritário nas duas fases. Com o aumento da composição global, a concentração de sal na fase superior diminui e a concentração de PEG na fase inferior também diminui. Conseqüentemente a diferença de composição entre as fases aumenta, ocasionando um aumento no *CLA* (SOSA et al., 2017). Foi observado também, que com aumento da massa molar do polímero, ocorreu um aumento no *CLA*. Tal comportamento pode ser explicado devido ao aumento da hidrofobicidade com aumento da massa molar do polímero, que pode promover a transferência de água da fase superior para a fase inferior (ANDRADE et al., 2011).

Nota-se também nas tabelas que os valores do *CLA* e da *ILA* nas diferentes temperaturas em cada linha de amarração foram próximos. Tal fato pode ser atribuído à temperatura não ter um efeito marcante nos diagramas de equilíbrio e a composição global ser igual.

Na Tabela 9 são apresentados os parâmetros ( $k_I$  e  $n$ ) e os coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para todos os sistemas investigados. Vale ressaltar que os valores de  $R^2$  são maiores que 0,951, em todos sistemas, portanto, pode-se afirmar que os dados experimentais foram termodinamicamente consistentes. Além disso, esses valores expressam a confiabilidade da metodologia utilizada para obter os dados experimentais.

**Tabela 9.** Valores dos parâmetros da Eq. (64) para os sistemas PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$  e pressão  $p = 0.1 \text{ MPa}$ .<sup>a</sup>

Sal	PEG	$n$	$k_I$	$R^2$
20°C				
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4000	1,486	-1,726	0,999
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	6000	1,346	-1,560	0,994
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4000	1,363	-0,947	0,995
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	6000	1,522	-1,135	0,992
25°C				
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4000	1,733	-2,117	0,962
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	6000	1,589	-1,952	0,957
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	4000	0,963	-0,639	0,951
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	6000	1,775	-1,246	0,985
30°C				
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4000	1,181	-1,227	0,997

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6000	1,259	-1,553	0,993
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	4000	1,216	-0,840	0,999
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	6000	1,152	-0,820	0,999
35°C				
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4000	1,084	-1,131	0,986
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6000	1,031	-1,103	0,965
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	4000	1,034	-0,623	0,975
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	6000	1,077	-0,787	0,970

<sup>a</sup> Incertezas padrão  $u$  are  $u(w) = 0,0001$ .  $u(T) = 0,05$  °C and  $u(p) = 5$  kPa.

### 5.1.1. Efeito Salting-Out dos Sistemas e Volume Efetivos de Exclusão (VEE)

Em sistemas aquosos bifásicos o tipo de sal utilizado é um importante parâmetro a ser considerado, uma vez que as condições de distribuição dos componentes entre as fases do sistema são relacionadas com os eletrólitos presente no meio (KHAYATI e GHOLITABAR, 2016). Desta forma, cada sal utilizado induz à uma segregação de fase com maior ou menor facilidade. Para melhor compreensão do comportamento dos sistemas estudados, avaliou-se o efeito salting-out dos sais Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>. Na Tabela 10 são apresentados os parâmetros de ajuste ( $\beta$  e  $k$ ) do efeito salting-out e os parâmetros do volume efetivo de exclusão ( $V_{213}^*$  e  $f$ ), bem como os respectivos valores de  $R^2$  e  $sd$ . De acordo com os valores  $R^2$  e  $sd$ , observa-se que as equações (Eq. (65), Eq. (66) e Eq. (67)) foram ajustadas satisfatoriamente aos dados experimentais.

**Tabela 10.** Parâmetros de ajuste ( $\beta$  e  $k$ ) do efeito salting-out e do volume efetivo de exclusão ( $V_{213}^*$  e  $f$ ) para os SAB para os sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ }^\circ\text{C}$  e pressão  $p = 0.1 \text{ MPa}$ .<sup>b</sup>

SAB	T/ $^\circ\text{C}$	$V_{213}^*/\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$10^{-2}f_{213}$	$R^2$	$sd^a$	$k$	$\beta$	$R^2$	$sd^a$
PEG4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	20	5168,579		0,955	0,003	506,261	-3,098	0,997	0,231
PEG4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	25	5750,949		0,943	0,003	551,720	-2,328	0,999	0,033
PEG4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	30	5330,147		0,933	0,003	495,307	-2,006	0,997	0,242
PEG4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	35	5610,681		0,900	0,003	589,407	-2,984	0,998	0,219
PEG6000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	20	6132,605		0,960	0,004	707,426	-5,363	0,996	0,313
PEG6000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	25	6820,893		0,949	0,003	815,665	-4,937	0,995	0,415
PEG6000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	30	6321,833		0,941	0,003	649,054	-3,315	0,996	0,328
PEG6000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	35	6488,166		0,949	0,004	785,989	-4,425	0,998	0,263
PEG4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	20	5979,290		0,945	0,001	479,514	-2,637	0,999	0,098
PEG4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	25	5470,414		0,974	0,003	350,220	-1,023	0,999	0,044
PEG4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	30	5979,290		0,933	0,004	470,618	-1,995	0,998	0,160
PEG4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	35	5659,415	0,014	0,861	0,001	581,561	-2,419	0,997	0,338
PEG6000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	20	7153,619		0,954	0,003	672,678	-5,113	0,999	0,089
PEG6000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	25	6516,904		0,940	0,001	375,436	-0,952	0,999	0,055
PEG6000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	30	7120,999		0,908	0,004	415,008	-0,795	0,999	0,049
PEG6000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	35	6966,346		0,809	0,003	674,868	-2,237	0,999	0,096

<sup>a</sup>  $sd = (\sum_{i=1}^n (w_1^{cal} - w_1^{exp})^2 / n)^{0.5}$ . Onde:  $w_1$  representa a fração mássica do PEG (4000 e 6000) e  $n$  representa o número de dados da binodal.  $w_1^{exp}$  é a fração mássica experimental PEG (4000 e 6000).  $w_1^{cal}$  corresponde aos dados calculados utilizando as Eqs. (65), (66) ou (67).

<sup>b</sup> As incertezas padrão de  $u$  são  $u(w) = 0,0001$ ,  $u(T) = 0,05 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $u(p) = 5 \text{ kPa}$

A capacidade salting-out de um sal é percebida diminuindo a concentração do sal necessária para formar as duas fases quando comparadas com outro sal. O valor obtido para a capacidade salting-out dos sais utilizados segue na seguinte ordem:  $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$  e pode ser verificada pela posição das curvas binodais (Figuras 12 e 13), que implica na maior região bifásica para o sistema contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  comparada ao sistema formado por  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ .

O potencial de solvatação está relacionado com a atração eletrostática e, como os dois sais ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) compartilham o mesmo cátion, seus diferentes ânions desempenham papel importante na atração eletrostática. A capacidade salting-out de um ânion ou de um cátion também depende do raio de hidratação e de sua carga iônica (WANG et al., 2010). Alguns autores relatam que a capacidade salting-out dos sais está relacionada com a energia livre de Gibbs de hidratação ( $\Delta G_{hid}$ ), e os maiores efeitos salting-out têm menores valores de  $\Delta G_{hid}$  (GOU et al., 2012; LO et al., 2015). Os valores de  $\Delta G_{hid}$  para os íons  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$  são:  $-1080$  de  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (MARCUS, 1991) e  $-2793$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (ZAFARANI-MOATTAR et al., 2011), respectivamente. Os valores de  $\Delta G_{hid}$  dos ânions seguem a seguinte ordem:  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-} < \text{SO}_4^{2-}$  enquanto que capacidade salting-out estão na ordem  $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ . Neste estudo, as capacidades salting-out dos sais não podem ser diretamente relacionadas com os valores de  $\Delta G_{hid}$  dos íons, mas podem ser atribuídas em termos de interações específicas entre os ânions e o polímero. Este resultado também foi observado por Govindarajan e Perumalsamy (2013) que estudaram diagramas de equilíbrio de sistemas formados por PEG 2000 e sais de amônio (sulfato, citrato e citrato de hidrogênio).

Observou-se ainda para um mesmo sal, um maior valor do efeito salting-out nos sistemas formados por polímeros de maior massa molar. Esses resultados podem ser relacionados com o volume efetivo de exclusão (*VEE*). O volume efetivo de exclusão está relacionado com uma espécie de espaços vazios disponíveis para interações moleculares, e segundo Wang et al. (2010) o *VEE* caracteriza a afinidade de uma molécula de PEG por uma molécula de sal e assim, mensura a habilidade salting-out dos sistemas. A fim de confirmar o efeito salting-out dos sais, foram determinados os valores do *VEE* dos sistemas a partir dos modelos desenvolvidos por Guan et al. (1993).

Os valores de *VEE* para um mesmo sal foram maiores nos sistemas formados por PEG 6000 quando comparados com o PEG 4000. Com o aumento da massa molar do polímero, houve um aumento de volume vazios, isto é, aumento no espaço disponível para interações moleculares dadas pelo volume efetivo de exclusão. O maior espaço de vazios pode ser atribuído à maior interação sal-água e polímero-água. Estas interações promovem a exclusão do polímero da fase rica em sal (fase inferior) e a exclusão do sal na fase rica em polímero (fase

superior). Segundo Wang et al. (2010) o aumento no valor de  $VEE$  reflete no decréscimo da concentração de sal requerida para a formação do SAB. De acordo com Nascimento et al. (2018a), o efeito do volume de exclusão é causado pelo aumento da massa molar ou concentração do composto, que ocupa os espaços intersticiais de fase promovendo o aumento da solvatação das moléculas. Tal comportamento também foi observado por Govindarajan e Permulsamy (2013) ao avaliarem o efeito de diferentes massas molares de PEG (2000, 4000 e 6000) no volume efetivo de exclusão.

### **5.1.2. Modelagem Termodinâmica dos SAB**

Os dados das linhas de amarração foram utilizados para estimar novos parâmetros de interação de grupo pelo modelo UNIFAC modificado por Kikic et al (1991). Para esta estimativa foram necessários parâmetros de volume e área  $R_k$  e  $Q_k$ , descritos na Tabela 3. Na Tabela 11 estão apresentados os parâmetros de interação ( $a_{ij}$  e  $a_{ji}$ ) obtidos na literatura, bem como os parâmetros de interação estimados e os valores da energia de interação ( $T_{ij}$  e  $T_{ji}$ ) entre os grupos nas diferentes temperaturas estudadas.

**Tabela 11.** Parâmetros de interação ( $a_{ij}$  e  $a_{ji}$ ) de grupo e energia de interação ( $T_{ij}$  e  $T_{ji}$ ) para sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$  nas temperaturas (20, 25, 30 e 35) °C.

Grupo $i$	Grupo $j$	$a_{ij} / \text{K}$	$a_{ji} / \text{K}$	20 °C		25 °C		30 °C		35 °C	
				$T_{ij}$	$T_{ji}$	$T_{ij}$	$T_{ji}$	$T_{ij}$	$T_{ji}$	$T_{ij}$	$T_{ji}$
CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	-11,368	1238,500	1,005	0,602	1,005	0,607	1,005	0,612	1,004	0,617
CH <sub>2</sub>	OH <sup>-</sup>	644,600 <sup>a</sup>	328,200 <sup>a</sup>	0,768	0,874	0,771	0,876	0,774	0,878	0,778	0,880
CH <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	-82,778	-62,138	1,035	1,026	1,034	1,025	1,033	1,025	1,033	1,025
CH <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	1258,700 <sup>b</sup>	1681,100 <sup>b</sup>	0,597	0,502	0,602	0,508	0,607	0,513	0,612	0,519
CH <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>	1657,500	-8,4111	0,507	1,003	0,512	1,003	0,518	1,003	0,524	1,003
CH <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	1300,000 <sup>a</sup>	342,500 <sup>a</sup>	0,587	0,869	0,592	0,871	0,597	0,873	0,602	0,875
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	OH <sup>-</sup>	883,600	-2997,900	0,696	3,421	0,700	3,351	0,704	3,285	0,708	3,223
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1030,900	-822,870	0,655	1,402	0,660	1,394	0,664	1,386	0,669	1,379
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	23,155	21,689	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,991	0,992
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>	2209,100	-34,077	0,404	1,014	0,410	1,014	0,416	1,014	0,422	1,013
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	532,7100	2820,200	0,804	0,314	0,807	0,321	0,809	0,327	0,812	0,333
OH <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	-2292,600 <sup>c</sup>	-1107,800 <sup>c</sup>	2,562	1,575	2,522	1,563	2,483	1,552	2,447	1,541
OH <sup>-</sup>	Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	1610,400 <sup>b</sup>	763,600 <sup>b</sup>	0,516	0,731	0,522	0,735	0,528	0,739	0,533	0,742
OH <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>	2891,900	121,840	0,305	0,951	0,311	0,952	0,317	0,953	0,323	0,954
OH <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	28,7300 <sup>a</sup>	-122,400 <sup>a</sup>	0,988	1,052	0,988	1,051	0,989	1,050	0,989	1,049
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	-1106,600	-2949,500	1,575	3,354	1,563	3,287	1,551	3,223	1,540	3,162

SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O	-279,290	918,230	1,121	0,686	1,119	0,690	1,117	0,695	1,115	0,699
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>	-211,760	-1,2914	1,091	1,001	1,089	1,001	1,088	1,001	1,086	1,001
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O	-21,760	847,570	1,009	0,706	1,009	0,710	1,009	0,714	1,009	0,718
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>	H <sub>2</sub> O	169,240	8,588	0,933	0,996	0,934	0,997	0,935	0,997	0,936	0,997

<sup>a</sup>Dados obtidos de Magnussen (1981);

<sup>b</sup>Dados obtidos de Yan et al. (1999);

<sup>c</sup>Dados obtidos de Cunha (2008).

O comportamento dos diagramas de equilíbrio pode ser melhor entendido por meio dos parâmetros e das interações entre os grupos de contribuição dos componentes formadores do sistema. De acordo com os valores de energia de interações obtidos na Tabela 11, pode-se observar que as interações dos grupos de contribuição do sal ( $\text{SO}_4^{2-}$  ou  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^-$ ) com a água foram maiores que as energias de interações dos grupos do PEG ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ) com a água. Como a energia de interação dos grupos de contribuição do PEG com a água é menor, a água tende a migrar mais facilmente para a fase inferior do sistema. Isto pode ser observado nas tabelas de composição das fases (4-7), onde a fase inferior apresentou maior concentração de água que a fase superior.

Observa-se ainda na Tabela 11 que as energias de interações do grupo de contribuição do sal ( $\text{SO}_4^{2-}$  ou  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ ) com a água foram superiores que os grupos de contribuição  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$  do PEG com a água. Isto pode indicar uma maior afinidade dos ânions do sal ( $\text{SO}_4^{2-}$  ou  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ ) com a água. Isso ocorre em virtude da maior interação dos ânions que são moléculas polares com a molécula de água que também é uma molécula polar, enquanto que o grupo do PEG que é fracamente polar, apresenta menor interação eletrostática com a molécula de água. Além disso, o grupo de contribuição  $\text{SO}_4^{2-}$  apresenta 4 átomos de oxigênio e o  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$  apresenta 7 átomos de oxigênio que é mais eletronegativo que o carbono e interagem bem com os átomos de hidrogênio da molécula de água. Comparando os diferentes ânions, percebe-se que houve maior energia de interação entre a água e  $\text{SO}_4^{2-}$  quando comparado com  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ . Tal resultado pode ser observado na tabela de composição de fases, no qual a fase inferior do sistema contendo  $\text{SO}_4^{2-}$ , apresenta maior concentração de água e menor concentração de sal (devido à diluição do sal na água). Pode-se inferir ainda, que essa maior hidratação do  $\text{SO}_4^{2-}$  resulta em maiores valores de salting-out, conforme observado na Tabela 10, o que facilita a separação de fase, resultando em menores concentrações de sal para formar o sistema aquoso bifásico.

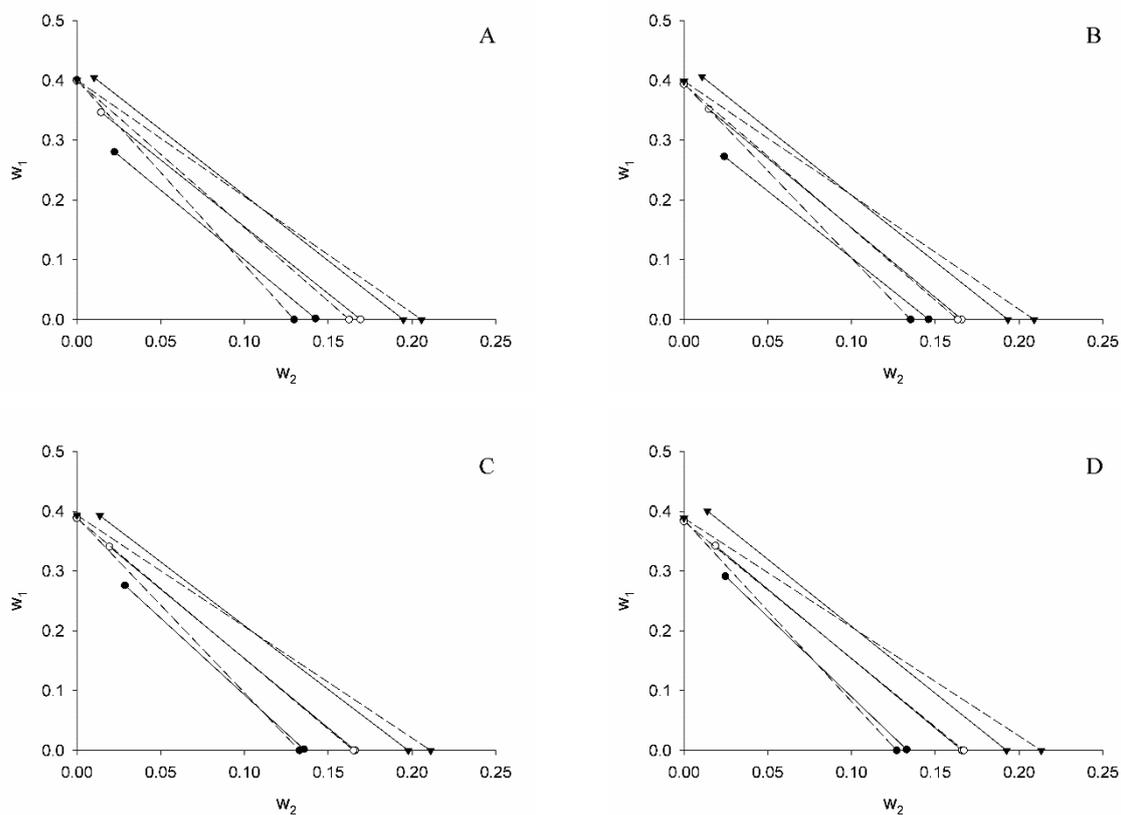
Pode-se observar também, que a energia de interação entre o  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  foi mais forte que a interação entre  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ . Essa diferença de interação mostra que o volume de exclusão entre  $\text{SO}_4^{2-}$  é menor que o volume de exclusão de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ , como pode ser observado na Tabela 10.

Como pode ser observado na Tabela 12 e nas Figuras 14-17, o modelo UNIFAC teve uma boa representação para os sistemas analisados, apresentando desvio médio geral muito baixo. Desta forma, o modelo UNIFAC pode ser utilizado satisfatoriamente para prever dados de linhas de amarração para SAB formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) + água em diferentes temperaturas.

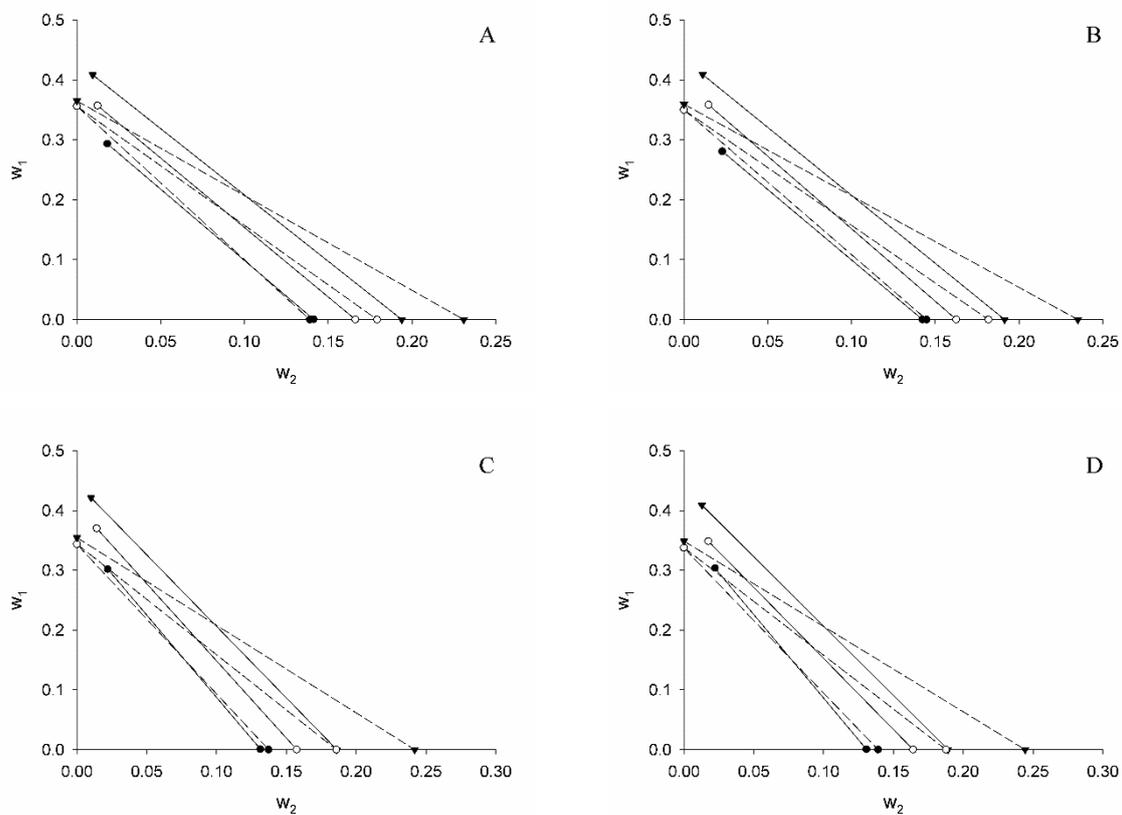
**Tabela 12.** Desvios nas composições dos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , pelo modelo UNIFAC.

ATPS	$\delta x(\%)$
PEG4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	3,407
PEG6000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	3,135
PEG4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	2,785
PEG6000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	2,469
Desvio médio global	2,970

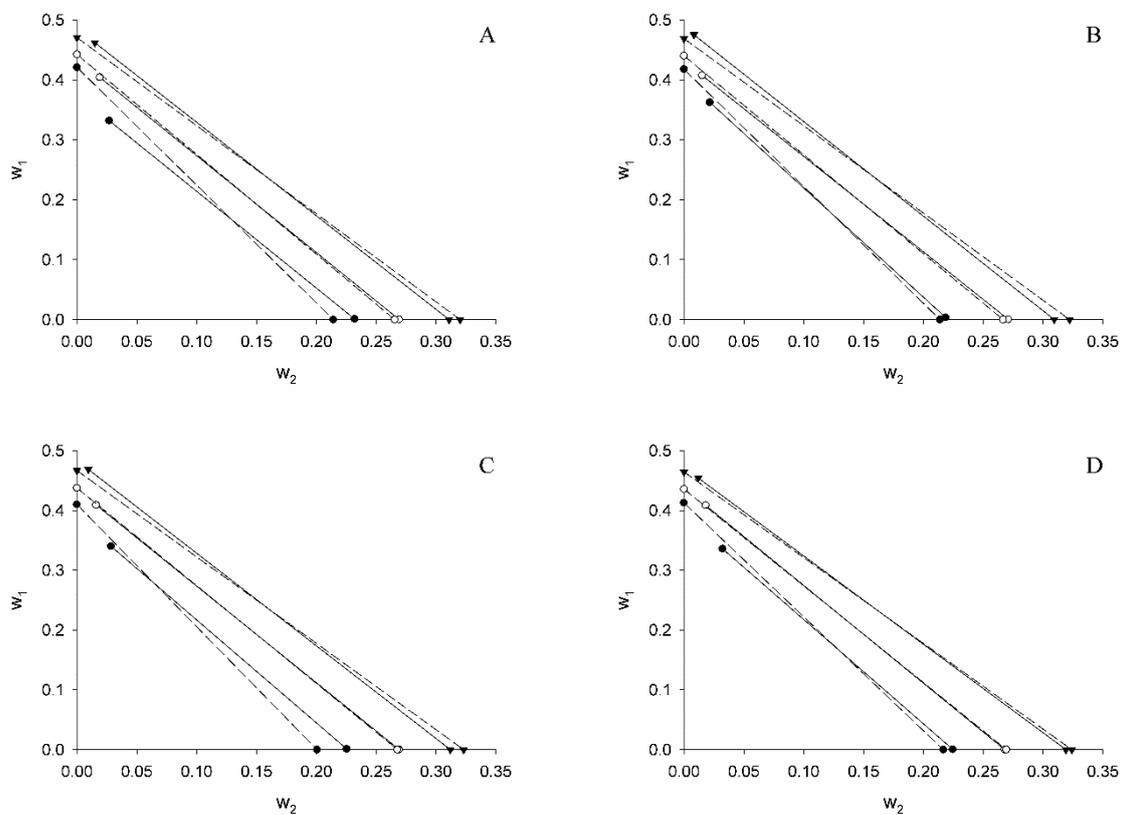
**Figura 14.** Linhas de amarração em unidade de fração mássica para o SAB PEG 4000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $w_2$ ) a diferentes temperaturas  $T = 20^\circ\text{C}$  (A),  $25^\circ\text{C}$  (B),  $30^\circ\text{C}$  (C) e  $35^\circ\text{C}$  (D). Linhas de amarração experimental (—); linhas de amarração correlacionadas pelo modelo UNIFAC (- -). LA1 (●); LA2 (○) e LA3 (▲).



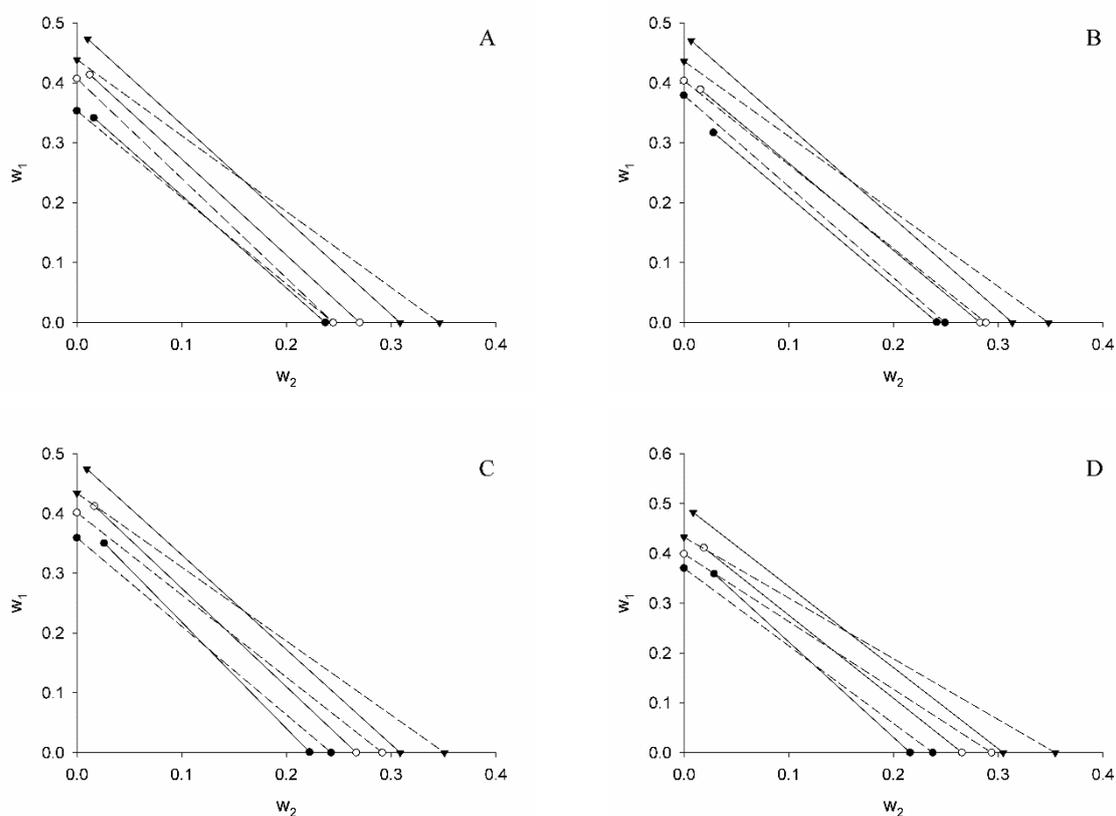
**Figura 15.** Linhas de amarração em unidade de fração mássica para o SAB PEG 6000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $w_2$ ) a diferentes temperaturas  $T = 20^\circ\text{C}$  (A),  $25^\circ\text{C}$  (B),  $30^\circ\text{C}$  (C) e  $35^\circ\text{C}$  (D). Linhas de amarração experimental (—); linhas de amarração correlacionadas pelo modelo (- - -). LA1 (●); LA2 (○) e LA3 (▲).



**Figura 16.** Linhas de amarração em unidade de fração mássica para o SAB PEG 4000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $w_2$ ) a diferentes temperaturas  $T = 20^\circ\text{C}$  (A),  $25^\circ\text{C}$  (B),  $30^\circ\text{C}$  (C) e  $35^\circ\text{C}$  (D). Linhas de amarração experimental (—); linhas de amarração correlacionadas pelo modelo UNIFAC (- -). LA1 (●); LA2 (○) e LA3 (▲).



**Figura 17.** Linhas de amarração em unidade de fração mássica para o SAB PEG 6000 ( $w_1$ ) +  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $w_2$ ) a diferentes temperaturas  $T = 20^\circ\text{C}$  (A),  $25^\circ\text{C}$  (B),  $30^\circ\text{C}$  (C) e  $35^\circ\text{C}$  (D). Linhas de amarração experimental (—); linhas de amarração correlacionadas pelo modelo UNIFAC (- -). LA1 (●); LA2 (○) e LA3 (▲).



## 5.2. Partição das Proteínas

Foram realizados experimentos de partição da lisozima,  $\alpha$ -lactoalbumina e albumina sérico bovina nos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , em 3 linhas de amarração e diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ . Nas Tabelas 13-15 estão apresentados os valores do coeficiente de partição ( $K_p$ ) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ) para a lisozima,  $\alpha$ -lactoalbumina e albumina sérico bovina, respectivamente.

A transferência de massa da proteína entre as duas fases aquosas é resultante do delicado balanço de interações entre a proteína e as outras espécies presentes nas fases que coexistem em equilíbrio (LUECHAU et al., 2010). Diversas propriedades físico-químicas do sistema e da biomolécula determinam o valor de  $K_p$ , por exemplo, algumas propriedades das fases como

natureza químicas dos componentes, massa molar, pH, temperatura, concentrações de sal e do polímero, comprimento das linhas de amarração, entre outras (DA SILVA e LOH, 2006).

Pode-se verificar na Tabela 13 que a lisozima teve preferência pela fase inferior ( $K_p < 1$ ) na maioria dos sistemas estudados. Nestes sistemas foi observado também que com o aumento da composição global do sistema houve uma tendência da mesma migrar para a fase superior do sistema devido ao aumento no valor de  $K_p$ . Observa-se ainda que o coeficiente de partição para a lisozima diminuiu com aumento da massa molar do polímero. Segundo Su e Chiang (2006) esse comportamento é atribuído ao efeito do volume efetivo de exclusão, que aumenta o fenômeno da transferência da proteína para a fase superior à medida que a massa molar do polímero diminui. Desta forma, observa-se que o coeficiente de partição diminui com o aumento da massa molar do polímero. Avaliando-se os valores da energia livre de Gibbs de transferência  $\Delta_{tr}G$  da lisozima da fase inferior do sistema para a fase superior, em todos os casos o valor do  $\Delta_{tr}G$  foi positivo, evidenciando que a partição da lisozima para a fase superior (rica em polímero) é termodinamicamente desfavorável, e o valor torna-se menor com o aumento do *CLA*.

**Tabela 13.** Coeficiente de partição da lisozima ( $K_p$ ) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ) nos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ .

LA	PEG 4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$		PEG 6000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$		PEG 4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		PEG 6000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	
	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
20°C								
1	0,350±0,052	2,562	0,071±0,009	6,431	0,042±0,007	7,701	0,342±0,044	2,629
2	0,498±0,061	1,700	0,112±0,004	5,340	0,473±0,013	1,825	0,463±0,039	1,882
3	0,880±0,014	0,312	0,236±0,097	3,518	0,818±0,145	0,489	0,598±0,072	1,261
25°C								
1	0,464±0,016	1,8715	0,117±0,008	5,320	0,856±0,223	0,384	0,453±0,003	1,966
2	0,608±0,046	1,235	0,149±0,057	4,713	1,602±0,148	-1,167	0,554±0,015	1,560
3	0,669±0,064	0,997	0,188±0,006	4,142	1,748±0,337	-1,384	0,650±0,011	1,085
30°C								
1	0,531±0,043	1,593	0,046±0,003	7,759	0,556±0,301	1,481	0,354±0,011	2,621
2	0,561±0,049	1,457	0,070±0,010	6,693	1,069±0,400	-0,169	0,567±0,019	1,432
3	0,615±0,149	1,226	0,691±0,092	0,930	1,087±0,278	-0,211	0,728±0,026	0,802
35°C								
1	0,335±0,028	2,799	0,158±0,006	4,719	0,273±0,026	3,325	0,270±0,027	3,439
2	0,444±0,062	2,079	0,244±0,048	4,084	0,429±0,051	2,168	0,317±0,088	2,942
3	0,529±0,049	1,634	0,798±0,040	0,579	0,664±0,203	1,050	0,483±0,076	1,851

A  $\alpha$ -lactoalbumina migrou preferencialmente para a fase inferior dos sistemas, exceto nos sistemas formados por PEG 6000 +  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  a  $30^\circ\text{C}$  e  $35^\circ\text{C}$  (Tabela 14). Pode-se observar ainda, que a  $\alpha$ -lactoalbumina migrou mais para a fase inferior nos sistemas formados por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , quando comparados com os sistemas formados por  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , visto que o valor do  $K_p$  foi menor. Tal comportamento pode estar relacionado com a maior interação da  $\alpha$ -lactoalbumina com a fase inferior do sistema formado por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Pode-se observar também na Tabela 14 que o valor do coeficiente de partição aumentou a medida que as concentrações de PEG e sal aumentaram, mostrando a tendência da  $\alpha$ -lactoalbumina se transferir para a fase superior do sistema com aumento do  $CLA$ . O valor da variação da energia livre de Gibbs de transferência diminuiu com o  $CLA$ . Esses valores expressam a mudança de energia livre do sistema quando 1 mol da  $\alpha$ -lactoalbumina é transferida da fase salina para a fase polimérica do sistema. Percebe-se ainda que o processo de transferência da  $\alpha$ -lactoalbumina para a fase superior não é espontânea.

**Tabela 14.** Coeficiente de partição da  $\alpha$ -lactoalbumina ( $K_p$ ) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ) nos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ .

LA	PEG 4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$		PEG 6000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$		PEG 4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		PEG 6000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	
	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{k}\cdot\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{k}\cdot\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{k}\cdot\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{k}\cdot\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$
20°C								
1	0,072±0,067	5,169	0,086±0,002	5,968	0,434±0,038	2,031	0,322±0,021	2,765
2	0,096±0,013	5,237	0,139±0,017	4,816	0,284±0,222	3,069	0,645±0,050	1,072
3	0,124±0,045	5,818	0,391±0,072	2,289	0,447±0,104	1,961	0,851±0,046	0,394
25°C								
1	0,177±0,009	4,292	0,120±0,003	5,251	0,552±0,042	1,417	0,815±0,090	0,514
2	0,192±0,017	4,086	0,139±0,007	4,884	0,724±0,056	0,800	0,949±0,004	0,131
3	0,252±0,028	3,417	0,183±0,004	4,211	0,954±0,025	0,118	1,376±0,128	-0,677
30°C								
1	0,170±0,018	4,467	0,039±0,002	8,181	0,494±0,064	1,799	0,882±0,185	0,345
2	0,184±0,065	4,265	0,178±0,041	4,345	0,667±0,301	1,021	2,339±0,206	-2,137
3	0,231±0,144	3,688	0,354±0,039	2,619	0,947±0,389	0,138	2,899±0,759	-2,627
35°C								
1	0,132±0,005	5,197	0,091±0,003	6,142	0,470±0,044	1,935	1,159±0,113	-0,369
2	0,148±0,050	4,897	0,216±0,022	3,928	0,578±0,072	1,405	1,560±0,179	-1,130
3	0,160±0,031	4,694	0,247±0,049	3,358	0,927±0,047	0,194	4,512±0,280	-3,858

Observa-se na Tabela 15 que os valores do  $K_p$  foram inferiores a 1, indicando que a albumina sérica bovina também teve preferência pela fase inferior na maioria dos sistemas estudados. O valor do  $K_p$  aumentou com aumento do  $CLA$  em todas as temperaturas e sistemas estudados. Tal comportamento pode ser atribuído ao fato de que com o aumento do  $CLA$  ocorre um aumento na concentração de sal na fase inferior e um aumento na concentração do polímero na fase superior. Portanto, cresce o número de interações entre a BSA e o PEG, pois o aumento da concentração de sal na fase inferior faz com que mais íons do sal possam competir com moléculas de BSA para formar interações intermoleculares com moléculas de água. Desta forma, as moléculas do BSA são desidratadas por meio dos íons do sal, causando um aumento na hidrofobicidade das moléculas de proteases favorecendo a interação BSA-PEG (RITO-PALAMARES, 2005; SARAVANAN, 2008). O valor da variação da energia livre de Gibbs de transferência, diminuiu com o aumento do comprimento da linha de amarração, mostrando que com o aumento do  $CLA$  a transferência da BSA para a fase superior vai se tornando mais espontânea.

Comparando as proteínas estudadas (lisozima,  $\alpha$ -lactoalbumina e BSA) percebe-se que todas tiveram preferência para a fase inferior dos sistemas. De forma geral observa-se que a BSA apresentou menores valores de  $K_p$ . Tal fato pode estar relacionado com as características das proteínas como peso molecular, conformação, ponto isoelétrico, entre outros. A lisozima é uma proteína pequena, de cadeia única, composta por 129 resíduos de aminoácidos e peso molecular em torno de  $14.300 \text{ g.mol}^{-1}$ . Seu ponto isoelétrico (PI) é de 11,3. A  $\alpha$ -lactoalbumina também é uma proteína pequena, com peso molecular de  $14.176 \text{ g.mol}^{-1}$ , com PI de 4,8 e composta por 123 resíduos de aminoácidos. Já a BSA é uma proteína globular, solúvel em água, formada por cerca de 580 resíduos de aminoácidos e apresenta peso molecular de  $66.267 \text{ g.mol}^{-1}$  e PI de 4,9. O fato da BSA apresentar menores valores de  $K_p$  pode estar relacionado ao fato da mesma apresentar um alto peso molecular o que necessitaria de um volume maior na fase superior para ela se alojar. Como a fase superior é rica em polímero pode ocorrer um efeito do VEE. Em contrapartida a BSA é uma proteína que apresenta grande afinidade pela molécula de água, o que a levaria a particionar para a fase com maior quantidade de água.

**Tabela 15.** Coeficiente de partição da albumina sérico bovina ( $K_p$ ) e energia livre de Gibbs de transferência ( $\Delta_{tr}G$ ) nos sistemas formados por PEG (4000 e 6000) + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas T = (20, 25, 30 e 35) °C.

LA	PEG 4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$		PEG 6000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$		PEG 4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$		PEG 6000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	
	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{kJmol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{kJmol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{kJmol}^{-1}$	$K_p$	$\Delta_{tr}G/\text{kJmol}^{-1}$
20°C								
1	0,077±0,020	6,242	0,026±0,002	8,935	0,403±0,108	2,213	0,329±0,007	2,708
2	0,233±0,056	3,553	0,045±0,005	7,545	0,136±0,028	4,868	0,751±0,078	0,704
3	0,774±0,005	0,626	0,140±0,009	4,785	0,447±0,104	1,961	0,978±0,284	0,107
25°C								
1	0,011±0,002	11,115	0,036±0,001	8,230	0,019±0,005	9,849	0,461±0,006	1,918
2	0,058±0,015	7,076	0,048±0,003	7,521	0,102±0,042	5,652	0,776±0,019	0,628
3	0,607±0,030	1,237	0,086±0,005	6,096	0,340±0,141	2,673	1,031±0,038	-0,075
30°C								
1	0,010±0,004	11,697	0,022±0,003	9,655	0,021±0,008	9,751	0,014±0,001	12,070
2	0,381±0,010	2,435	0,052±0,005	7,447	0,093±0,055	5,990	0,809±0,093	0,543
3	2,169±0,847	-1,951	0,101±0,014	5,777	0,525±0,343	1,622	1,184±0,241	-0,400
35°C								
1	0,008±0,005	12,343	0,010±0,001	11,911	0,057±0,015	7,339	0,062±0,011	7,161
2	0,054±0,026	7,462	0,049±0,008	7,704	0,212±0,040	3,978	0,387±0,003	2,434
3	0,241±0,060	3,463	0,139±0,013	5,057	0,633±0,099	1,172	1,229±0,092	-0,582

### 5.3. Determinação da Variação de Entalpia e Entropia no Processo da Partição da Lisozima

A migração da proteína entre as duas fases do sistema aquoso bifásico está relacionada com as variações entálpica e entrópica, referentes ao balanço energético das interações intermoleculares entre os componentes do sistema com o soluto e às variações das interações realizadas pelo sistema e também da conformação do soluto. Desta forma, para melhor entendimento do processo de migração da proteína nas fases foram determinadas as contribuições entálpicas e entrópicas de transferência da lisozima na terceira linha de amarração para os sistemas composto por PEG 4000 + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ }^\circ\text{C}$ , os quais podem ser observados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Parâmetros termodinâmicos para a lisozima em SAB formados por PEG 4000 + sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$ , em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35) \text{ }^\circ\text{C}$ .

Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta_{tr}G/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H \times 10^3/\text{kJmol}^{-1}$	$T\Delta_{tr}S \times 10^3/\text{kJmol}^{-1}$
PEG 4000 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$			
20	0,312	62,018	61,706
25	0,997	68,817	67,820
30	1,226	61,994	60,769
35	1,634	78,876	77,244
PEG 4000 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$			
20	0,490	88,613	88,132
25	-1,384	70,248	71,632
30	-0,210	82,677	82,888
35	1,049	105,732	104,683

Na Tabela 16 é possível observar que a partição da lisozima para a fase superior só foi espontânea a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  nos sistemas composto por  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  ( $\Delta_{tr}G < 0$ ). Sabendo que o valor de  $\Delta_{tr}G$  é composto pelas variações entálpica e entrópica do processo de partição, nota-se que a transferência da proteína entre as fases do SAB é entropicamente dirigida, uma vez que os valores de  $\Delta_{tr}H$  foram positivos.

Os resultados de  $\Delta_{tr}H$  mostrados na Tabela 16 podem ser compreendidos em termos de destruição/formação de interações intermoleculares que ocorrem durante o processo de transferência de proteínas (MAGESTE et al., 2012; ALCÂNTARA et al., 2014). Portanto, a

variação da entalpia associada ao processo de transferência da proteína envolve quatro pares de interação (Eq. 91)

$$\Delta_{tr}H = \Delta H_{PR-S} + \Delta H_{A-S} + \Delta H_{PR-P} + \Delta H_{A-P} \quad (91)$$

Em que  $\Delta H_{i-j}$  representa a entalpia de interação entre os componentes  $i$  e  $j$ . Esses componentes são água (A), PEG (P), sal (S) e proteína (PR). No processo de transferência da proteína da fase superior (rica em PEG) para a fase inferior (rica em sal), interações são formadas entre proteína-sal e PEG-água. Assim, os termos  $\Delta H_{PR-S}$  e  $\Delta H_{A-P}$  contribuem para a redução da entalpia total do sistema, pois promovem liberação de energia. Já os termos  $\Delta H_{A-S}$  e  $\Delta H_{PR-P}$  representam interações que são perdidas no processo de transferência e, portanto contribuem para o aumento da entalpia do sistema. Baseado nos valores positivos de  $\Delta_{tr}H$ , a seguinte relação entre os termos de interação podem ser obtidas:

$$|\Delta H_{A-S} + \Delta H_{PR-P}| > |\Delta H_{PR-S} + \Delta H_{A-P}| \quad (92)$$

A partir dessa expressão pode-se avaliar a influência do sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) no processo de partição. Pela Tabela 15, percebe-se que os valores de  $\Delta_{tr}H$  nos sistemas formados por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  forma inferiores que nos sistemas formados por  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ . Tal fato pode estar relacionado com a energia de interação entre a moléculas de água com os ânions ( $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ ) já que os dois sais compartilham o mesmo cátion e com as interações que ocorrem entre a proteína e o PEG, visto que esses dois termos contribuem para o valor positivo na variação da entalpia de transferência. Como a molécula de água tem uma energia de interação maior com o  $\text{SO}_4^{2-}$  (Tabela 11) quando comparado com o  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ , pode estar ocorrendo uma maior interação entre o  $\text{SO}_4^{2-}$  com a proteína, visto que esse termo contribui para reduzir a  $\Delta_{tr}H$ .

A variação de entropia do sistema  $T\Delta_{tr}S$  relaciona com o aumento ou redução das possibilidades de distribuição dos componentes presentes no sistema que ocorre devido à transferência de moléculas da lisozima da fase inferior para a fase superior. Considerando que  $T\Delta_{tr}S$  pode ter contribuído para o particionamento da lisozima e os outros componentes químicos transferidos simultaneamente com a lisozima, a Eq. (93) expressa a mudança total de entropia do sistema causado pelo processo de transferência de todos os componentes presentes no SAB, isto é:

$$\Delta_{tr}S = \Delta S_P + \Delta S_{Comp} \quad (93)$$

Onde:  $\Delta S_P$  é a variação da entropia devido a transferência das moléculas da proteína de uma fase para outra e  $\Delta S_{Comp}$  é a variação da entropia devido a transferência dos componentes (PEG, sal e água) que se deslocam simultaneamente entre as fases durante o processo de transferência da lisozima.

Pela equação acima temos que  $\Delta S_p$  tem uma contribuição positiva, uma vez que a proteína migrou de uma região com menor densidade numérica para a fase com maior densidade numérica (maior concentração de água). Já o termo  $\Delta S_{Comp}$  tem uma contribuição negativa para a variação de entropia de transferência, pois os componentes do sistema (sal e água), que tem as interações quebradas devido à chegada da proteína, irão migrar para uma região de menor densidade numérica, diminuindo a entropia configuracional do sistema.

Desta forma, o conhecimento dos parâmetros termodinâmicos ( $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$ ) são importantes para elucidar as forças envolvidas no processo de partição, visto que este conhecimento pode esclarecer as interações que estão ocorrendo e a possibilidade de otimização dos sistemas aquosos bifásicos a fim de promover melhor rendimento de partição.

## 5.4. Modelagem Termodinâmica da Partição da Lisozima

### 5.4.1. Parâmetros de Interação pelo Modelo UNIFAC

A modelagem UNIFAC foi utilizada para determinação dos parâmetros de interação entre os grupos de contribuição dos componentes do sistema com os grupos de contribuição da proteína (lisozima). A modelagem UNIFAC com a lisozima foi realizada nos sistemas compostos por PEG (4000 e 6000) + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nas diferentes temperaturas T= (20, 25, 30 e 35)°C. O erro global para todos os sistemas foi de 5,25%.

A determinação desses parâmetros de interação é essencial para a sua utilização no modelo proposto neste trabalho. Na Tabela 17, pode-se observar os parâmetros de interação ( $a_{ij}$  e  $a_{ji}$ ) entre os dos grupos formadores do sistema com os grupos de contribuição da proteína.

**Tabela 17.** Parâmetros de interação ( $a_{ij}$  e  $a_{ji}$ ) entre os grupos de contribuição da proteína com os grupos de contribuição dos componentes do sistema.

Grupo <i>i</i>	Grupo <i>j</i>	$a_{ij}$ / K	$a_{ji}$ /K
CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2293,5	2762,9
CH <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	2965,1	2750,6
CH <sub>2</sub>	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	1712,2	2917,2
CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	1717,2	2469,8
CH <sub>2</sub>	Fenil	-935,05	-832,77
CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-984,43	-1514,9
CH <sub>2</sub>	NH	1933,3	1915,4
CH <sub>2</sub>	C=NH <sub>2</sub>	1932,3	2044,9

CH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	2111,4	1913,1
CH <sub>2</sub>	SH	2050,2	2003,4
CH <sub>2</sub>	COOH	1841,5	1751,3
CH <sub>2</sub>	CH	1598,5	1848,2
CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1775,9	1695,4
CH <sub>2</sub>	S	2099,9	2261,1
CH <sub>2</sub>	C=CH	2245,9	2388,7
CH <sub>2</sub>	NH=CH	1382,5	1819,9
CH <sub>2</sub>	C=O	1542,1	1703,2
CH <sub>2</sub>	Fenol	1514,3	1716,5
CH <sub>2</sub>	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2001,1	1386,0
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	623,8	-252,0
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	NH <sub>3</sub>	2199,1	1601,7
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	2591,9	2165,6
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub>	1866,1	1721,3
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	Fenil	-1010,6	-850,5
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-902,5	-52,51
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	NH	2004,3	1999,9
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	C=NH <sub>2</sub>	1948,4	2092,2
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	NH <sub>2</sub>	1011,7	1750,7
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	SH	1984,0	2002,2
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	COOH	2263,3	1711,9
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	CH	2259,1	1986,2
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2054,4	1835,2
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	S	2507,2	2187,0
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	C=CH	2860,9	1737,8
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	NH=CH	2860,0	1959,4
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	C=O	1587,2	1684,3
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	Fenol	2694,2	1586,7
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2953,9	1470,9
OH <sup>-</sup>	CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2643,1	2004,5
OH <sup>-</sup>	NH <sub>3</sub>	679,9	1773,5
OH <sup>-</sup>	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	1444,8	2583,6
OH <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub>	2053,7	2937,6

OH <sup>-</sup>	Fenil	-947,7	-1211,3
OH <sup>-</sup>	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-1106,7	-886,7
OH <sup>-</sup>	NH	1976,0	1997,1
OH <sup>-</sup>	C=NH <sub>2</sub>	2177,9	1942,8
OH <sup>-</sup>	NH <sub>2</sub>	1941,4	2003,0
OH <sup>-</sup>	SH	2004,0	2020,6
OH <sup>-</sup>	COOH	1733,1	2066,8
OH <sup>-</sup>	CH	1809,8	2123,8
OH <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2284,0	2107,7
OH <sup>-</sup>	S	2234,8	1760,3
OH <sup>-</sup>	C=CH	2393,0	1914,2
OH <sup>-</sup>	NH=CH	1555,5	2100,2
OH <sup>-</sup>	C=O	1546,5	1753,6
OH <sup>-</sup>	Fenol	1695,5	207,9
OH <sup>-</sup>	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2280,4	1498,0
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	-1236,5	2903,4
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>3</sub>	-2839,8	2728,6
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	1851,0	2869,7
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub>	1800,5	2105,8
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Fenil	-1101,3	-1132,6
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-1050,9	-988,0
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	NH	1719,6	2021,7
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	C=NH <sub>2</sub>	2306,4	1999,3
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>2</sub>	2229,8	2130,8
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SH	2023,8	2105,9
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	COOH	2177,0	2183,7
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CH	1719,2	2244,6
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2266,8	2011,4
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	S	2102,7	1956,2
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	C=CH	2286,2	1795,1
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	NH=CH	2224,9	2903,2
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	C=O	1831,1	2839,2
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Fenol	2978,5	29434,6
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2338,7	2521,4

Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2741,5	2405,2
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>3</sub>	2984,3	619,67
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	2443,2	2168,2
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	CH <sub>3</sub>	2580,1	1770,7
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Fenil	-1133,7	-991,2
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-1093,8	-1103,5
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	NH	1482,6	2025,0
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	C=NH <sub>2</sub>	2369,7	2126,8
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>2</sub>	2191,6	2083,8
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	SH	2023,7	2045,5
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	COOH	1529,1	1054,0
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	CH	2539,7	1839,1
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2495,2	1886,8
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	S	1822,2	2013,3
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	C=CH	2967,5	2453,3
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	NH=CH	2629,8	2031,1
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	C=O	1678,2	2212,8
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Fenol	1220,1	1137,4
Na <sub>2</sub> <sup>+</sup>	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	1963,4	2786,9
H <sub>2</sub> O	CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2832,7	2912,5
H <sub>2</sub> O	NH <sub>3</sub>	2145,8	700,1
H <sub>2</sub> O	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	1945,8	1990,8
H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub>	900,6	2095,1
H <sub>2</sub> O	Fenil	-1085,0	-838,6
H <sub>2</sub> O	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-1199,9	-856,7
H <sub>2</sub> O	NH	2408,4	2013,5
H <sub>2</sub> O	C=NH <sub>2</sub>	1971,5	2027,3
H <sub>2</sub> O	NH <sub>2</sub>	2850,1	2367,2
H <sub>2</sub> O	SH	1982,1	2073,9
H <sub>2</sub> O	COOH	2752,5	2104,1
H <sub>2</sub> O	CH	1857,2	1959,3
H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2970,7	2381,3
H <sub>2</sub> O	S	1937,7	2238,5
H <sub>2</sub> O	C=CH	2964,9	1912,0

H <sub>2</sub> O	NH=CH	2559,0	1212,1
H <sub>2</sub> O	C=O	2670,7	1489,0
H <sub>2</sub> O	Fenol	2874,3	1672,9
H <sub>2</sub> O	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2860,3	1498,6
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	NH <sub>3</sub>	2909,0	2386,3
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	2811,9	2131,8
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	CH <sub>3</sub>	2413,9	2582,5
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	Fenil	-977,6	-982,9
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-1158,0	-593,9
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	NH	2165,0	1469,6
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	C=NH <sub>2</sub>	2029,6	2121,5
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	NH <sub>2</sub>	1985,4	1954,9
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	SH	2071,0	2055,0
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	COOH	1876,9	2093,7
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	CH	1882,9	2066,2
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2965,4	1742,1
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	S	2069,4	1967,3
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	C=CH	998,0	1440,8
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	NH=CH	386,8	1088,6
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	C=O	-1279,6	2089,4
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	Fenol	2975,6	1834,1
CH <sub>2</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	320,4	1840,2
NH <sub>3</sub>	CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	2051,0	2578,9
NH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2975,6	2798,9
NH <sub>3</sub>	Fenil	-988,7	-965,1
NH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-920,12	-1005,0
NH <sub>3</sub>	NH	1998,3	1973,6
NH <sub>3</sub>	C=NH <sub>2</sub>	2068,5	1952,9
NH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	1579,2	2055,9
NH <sub>3</sub>	SH	2195,3	2016,7
NH <sub>3</sub>	COOH	2327,7	2323,4
NH <sub>3</sub>	CH	1812,7	2534,4
NH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	871,7	1900,6
NH <sub>3</sub>	S	2240,5	2048,0

NH <sub>3</sub>	C=CH	2975,7	2985,0
NH <sub>3</sub>	NH=CH	2001,5	1915,0
NH <sub>3</sub>	C=O	2436,7	1722,7
NH <sub>3</sub>	Fenol	2754,0	1678,0
NH <sub>3</sub>	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	1865,6	1197,4
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	CH <sub>3</sub>	2286,6	2931,1
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	Fenil	-831,0	-982,2
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-962,3	-961,5
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	NH	2130,6	1943,4
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	C=NH <sub>2</sub>	2019,3	2036,8
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	NH <sub>2</sub>	1967,0	2050,1
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	SH	2113,5	2043,3
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	COOH	1890,0	2284,5
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	CH	2136,5	2039,6
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1695,7	1796,8
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	S	2072,9	2004,9
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	C=CH	1517,1	2785,9
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	NH=CH	-129,37	1622,0
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	C=O	2778,8	2705,0
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	Fenol	1975,7	2232,4
CHCH(NH <sub>2</sub> )COOH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2278,8	2857,3
CH <sub>3</sub>	Fenil	-790,3	-917,7
CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-1008,3	-857,9
CH <sub>3</sub>	NH	2396,4	2376,4
CH <sub>3</sub>	C=NH <sub>2</sub>	2028,3	2166,1
CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	1983,8	1870,6
CH <sub>3</sub>	SH	2039,3	1805,8
CH <sub>3</sub>	COOH	1871,5	2072,2
CH <sub>3</sub>	CH	2217,8	2178,6
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1861,4	1849,1
CH <sub>3</sub>	S	2013,1	1992,8
CH <sub>3</sub>	C=CH	2972,8	2179,6
CH <sub>3</sub>	NH=CH	1706,8	1838,4
CH <sub>3</sub>	C=O	2459,5	2419,1

CH <sub>3</sub>	Fenol	2112,6	2671,1
CH <sub>3</sub>	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2759,2	1233,4
Fenil	CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	-953,3	-886,7
Fenil	NH	2055,0	2065,5
Fenil	C=NH <sub>2</sub>	2136,0	1979,6
Fenil	NH <sub>2</sub>	2124,1	2049,6
Fenil	SH	2349,2	2013,8
Fenil	COOH	1370,9	2361,8
Fenil	CH	2101,9	2497,0
Fenil	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1771,4	-44,8
Fenil	S	2188,8	1444,6
Fenil	C=CH	554,9	1178,8
Fenil	NH=CH	1459,5	2217,2
Fenil	C=O	2218,6	721,73
Fenil	Fenol	2100,9	2778,6
Fenil	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2395,1	2335,2
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	NH	1957,1	1978,5
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	C=NH <sub>2</sub>	2056,3	2085,7
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	NH <sub>2</sub>	1964,4	2067,0
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	SH	2049,6	1450,6
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	COOH	1717,7	1919,9
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	CH	2039,4	2228,8
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1682,2	1983,8
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	S	2184,7	2059,5
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	C=CH	2713,8	2315,5
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	NH=CH	1652,8	1114,2
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	C=O	2351,5	2157,7
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	Fenol	1909,3	2642,9
CH <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> N)COOH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2514,8	2001,8
NH	C=NH <sub>2</sub>	2089,3	2031,7
NH	NH <sub>2</sub>	1969,3	1968,4
NH	SH	2139,9	2106,0
NH	COOH	2154,8	2113,7
NH	CH	2004,1	2161,7

NH	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1883,3	2513,4
NH	S	2261,4	2063,4
NH	C=CH	1813,4	1709,4
NH	NH=CH	2148,0	2109,7
NH	C=O	2952,2	1652,6
NH	Fenol	1931,6	1764,3
NH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2090,2	2915,4
C=NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	1672,7	1991,5
C=NH <sub>2</sub>	SH	2128,7	2139,5
C=NH <sub>2</sub>	COOH	2241,2	2003,6
C=NH <sub>2</sub>	CH	2139,5	2058,1
C=NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1995,1	1730,6
C=NH <sub>2</sub>	S	1975,1	1871,2
C=NH <sub>2</sub>	C=CH	2598,5	159,30
C=NH <sub>2</sub>	NH=CH	2985,1	2415,5
C=NH <sub>2</sub>	C=O	2235,0	2968,5
C=NH <sub>2</sub>	Fenol	2468,8	2858,1
C=NH <sub>2</sub>	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	1835,2	2055,0
NH <sub>2</sub>	SH	1834,5	2127,2
NH <sub>2</sub>	COOH	2082,2	2153,2
NH <sub>2</sub>	CH	1915,9	2475,4
NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1773,9	2020,0
NH <sub>2</sub>	S	1917,1	1959,4
NH <sub>2</sub>	C=CH	2271,6	2385,2
NH <sub>2</sub>	NH=CH	2628,5	2558,3
NH <sub>2</sub>	C=O	2397,0	2927,9
NH <sub>2</sub>	Fenol	2961,7	2667,7
NH <sub>2</sub>	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2362,9	2154,9
SH	COOH	1883,8	2008,8
SH	CH	2032,1	1915,9
SH	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2186,9	1958,0
SH	S	2025,7	1913,0
SH	C=CH	1777,5	888,9
SH	NH=CH	2196,0	2904,5

SH	C=O	1091,6	1086,4
SH	Fenol	1453,5	2002,3
SH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	1797,2	2050,8
COOH	CH	2089,7	2182,7
COOH	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	1974,9	1978,0
COOH	S	2038,6	1765,3
COOH	C=CH	1506,8	2247,3
COOH	NH=CH	2832,9	2217,4
COOH	C=O	2323,7	2239,4
COOH	Fenol	2459,7	2570,6
COOH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	575,4	1802,8
CH	CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	2099,2	1826,1
CH	S	2001,5	2088,9
CH	C=CH	2403,4	2068,9
CH	NH=CH	1917,8	1723,3
CH	C=O	2548,7	2927,0
CH	Fenol	2274,9	2158,8
CH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2010,7	-561,93
CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	S	1840,3	1363,4
CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	C=CH	2288,9	2975,7
CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	NH=CH	1746,5	1812,0
CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	C=O	300,15	2048,7
CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	Fenol	2691,2	2380,1
CH <sub>3</sub> CH(H <sub>2</sub> N)COOH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2176,2	1978,7
S	C=CH	2561,0	2132,4
S	NH=CH	2627,6	2184,4
S	C=O	1828,7	1227,1
S	Fenol	1076,5	1913,0
S	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	1575,0	1628,0
C=CH	NH=CH	2321,5	2474,6
C=CH	C=O	2130,5	2968,9
C=CH	Fenol	2968,1	2497,8
C=CH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	1837,5	2020,7
NH=CH	C=O	1834,4	1998,0

NH=CH	Fenol	1641,8	2036,8
NH=CH	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2257,8	2977,2
C=O	Fenol	2517,5	2206,1
C=O	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	1742,1	1644,9
Fenol	CH(NH <sub>2</sub> )COOH	2945,1	1246,2

### 5.5.2. Parâmetros Termodinâmicos do Modelo Proposto

Para melhor entendimento do processo de migração da lisozima nas fases, foram determinadas as contribuições combinatorial (entrópica) do modelo UNIFAC e do modelo de Johansson, as contribuições residuais (entálpica) do modelo UNIFAC e do modelo de Johansson e as interações de longa distância dada pela equação de Debye-Hückel. Essas interações podem ajudar a elucidar o processo de partição das biomoléculas em um sistema aquoso bifásico, visto que o processo de migração do soluto entre as fases do sistema depende fortemente das interações entre os componentes das fases, bem como das interações entre os componentes do sistema com a proteína e do grau de organização do sistema relacionados com o volume e área das moléculas. Foi realizada a modelagem utilizando a lisozima, nas 3 linhas de amarração para o sistema formado por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + PEG 4000 a 20°C.

#### Interações de Longo Alcance

As interações de longo alcance entre os grupos de contribuição das moléculas foram determinadas pela equação de Debye-Hückel. Essas interações são também conhecidas como interações de Coulomb, são interações fracas. A Tabela 18 apresenta os valores do coeficiente de atividade para o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nas 3 linhas de amarração, referentes ao termo de Debye-Hückel.

**Tabela 18.** Valores dos coeficientes de atividade do termo de Debye-Hückel para Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nas 3 linhas de amarração.

LA	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$\gamma_i^{D-H}$
1	$-1,1990 \times 10^{-5}$	$-1,1990 \times 10^{-5}$
2	$-1,5774 \times 10^{-5}$	$-1,5774 \times 10^{-5}$
3	$-2,1111 \times 10^{-5}$	$-2,1111 \times 10^{-5}$

Pode-se perceber que essas interações foram baixas, na ordem de 10<sup>-5</sup>. Com o aumento da composição global do sistema, ou seja, com aumento da concentração de PEG e sal, percebe-se um aumento na intensidade dessa interação (mais negativo). Tal aumento pode estar

relacionado à diminuição da concentração de água, e aumento da concentração de sal. Esse aumento na concentração de íons, faz com que aumente a intensidade das interações Colombianas, visto que são interações eletrostáticas dependem da concentração de sal do sistema e como a concentração de sal aumenta e a quantidade do solvente (água) diminui essa interação tende a aumentar.

### Contribuições Entálpicas do Processo de Partição

O termo residual do modelo UNIFAC está relacionado com as interações dos componentes formadores das fases do sistema (PEG, sal e água). A Tabela 19 apresenta os valores do coeficiente de atividade para os diferentes componentes (PEG, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O), nas 3 linhas de amarração, referentes ao termo UNIFAC residual.

**Tabela 19.** Valores dos coeficientes de atividade UNIFAC residual para PEG, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O nas 3 linhas de amarração.

LA	PEG	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	$\gamma_i^{R Unifac}$
1	-45,2194	2,1938	2,0736	-40.9520
2	-48,0593	2,8088	2,4027	-42.8478
3	-50,6398	3,3334	2,5848	-44.7216

Pode-se perceber que com aumento da concentração de PEG e sal, houve um aumento em módulo na intensidade dessas interações. Esse comportamento era esperado, visto que com aumento da concentração de PEG e sal, aumentam a quantidade de grupos de contribuição desses componentes para fazer interações. Esse termo está relacionado com as interações que podem ocorrer entre todos os componentes formadores do sistema, na ausência da proteína, conhecido como conteúdo energético de cada fase. Quando a proteína migra de uma fase para outra, ocorre uma mudança na auto energia da fase, quebrando interações entre os componentes e, ao mesmo tempo, formando novas interações proteína-componente. Desta forma, a partição da proteína nas fases requer a quebra de interações entre os componentes originais para criar uma cavidade na qual a proteína possa se alojar. Assim, a proteína irá se transferir da fase onde os componentes interagem mais fortemente e irá particionar para a fase onde há menos gasto de energia para formar a cavidade na qual ela será alojada. Sendo assim, quanto maior a interação entre os componentes menos favorável é a migração da proteína entre as fases.

As interações entre os constituintes do sistema (PEG, sal e água) com a proteína é analisada pelo termo residual de Johansson. Segundo Johansson et al. (1998) esse termo refere-se a todos os tipos de interações que ocorrem entre o soluto e os componentes presentes nas

fases superior e inferior do sistema. A Tabela 20 apresenta os valores do coeficiente de atividade para os diferentes componentes (PEG, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O e Lisozima), nas 3 linhas de amarração, referentes ao termo Residual de Johansson.

**Tabela 20.** Valores dos coeficientes de atividade do termo Residual de Johansson para PEG, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O e Lisozima, nas 3 linhas de amarração.

LA	PEG	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	Lisozima	$\gamma_i^{Entálpica\ Johansson}$
1	2.5188×10 <sup>5</sup>	8.6890×10 <sup>4</sup>	-1,5145×10 <sup>4</sup>	-1,5145×10 <sup>4</sup>	3.08E+05
2	2.4361×10 <sup>5</sup>	6.5234×10 <sup>4</sup>	-3,0212×10 <sup>4</sup>	-3,0212×10 <sup>4</sup>	2.48E+05
3	2.2993×10 <sup>5</sup>	3.9817×10 <sup>4</sup>	-4,4763×10 <sup>4</sup>	-4,4763×10 <sup>4</sup>	1.80E+05

Pode-se perceber que com aumento da composição global do sistema, houve uma redução na intensidade das interações. Percebe-se ainda, que as interações entre a água e a proteína foram negativas. De acordo com Johansson et al. (1998) o componente do sistema que interage mais fortemente com o soluto apresentará um  $w_{ip}$  mais negativo. Como a água apresenta em maior concentração na fase inferior e a proteína em questão migrou preferencialmente para esta fase, pode-se presumir que a água interagiu mais fortemente com a proteína. Desta forma esse termo, mostra que a proteína particiona para a fase que contenha a maior concentração do componente com a qual tem maior interação. Percebe-se ainda que as interações foram altas, na faixa entre 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup>. Esse alto valor pode estar relacionado com o fato do modelo considerar que a proteína está infinitamente diluída nas fases e o fato de se utilizar o somatório das contribuições dos grupos de contribuição de cada componente do sistema com os grupos de contribuição da proteína.

### Contribuições Entrópica do Processo de Partição

O termo combinatorial do modelo UNIFAC leva em consideração o tamanho e a forma dos grupos de contribuição dos componentes formadores do sistema. A Tabela 21 apresenta os valores do coeficiente de atividade para os diferentes componentes (PEG, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O), nas 3 linhas de amarração, referentes ao termo UNIFAC Comb.

**Tabela 21.** Valores dos coeficientes de atividade do termo UNIFAC Combinatorial para PEG, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O, nas 3 linhas de amarração.

LA	PEG	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	$\gamma_i^{C\ Unifac}$
1	30,4808	0,0190	-1,8096	28.6902
2	30,3691	-0,1995	-2,0325	28.1371
3	29,4125	-0,3698	-2,1532	26.8895

Pode-se perceber que a intensidade do coeficiente de atividade do PEG é maior que os outros componentes do sistema. Tal fato está relacionado ao tamanho da molécula do polímero, que apresenta uma quantidade de grupos de contribuição maior, quando comparados aos grupos do sal e a molécula de água.

O termo combinatorial do modelo de Johansson mostra que a contribuição entrópica para a partição de um soluto em um SAB está relacionada com a diferença em termos de densidade numérica entre as duas fases. A Tabela 22 apresenta os valores do coeficiente de atividade para os diferentes componentes (PEG, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O), nas 3 linhas de amarração, referentes ao termo Combinatorial Johansson.

**Tabela 22.** Valores dos coeficientes de atividade do termo Combinatorial Johansson para PEG, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O, nas 3 linhas de amarração.

LA	PEG	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	$\gamma_i^{Entrópica\ Johansson}$
1	33,5281	-245,8976	-2,9209×10 <sup>3</sup>	-3,133×10 <sup>3</sup>
2	43,2729	-304,6315	-3,8931×10 <sup>3</sup>	-4,1545×10 <sup>3</sup>
3	50,0189	-368,1847	-4,3456×10 <sup>3</sup>	-4,6638×10 <sup>3</sup>

Pode-se observar que com o aumento da composição global do sistema, ocorre um aumento em módulo da intensidade dessa interação. Como força motriz, a entropia levará a proteína a particionar para a fase com maior número de moléculas por unidade de volume (n/v), a qual é determinada principalmente pelo número de moléculas de água em cada fase. De modo geral, a fase com maior densidade numérica poderá acomodar o soluto de várias formas diferentes (diferentes configurações), aumentando a partição para aquela fase. Segundo Johansson, Karlström e Tjerneld (1999) esse termo também é chamado de efeito do volume de exclusão, e afirma que é entropicamente menos favorável para um soluto particionar para a fase com menor número de moléculas por unidade de volume. Essa força motriz entrópica leva a uma exclusão da fase com o menor número de moléculas por unidade de volume (TJERMELD e JOHANSSON, 1999). Assim, a fase com maior número de moléculas exerce uma atração

entrópica em todas as moléculas. Desta forma, nos sistemas PEG/sal, forças de natureza entrópica atuarão no processo forçando a biomolécula a se concentrar na fase rica em sal, visto ser esta a que contém maior densidade numérica (JOHANSSON et al., 1998). Segundo da Silva e Loh (2006) a proteína irá migrar para a fase superior rica em polímero nos sistemas polímero/sal caso exista interações entálpicas contribuindo para este comportamento, como as interações específicas entre a proteína e o polímero. Percebe-se ainda que os valores dos coeficientes de atividade do termo residual do modelo de Johansson foram alto, na faixa de  $10^3$ . Esse alto valor pode estar relacionado ao fato do modelo considerar que a proteína está infinitamente diluída nas fases.

## 6. Conclusão

Foram obtidos dados de equilíbrio de sistemas compostos por polietilenoglicol (PEG 4000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ou PEG 6000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ) e água em diferentes temperaturas  $T = (20, 25, 30 \text{ e } 35)^\circ\text{C}$ , onde foi verificado que a temperatura não apresentou grande efeito nos diagramas de equilíbrio e que a massa molar do polímero e do sal utilizado influenciaram na região bifásica. Foram obtidos 3 linhas de amarração para cada sistema, onde foi observado que o comprimento da linha de amarração (*CLA*) aumentou com o aumento da composição global dos constituintes. Foi verificado que as proteínas lisozima,  $\alpha$ -lactoalbumina e BSA migraram preferencialmente para a fase inferior na maioria dos sistemas e que a partição da lisozima foi entropicamente dirigida. O modelo UNIFAC apresentou baixos desvios entre as composições experimentais e calculadas. O volume efetivo de exclusão aumentou com a massa molar do polímero. Foi sugerido um modelo para a partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos, no qual foi utilizada a equação de Johansson adaptado ao método de contribuição de grupos e o modelo UNIFAC. O modelo proposto leva em consideração as contribuições entálpicas e entrópicas do processo de transferência de massa da proteína bem como as contribuições combinatorial e residual dos componentes do sistema e das interações de longo alcance. O coeficiente de Debye-Hückel foi baixo e negativo nas 3 linhas de amarração. Foi possível determinar o coeficiente de atividade entálpico e entrópico do modelo UNIFAC e do modelo de Johansson. Foi verificado que a lisozima apresentou afinidade pela molécula de água e que o coeficiente de atividade para o termo combinatorial do modelo de Johansson foi alto para a molécula de água. Tais evidências mostram as possíveis contribuições para a migração da lisozima para a fase inferior. Mais estudos devem ser realizados para a simulação do coeficiente de partição de proteína em SAB. Entretanto, este trabalho mostra uma

perspectiva de um modelo geral para a predição da partição de proteínas em SAB, devido a quantificação dos parâmetros entálpicos, entrópicos e das interações de longa distância.

## 7. Referências

ABRAMS, D. S.; PRAUSNITZ, J. M. "Statistical Thermodynamics of Liquid Mixtures: A New Expression for the Excess Gibbs Energy of Partly or Completely Miscible Systems", **AICHE Journal**, v. 21, p. 116-128, 1975.

AGUIAR, R. S. D. S. **Modelagem termodinâmica de equilíbrio líquido-líquido em sistemas envolvendo líquidos iônicos com modelos de composição local/contribuição de grupo e estruturas moleculares determinadas via química quântica**. 2009. 189 p. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

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

ALBERTSSON, P.A. *Partition of cell and macromolecules*. New York: John Wiley, 1986, 346p.

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

ALVARENGA, J. M.; FIDELES, A. R.; DA SILVA, M. V.; MURARI, G. F.; TAYLOR, J. G.; DE LEMOS, L. R.; RODRIGUES, G. D.; MAGESTE, A. B. Partition study of textile dye Remazol Yellow Gold RNL in aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 391, p. 1-8, 2015.

ANDRADE, V. M.; RODRIGUES, G. D.; CARVALHO, R. M. M.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H. Aqueous two-phase systems of copolymer L64 + organic salt + water: Enthalpic L64-salt interaction and Othmer-Tobias, NRTL and UNIFAC thermodynamic modeling. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, p. 9-15, 2011.

ANDREWS, B. A.; SCHMIDT, A. S.; ASENJO, J. A. Correlation for the Partition Behavior of Proteins in Aqueous Two-Phase Systems: Effect of Surface Hydrophobicity and Charge. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 380-390, 2005.

- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8826-8835, 2011.
- AZEVEDO, A. M.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AIRES-BARROS, M. R. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 240-247, 2009.
- AZIZ, N. F. H. A.; ABBASILIASI, S.; NG, H. S.; PHAPUGRANGKUL, P.; BAKAR, M. H. A.; TAM, Y. J.; TAN, J. S. Purification of  $\beta$ -mannanase derived from *Bacillus subtilis* ATCC 11774 using ionic liquid as adjuvant in aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 1055-1056, p. 104-112, 2017.
- AZNAR, M.; STRAGEVITCH, L.; DAVILA, S. G. Liquid-liquid equilibria: a comparison between original and modified UNIFAC, **Latin American Applied Research**, v. 28 p. 135-138, 1998.
- BAKHSI, H.; MOBALEGHOLESLAM, P. Phase equilibria calculations of electrolyte solutions containing water- polymer- salt using a new thermodynamic model, applicable in aqueous two phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 434, p. 222-232, 2017.
- BARANI, A.; PIRDASHTI, M.; HEIDARI, Z.; DRAGOI, E.-N. Influence of the molecular weight of polymer, temperature and pH on phase diagrams of poly (ethylene glycol) + dipotassium tartrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 458, p. 1-9, 2018.
- BARBOSA, A. A.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I.; JÚNIOR, 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.
- BARRETO, C. L., R.; CASTRO, S. S.; JÚNIOR, E. C. S.; VELOSO, C. M. V.; VERÍSSIMO, L. A. A.; SAMPAIO, V. S.; GANDOLFI, O. R. R.; FONTAN, R. C. I.; NEVES, I. C. O.; BONOMO, R. C. F. Liquid–Liquid Equilibrium Data and Thermodynamic Modeling for Aqueous Two-Phase System Peg 1500 + Sodium Sulfate + Water at Different Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 64, p. 810-816, 2019.

- BARROS, D. P. C. CAMPOS, S. R. R.; MADEIRA, P. P.; AZEVEDO, A. M. BATISTA, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Modeling the partitioning of amino acids in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1329, p. 52-60, 2014.
- BARROS, D. P. C.; CAMPOS, S. R. R.; AZEVEDO, A. M.; BATISTA, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Predicting protein partition coefficients in aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography A**, v. 1470, p. 50-58, 2016.
- BATISTA, I. C.; GANDOLFI, O. R. R.; SAMPAIO, V. S. SANTOS, K. A.; FONTAN, R. C. I.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F. Thermodynamics for curcumin (*Curcuma longa L.*) partitioning in the alcohol–salt aqueous two-phase system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, p. 577-584, 2020.
- BONDI, A. Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Glasses. New York: Wiley, 1968.
- BONDI, A. Van der Waals Volume and Radii. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, p. 441-451, 1964.
- 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.
- CANEVAROLO J. R, SEBASTIÃO V. Ciência dos polímeros. Artiliber editora, São Paulo, 2002.
- 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.
- CHEN, W.; LIANG, S.; GUO, Y.; GUI, X.; TANG, D. Investigation on vapor–liquid equilibria for binary systems of metal ion-containing ionic liquid [bmim]Zn<sub>2</sub>Cl<sub>5</sub>/NH<sub>3</sub> by experiment and modified UNIFAC model. **Fluid Phase Equilibria**, v. 360, p. 1-6, 2013.
- CHICAROUX, A. K.; ZEINER, T. Theoretical and experimental investigation of mass transfer in aqueous two-phase systems based on linear and branched polymers. **Fluid Phase Equilibria**, v. 479, p. 106-113, 2019.

COSTA, A. R.; COIMBRA, J. S. R.; FERREIRA, L. A.; MARCOS, J. C.; SANTOS, I. J. B.; SALDANA, M.; TEIXEIRA, J. A. C. The partitioning of bovine lactoferrin in the aqueous two-phase system containing poly (ethylene glycol) and sodium citrate. **Food and Bioproducts Processing** v. 95, p. 118–124, 2015.

COUTINHO, J. A. P.; PESSOA, F. L. P. A modified extended UNIQUAC model for proteins. **Fluid Phase Equilibria**, v. 222-223, p. 127-133, 2004.

CUNHA, E. V. C. **Equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos água + PEG 8000 + sal: determinação experimental e modelagem termodinâmica**. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; FRANCISCO, K. R.; CARDOSO, M. V.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R. PEO-[M(CN)<sub>5</sub>NO]<sup>x-</sup> (M = Fe, Mn, or Cr) Interaction as a Driving Force in the Partitioning of the Pentacyanonitrosylmetallate Anion in ATPS: Strong Effect of the Central Atom. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 11669-11678, 2008.

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

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

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de alimentos de Fennema. Artmed Editora, 2009.

DANIELSKI, L.; STRAGETICH, L. Cap. 4: Classical Models Part 2: Activity Coefficient Models and Applications. **Thermodynamics of Phase Equilibria in Food Engineering**, p. 103-162, 2019.

DE SOUSA, R. C.; COIMBRA, J. S. R.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; ROJAS, E. E. G.; VICENTE, A. A. A. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysozyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 887, 2579-2584, 2009.

DERR, E. L. e DEAL, C. H. Analytical Solution of Groups: Correlation of Activity Coefficients Through Structural Group Parameters. **Proceedings of the International Symposium on Distillation**, v.32, p.44-51, 1969.

- DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Correlation of protein partitioning in aqueous polymer two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 513, p. 137-143, 1990.
- DOMAŃSKA, U. Experimental Data of Fluid Phase Equilibria-Correlation and Prediction Models: A Review. **Process**, v. 227, p. 1-26, 2019.
- EITEMAN, M. A.; GAINER, J. L. A model for the prediction of partition coefficients in aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, p. 31-41, 1991.
- 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.
- FERREIRA, L. A.; TEIXEIRA, J. A. Salt effect on the aqueous two-phase system PEG 8000 – Sodium Sulfate. **Journal of Chemical and Engineering Data**, 56, 133–137, 2011.
- FLORY, P. J. **Principles of Polymer Chemistry**. Ithaca: Cornell University Press, 1953. Cap. 12 and 13.
- FLORY, P. J. Thermodynamics of high polymer solutions. **The Chemical Physics**, v. 10, p. 51–61. (1942).
- FREDENSLUND A, GMEHLING J, RASMUSSEN P. Vapor-liquid equilibrium using UNIFAC. Amsterdam: Elsevier; 1977.
- FREDENSLUND, A.; JONES, R. L.; PRAUSNITZ, J. M. Group contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures. **AIChE Journal**, v. 21, p. 1086-99, 1975.
- GANI, R. Group contribution-based property estimation methods: advances and perspectives. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 33, p. 184-196, 2019.
- GEBREYOHANNES, S.; NEELY, B. J.; GASEM, K. A. M. One-parameter modified nonrandom two-liquid (NRTL) activity coefficient model. **Fluid Phase Equilibria**, v. 379, p. 196-205, 2014.
- GIRALDO-ZUÑIGA, D.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Coeficiente de partição da  $\alpha$ -Lactoalbumina e  $\beta$ -Lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos influência da massa molar do polímero. **Ciência y Tecnologia Alimentaria**, v. 3, p. 149-155, 2001.

GMEHLING, J.; CONSTANTINESCU, D; SCHMID, B. Group Contribution Methods for Phase Equilibrium Calculations. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 6, p. 267-292, 2015.

GÓMES, E.; MACEDO, E. A. Partitioning of DNP-amino acids in ionic liquid/citrate salt based Aqueous Two-Phase System. **Fluid Phase Equilibria**, v. 484, p. 82-87, 2019.

GONÇALVES, L. F. S.; FELIZBERTO, N. C. M.; SILVA, K. C.; MAGISTA, A. M.; RODRIGUES, G. D.; LEMOS, L. R. Equilibrium phase behavior of aqueous two-phase system formed by triblock copolymer + sulfate salt + water at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 479, p. 145-152, 2018.

GOVINDARAJAN, R.; PERUMALSAMY, M. Phase Equilibrium of PEG 2000 + Triammonium Citrate + Water System Relating PEG Molecular Weight, Cation, Anion with Effective Excluded Volume, Gibbs Free Energy of Hydration, Size of Cation, and Type of Anion at (298.15, 308.15, and 318.15) K. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 58, p. 2952-2958, 2013.

GUAN, Y.; LILLEY, T. H.; TREFFRY, T. E. A new excluded volume theory and its application to the coexistence curves of aqueous polymer two-phase systems. **Macromolecules**, v. 26, p. 3971-3979, 1993.

GUGGENHEIM, E.A. *Mixtures*. Oxford: Clarendon Press; 1952.

GUO, W.; MA, J. WANG, Y.; HAN, J.; LI, Y.; SONG, S. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of hydrophilic alcohols (ethanol/2- propanol/1-propanol) and MgSO<sub>4</sub>/ZnSO<sub>4</sub> at (303.15 and 313.15) K and correlation, **Thermochimica Acta**, v. 546, p. 8-15, 2012.

GUPTA, R. B.; HEIDEMANN, R. A. Solubility Models for Amino Acids and Antibiotics. *AIChE Journal*, v. 36, p. 333-341, 1990.

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

HAMTA, A. DEHGHANI, M. R.; GHOLAMI, M. Novel experimental data on aqueous two-phase system containing PEG-6000 and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> at T = (293.15, 303.15 and 313.15) K. **Journal of Molecular Liquids**, v. 241, p. 144-149, 2017.

HANSEN, H. R.; RASMUSSEM, P.; FREDENSLUND, A.; SCHILLER, GMEHLING, J. Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution, revision and extension. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 30, p. 2352-2355, 1991.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. v. 1508, p. 69-85, 2000.

HUGGINS. M. L. Theory of solutions of high polymers. **Journal of The American Chemical Society**. v. 64, p. 1712–1719, 1942. doi: 10.1021/ja01259a068.

IQBAL, M.; TAO, Y.; XIE, S.; ZHU, Y.; CHEN, D.; WANG, X.; HUANG, L.; PENG, D.; SATTAR, A.; SHABBIR, M. A. B.; HUSSAIN, H. I.; AHMED, S.; YUAN, Z. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, p. 18, 2016.

JIMENEZ, Y. P.; GALLEGUILLOS, H. R.; CLAROS, M. Liquid-liquid partition of perchlorate ion in the aqueous two-phase system formed by NaNO<sub>3</sub> + Poly(ethylene glycol) + H<sub>2</sub>O. **Fluid Phase Equilibria**, v. 421, p. 93-103, 2016.

JOHANSSON, H.-O.; KARLSTRÖM, G.; TJERNELD, F.; HAYNES, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 711, 3-17, 1998.

JOHANSSON, H.-O.; PERSSON, J.; TJERNELD, F. Thermoseparating water/polymer system: A novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 66, p. 247–257, 1999.

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.

KHALIFA, M.; LUE, L. A group contribution method for predicting the solubility of mercury. **Fluid Phase Equilibria**, v. 432, p. 76-84, 2017.

KHAYATI, G.; GHOLITABAR, A. Liquid–Liquid Equilibrium of Hydrophilic Alcohols with Three Different Salts of Chloride: Experiment and Correlation. **Journal of Chemical and Engineering Data**. v. 61, 1454-1461, 2016.

- KIKIC, I.; FERMEGLIA, M.; RASMUSSEN, P. UNIFAC prediction of vapor-liquid equilibria in mixed solvent-salt systems. **Chemical Engineering Science**, v. 46, p. 2775-2780, 1991.
- KURAMOCHI, H.; NORITOMI, H.; HOSHINO, D.; NAGAHAMA, K. Representation of activity coefficients of fundamental biochemical in water by the UNIFAC model. **Fluid Phase Equilibria**, v. 130, p. 117-132, 1997.
- LE MAGUER, M. In: Schwartzberg HG, Hartel RW, editors. **Physical chemistry of foods: thermodynamics and vapor/liquid equilibria**. New York, NY: Marcel Dekker; 1992.
- LO, S. C.; RAMANAN, R. N.; TEY, B. T.; LING, T. C.; SHOW, P. L.; OOI, C. W. Liquid-liquid equilibrium of alcohols + ammonium/potassium/sodium acetate + water systems: experimental and correlation, **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 60 p. 2848-2857, 2015.
- 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, p. 1432-1436, 2010.
- MACÊDO, E. A.; SKOVBOG, P.; RASMUSSEN, P. Calculation of phase equilibria for solutions of strong electrolytes in solvent—water mixtures. **Chemical Engineering Science**, v. 45, p. 875-882, 1990.
- MADEIRA, P. P.; BESSA, A.; BARROS, D. P. C.; TEIXEIRA, M. A.; ÁLVARES-RIBEIRO, L.; AIRES-BARROS, M. R.; RODRIGUES, A. E.; CHAIT, A.; ZASLAVSKY, B. Y. Solvatochromic relationship: Prediction of distribution of ionic solutes in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1271, p. 10-16, 2013.
- MAGESTE, A. B.; DE LEMOS, L. R.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, M. C. H.; DA 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 of Chromatography A**, v. 1216, p. 7623-7629, 2009.
- MAGESTE, A. B.; SENRA, T. D. A.; DA SILVA, M. C. H.; BONOMO, R. C. F.; DA SILVA, L. H. M. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 69-77, 2012.

MAGNUSSEN, T.; RASMUSSEN, P.; FREDENSLUND, A. UNIFAC parameter table for prediction of liquid-liquid equilibriums. **Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 20, p. 331-339, 1981.

MARCUS, Y. Thermodynamics of Solvation of Ions Part 5-Gibbs Free Energy of Hydration at 298.15 K. Journal of the Chemical Society, **Faraday Transactions**, v. 87, p. 1995-1999, 1991.

MARTINS, J. P.; COIMBRA, J. S. D.; OLIVEIRA, F. C.; SANAIOTTI, G.; DA SILVA C. A. S.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. D. H. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol) 400 and sulfate salts. **Journal of Chemical and 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: Biomedical Sciences and Applications**, v. 711, p. 285-293, 1998.

MISHRA, J.; TIWARI, S. K.; ABOLHASANI, M. M.; AZIMI, S; NAYAK, G. C. 2-**Fundamental of polymer blends and its thermodynamics. Micro and Nano Fibrillar Composites (MFCs and NFCs) from Polymer Blends**, p. 27-55, 2017.

MISTRY, S. L.; KAUL, A.; MERCHUK, J.; ASENJO, J., Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 741, p. 151-163, 1996.

MURARI, G. F.; PENIDO, J. A.; MACHADO, P. A. L.; LEMOS, L. R.; LEMES, N. H. T.; VIRTUOSO, L. S.; RODRIGUES, G. D.; MAGESTE, A. B. Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol + ammonium sulfate + water: equilibrium data and thermodynamic modeling. **Fluid Phase Equilibria**, v. 406, p. 61-69, 2015.

NASCIMENTO, M. B.; CASTRO, S. S.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I.; NASCIMENTO, D. J.; GANDOLFI, O. R. R.; SAMPAIO, V. S.; VERÍSSIMO, L. A. A.; BONOMO, R. C. F. Equilibrium data and thermodynamic studies of  $\alpha$ -amylase partition in aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 463, p.69-79, 2018a.

NASCIMENTO, R. G.; FONTAN, R. C. I.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; CASTRO, S. S.; SANTOS, L. S. Liquid–Liquid Equilibrium of Two-Phase Aqueous Systems Composed of PEG 400, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and Water at Different Temperatures and pH Values: Correlation and

Thermodynamic Modeling. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 63, p. 1352-1362, 2018b.

NAZER, B.; DEGHANI, M.; GOLIAEI, B.; MORAD, E. Partitioning of pyrimidine single stranded oligonucleotide using polyethylene glycol e sodium sulfate aqueous two-phase systems; experimental and modeling. **Fluid Phase Equilibria**, v. 432, p. 45-53, 2017.

NELDER, J. A.; MEAD, R. A simplex method for function minimization. **The Computer Journal**, v. 7, p. 308-313, 1965.

NINNI, L.; CAMARGO, M. S.; MEIRELLES, A. J. A. Water activity in poly(ethylene glycol) aqueous solutions. **Thermochimica Acta**, v. 328, p. 169-176, 1999.

OISHI, T.; PRAUSNITZ, J. M. Estimation of Solvent Activities in Polymer Solutions using a Group-Contribution Method. **Industrial Engineering Chemical Process Design and Development**, v. 17, p. 333-339, 1978.

OISHI, T.; PRAUSNITZ, J. M. Estimation of Solvent Activities in Polymer Solutions Using a Group-Contribution Method. **Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development**, v. 17, n. 3, p. 333-339, 1978.

OTHMER, D.; TOBIAS, P. Liquid-Liquid Extraction Data – The Line Correlation. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 34, p. 693-696, 1942.

PADILHA, C. E. A.; JÚNIOR, S. D. O.; SOUZA, D. F. S.; OLIVEIRA, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Partition coefficient prediction of Baker's yeast invertase in Aqueous Two-Phase Systems using Hybrid Group Method Data Handling Neural Network, **Chinese journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 652-657, 2017.

PATRÍCIO, P. R.; MAGESTE, A. B.; LEMOS, L. R.; CARVALHO, R. M. M.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H. Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO + organic salts + H<sub>2</sub>O and PPO + organic salts + H<sub>2</sub>O aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 305, p. 1-8, 2011.

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**, v. 64, p. 288–295, 2009.

PEREIRA, J.F.B., COUTINHO, J. A.P. Capítulo 5: Aqueous Two-Phase Systems, p. 157-182, Handbooks in Separation Science, 2020.

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

PERUMALSAMY, M.; MURUGESAN, T. Prediction of liquid–liquid equilibria for polyethylene glycol based aqueous two-phase system by ASOG and UNIFAC method. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 171-180, 2009.

PIMENTEL, J. G.; BICALHO, S. F.; GANDOLFI, O. R. R.; VERRÍSIMO, L. A. A.; CASTRO, S. S.; SOUZA, E. A.; VELOSO, C. M.; FONTAN, R. C. I.; SAMPAIO, V. S.; BONOMO, R. C. F. Evaluation of salting-out effect in the liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MgSO<sub>4</sub> at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 450, 1p. 84-193, 2017.

RENGIFO, A. F. C. **Determinação das forças motrizes de formação e Partição em sistemas aquosos bifásicos macromolécula + sal**. 2015. 89 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Viçosa, MG.

RENGIFO, A. F. C.; FERREIRA, G. M. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, M. C. H.; REZENDE, J. P.; PIRES, A. C. S.; DA SILVA, L. H. M. Driving forces for chymosin partitioning on the macromolecule-salt aqueous two-phase system. **Food and Bioprocess Processing**, v. 100, p. 361-371, 2016.

RENON, H.; J.M. PRAUSNITZ, "Local Compositions in Thermodynamic Excess Functions for Liquid Mixtures", **AIChE Journal**, v. 14 p. 135-144, 1968.

RITO-PALOMARES M. Practical application of aqueous two phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**, v. 25, p. 3–11, 2004.

ROBLES, P. A.; MORALES, J. W.; CISTERNAS, L. A. Modeling of liquid - liquid equilibrium for binary and ternary systems containing ionic liquids with the hexafluorophosphate anion using the ASOG method. **Fluid Phase Equilibria**, v. 429, p. 119-126, 2016.

RODRIGUES, C. E. COSTA.; GONÇALVES, C. B. Extração líquido-líquido. In TADINI, C. C.; TELIS, V. R. N.; MEIRELLES, A. J. A.; PESSOA FILHO, P. A. **Operações unitárias na indústria de alimentos**. Editora LTC, 210-248, 2016.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1-13, 2012.

SAMPAIO, D. A.; MAFRA, L. I.; YAMAMOTO, C. I.; ANDRADE, E. F.; DE SOUZA, M. O.; MAFRA, M. R.; CASTILHOS, F. Aqueous two-phase (polyethylene glycol + sodium sulfate) system for caffeine extraction: Equilibrium diagrams and partitioning study. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 98, p. 86-94, 2016.

SAMPAIO, V. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M.; SOUSA, R. C. S.; JÚNIOR, E. C. S.; FONTAN, R. C. I.; PIGNATA, M. C.; SANTOS, K. A.; GANDOLFI, O. R. R. Partitioning Behavior of Lysozyme and  $\alpha$ -lactalbumin in Aqueous Two-Phase System Formed by Ionic Liquids and Potassium Phosphate. **International Journal of Food Engineering**. DOI: <https://doi.org/10.1515/ijfe-2017-0274>, 2017.

SANTIAGO, R. S.; SANTOS, G. R.; AZNAR, M.; Liquid-liquid equilibrium in ternary ionic liquid systems by UNIFAC: New volume, surface area and interaction parameters. Part I. **Fluid Phase Equilibria**, v. 295, p. 93-97, 2010.

SANTOS, G. R. **UNIFAC-Campinas: Um novo modelo UNIFAC para a predição do Equilíbrio líquido-líquido**. 2005. 192 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

SANTOS, G. R.; SOUZA, D. C.; AZNAR, M. Liquid-Liquid Equilibria of Water + 1-Butanol + Amino Acid (Glycine or DL-Alanine or L-Leucine) at 313.15 K. **Journal of Solutions Chemistry**, v. 43, p. 2101-2116, 2014.

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 Biochem**, v. 43, p. 905-911, 2008.

SÉ, R. G. A.; AZNAR, M.; Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + peg 4000 + potassium phosphate at four temperatures: Experimental determination and

thermodynamic modeling. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 47, p. 1401-1405, 2002.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química, 7ª Ed. Editora LTC, 2007.

SOSA, F. H. B.; SAMPAIO, D. A.; FARIAS, F. O.; BONASSOLI, A. B. G.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Measurement and correlation of phase equilibria in aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol (2000, 4000, and 6000) and sulfate salts (manganese sulfate and copper sulfate) at different temperatures (298.15, 318.15, and 338.15 K). **Fluid Phase Equilibria**, v. 449, p. 68-75, 2017.

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.

SU, C.-K.; CHIANG, B. H. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 257-263, 2006.

TJERNELD, F.; JOHANSSON, H.-O. Compartmentalization of Enzymes and Distribution of Products in Aqueous Two-Phase Systems. **International Review of Cytoplasm**, v. 192, p. 137–151, 1999.

VENTURA, S. P. M.; SOUSA, 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. 879, p. 2679-2687, 2011.

WANG, Y.; WANG, J.; HAN, J.; HU, S.; YAN, Y. Liquid-liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of salting-out abilities of salts, **Central European Journal of Chemistry**, v. 8, p. 886-891, 2010.

WEAST, R. C. Handbook of Chemistry and Physics. 53rd ed.; Chemical Rubber Co.: 1972.

WILSON, G. M. Vapor-liquid equilibrium. XI. A new expression for the excess free energy of mixing. **Journal of American Chemical Society**. v. 86, p. 127-130, 1964.

WILSON, G.; DEAL, C. Activity coefficients and molecular structure. Activity coefficients in changing environments-solutions of groups. **Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 1, p. 20-23, 1962.

WU, Z.; HU, G.; WANG, K.; ZASLAVSKY, B. Y.; KURGAN, L.; UVERSKY, V. N.; What are the structural features that drive partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, p. 113-120, 2017.

YAN, W.; TOPPHOFF, M.; ROSE, C.; GMEHLING, J. Prediction of vapor-liquid equilibria in mixed-solvent electrolyte systems using the group contribution concept. **Fluid Phase Equilibria**, v. 162, p. 97-113, 1999.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMZEHZADEH, S. Effect of pH on the phase separation in the ternary aqueous system containing the hydrophilic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the kosmotropic salt potassium citrate at T = 298.15 K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 304, p. 110-120, 2011.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R.; HAMIDI, A. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and sodium citrate: experiment and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p. 149-155, 2004.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SHEKAARI, H.; JAFARI, P. Thermodynamic study of aqueous two-phase systems containing biocompatible cholinium aminoate ionic-liquids and polyethylene glycol-di-methyl ether 250 and their performances for bovine serum albumin separation. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 130, p. 17-32, 2019.

ZHENG, Z.; JIU, S.; CHEN, X.; CUI, P. Novel phase diagrams of aqueous two-phase systems based on 1,4-bis-(2-hydroxypropyl)-piperazine + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O: Equilibrium data and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 485, p. 128-134, 2019.