



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

OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO DE SISTEMAS AQUOSOS
FORMADOS POR PEG, SULFATO E ÁGUA E PARTIÇÃO DE ANTOCIANINA
DO JAMELÃO

ADA AZEVEDO BARBOSA

2013

ADA AZEVEDO BARBOSA

**OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO DE SISTEMAS AQUOSOS
FORMADOS POR PEG, SULFATO E ÁGUA E PARTIÇÃO DE ANTOCIANINA
DO JAMELÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), como parte integrante das exigências do programa de Pós-Graduação em Engenharia de alimentos, área de concentração em Engenharia de Processos de alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Prof^ª. **DSc.** Renata Cristina Ferreira Bonomo

Co-Orientadores:

Prof^ª. **DSc.** Cristiane Martins Veloso

Prof^º. **DSc.** Luis Antonio Minim

**ITAPETINGA – BAHIA
BRASIL
2013**

634.7
B195o

Barbosa, Ada Azevedo.

Obtenção de dados de equilíbrio de sistemas aquosos formados por PEG, sulfato e água e partição de antocianina do jamelão. / Ada Azevedo Barbosa. - Itapetinga: UESB, 2013.

74f.

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. Sob a orientação da Profa. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e co-orientação da Profa. D.Sc. Cristiane Martins Veloso e Prof. D.Sc. Luis Antonio Minim.

1. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) – Diagramas de fases. 2. Jamelão (fruta) - Partição de antocianina. 3. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) – Propriedades físicas - Temperatura. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Veloso, Cristiane Martins. IV. Minim, Luis Antonio. V. Título.

CDD(21): 634.7

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) – Diagramas de fases
2. Jamelão (fruta) - Partição de antocianina
3. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) – Propriedades físicas - Temperatura



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



Área de Concentração: Engenharia de Processos de Alimentos

Campus de Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO DE SISTEMAS AQUOSOS FORMADOS POR PEG, SULFATO E ÁGUA E PARTICIPAÇÃO DE ANTOCIANINA DO JAMELÃO.”

Autor: ADA AZEVEDO BARBOSA

Orientadora: Prof^a. Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.

Prof^a. Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB

Prof^a. Andrea Gomes da Silva, DSc., UESB

Prof. Marcelo Franco, DSc., UESC

Data da Realização: 22 de Fevereiro de 2013.

Praça Primavera, N° 40, Bairro Primavera – Telefone: (77) 3261-8629 - Fax: (77) 3261-8701
Itapetinga – BA CEP: 45.700-000 – e-mail: ppgeal.uesb@yahoo.com.br

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Aos meus pais, irmão e a Maycon Fagundes, pelo apoio e carinho dedicado em todos os momentos de minha vida;

À Professora Renata Bonomo, pela orientação, ensinamentos e pela paciência durante o desenvolvimento deste trabalho;

Às professoras Cristiane Martins Veloso, pela co-orientação

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UESB, pelos ensinamentos dedicados durante esse curso

Aos amigos e colegas discentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UESB, em especial, à Renata Santana, William Soares, Carol, Mariana Caldeira, Washington Maciel;

Aos pesquisadores do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP), pela amizade e conhecimento: Juliana Gomes, Laís Alves, Lucas Farias, Neura Mendes, Rafael Veneno, Silvana Bicalho, Washington Maciel, Gabriel Ramos, Melquesedeck Oliveira, Taline Amorim, Olga, Marina, Cristina Xavier, Vanessa Sampaio, Evaldo;

Em especial ao grupo de sistemas aquosos bifásicos- LEP, que tornou o melhor lugar do mundo melhor ainda: Juliana Gomes, Lucas Farias, Daniel;

À Márjorei Castro, amiga, por ter dividido ao longo deste mestrado as conquistas, as responsabilidades; as alegrias; as pouquíssimas tristezas;

A minha querida e doce família de Itapetinga: Márjorei Castro, Juliana Gomes;

Aos meus eternos amigos/ família: Daniela Souza; Elaine Felício; Bruno Veiga

A todos muito obrigada!!!!!!!!!!!!!!!

RESUMO

BARBOSA, A.A. obtenção de dados de equilíbrio de sistemas aquosos formados por PEG, sulfato e água e partição de antocianina do Jamelão. Itapetinga – BA: UESB, 2013.74p. (Dissertação– Mestrado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Processos de Alimentos)

Neste estudo, foram determinados 16 diagramas de fases, com cinco linhas de amarração em cada diagrama, para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polímero de polietileno glicol (PEG), sal inorgânico e água. Os dados de equilíbrio foram formados para os sistemas PEG 1500+ sulfato de sódio + água; PEG 2000 + sulfato de sódio + água; PEG 4000 + sulfato de Sódio + água; PEG 6000 + sulfato de sódio + água nas temperaturas 20, 30, 40 e 50 °C, em pH 2. Não houve efeito significativo da temperatura sobre a região bifásica, o que indica pequena contribuição entálpica no processo de separação de fases. Entretanto o efeito da temperatura promove o aumento da inclinação da linha de amarração, em razão da transferência de moléculas de água da fase superior para a inferior. Com relação ao efeito da massa molar do polímero, observou-se que o aumento da massa molar leva a um aumento da região bifásica do diagrama de fases. Na determinação das propriedades físicas dos sistemas estudados, pôde-se observar que o aumento da concentração aumentava a viscosidade e o índice de refração; já em relação à temperatura, diminuía a viscosidade, índice de refração e densidade. Os coeficientes de partição da antocianina foram investigados em função da massa molar do polímero e o comprimento da linha de amarração. A partição foi feita com os seguintes sistemas: PEG 1500+ sulfato de sódio+água, PEG 2000+ sulfato de sódio+água, PEG4000+ sulfato de sódio+água, PEG 6000+ sulfato de sódio+água na temperatura de 20 °C e 40 °C. Nos sistemas que ficaram na temperatura de 20 °C, pôde-se verificar que o aumento da massa molar do polímero promoveu o decréscimo do coeficiente de partição da antocianina. Entretanto, a antocianina submetida aos sistemas com temperatura de 40 °C teve uma degradação apresentando uma coloração amarelada.

Palavras-chave: Binodais, pH, temperatura, diagrama de fase, partição

*Orientadora: **DSc.** UESB. Renata Cristina Ferreira Bonomo; Co-orientadores: **DSc.** UESB. Cristiane Martins Veloso; **DSc.** UFV, Luis Antonio Minim

ABSTRACT

BARBOSA, A. A. data acquisition balance consisting of aqueous systems PEG, sodium sulfate and water partition Jamelão anthocyanin. Itapetinga - BA: UESB, 2013.74p. (Dissertation - Master in Food Engineering - Food Process Engineering)

In this study, 16 were determined phase diagram with five mooring lines in each diagram to aqueous two phase systems (ABS) polymer composed of polyethylene glycol (PEG), inorganic salt and water views equilibrium data were formed to systems formed by PEG 1500 + water + sodium sulphate, PEG 2000 + water + sodium sulphate, PEG 4000 Sodium Sulphate + water +; + PEG 6000 + sodium sulfate water at 20, 30, 40 and 50 ° C in pH 2. No significant effect of temperature on the two-phase region, indicating small enthalpic contribution in the process of phase separation. However, the effect of temperature promotes the increased slope of the mooring line due to the transfer of water molecules from the upper layer to the lower. With respect to the effect of polymer molecular weight, it was observed that the increase of the molecular weight leads to an increase of the biphasic region of the phase diagram. In determining the physical properties of the systems studied, one could observe that increasing the concentration increased the viscosity and refractive index, whereas at different temperatures, decreased viscosity, refractive index and density. The partition coefficients of the anthocyanin were investigated as a function of polymer molecular weight and the length of the mooring line. The partition was made with the following systems: PEG 1500 + sodium sulphate + water, PEG 2000 + sodium sulphate + water PEG4000 + sodium sulphate + water, PEG 6000 + sodium sulphate + water at 20 ° C and 40 ° C. In systems that were at the temperature of 20 ° C, it was observed that increasing the molecular weight of the polymer promoted the decrease of the partition coefficient of anthocyanin. However, the anthocyanin systems subjected to a temperature of 40 ° C had a degradation presenting a yellowish.

Keywords: binodal, pH, temperature, phase diagram, partition

*Orientadora: **DSc.** UESB. Renata Cristina Ferreira Bonomo; Co-orientadores: **DSc.** UESB. Cristiane Martins Veloso; **DSc.** UFV, Luis Antonio Minim.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática de um diagrama de fase retangular
- Figura 2:** Representação plana parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema
- Figura 3:** Estrutura de antocianinas de ocorrência natural
- Figura 4:** Transformações estruturais das antocianinas em função do pH
- Figura 5:** Diagrama de fase nas temperaturas 20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C, pH 2. a) PEG 1500+ Sulfato de Sódio+ água, b) PEG 2000+ Sulfato de Sódio+ água; c) PEG 4000+ Sulfato de Sódio+ água; d) PEG 6000+ Sulfato de Sódio+ água
- Figura 6** Relação linear entre o CLA x Sal x PEG a 20°C
- Figura 7** Relação linear entre o CLA x Sal x PEG a 30°C
- Figura 8** Relação linear entre o CLA x Sal x PEG a 40°C
- Figura 9** Relação linear entre o CLA x Sal x PEG a 50°C
- Figura 10:** Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração PEG1500: a) temperatura de 20°C e 30 °C e b) temperatura de 40°C e 50°C
- Figura 11:** Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração PEG 2000: a) temperatura de 20 °C e 30 °C e b) temperatura de 40 °C e 50 °C
- Figura 12:** Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração PEG 4000: a) temperatura de 20°C e 30 °C e b) temperatura de 40°C e 50 °C
- Figura 13:** Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração PEG 6000: a) temperatura de 20 °C e 30 °C e b) temperatura de 40 °C e 50 °C
- Figura 14:** Efeito da massa molar do polímero no sistema na temperatura 20 °C
- Figura 16:** Efeito da massa molar do polímero no sistema na temperatura 40 °C
- Figura 17:** Efeito da massa molar do polímero no sistema na temperatura 50 °C
- Figura 18:** Efeito da massa molar no sistema de PEG 1500 E PEG 2000 na temperatura de 30 °C
- Figura 19:** Efeito da massa molar no sistema de PEG 4000 E PEG 6000 na temperatura de 30 °C
- Figura 20:** Foto da partição da antocianina no sistema formado por PEG1500+sulfato de sódio+ água pH 2: a) temperatura de 20 °C; b) temperatura de 40 °C.
- Figura 21:** Coeficiente de partição (K) da antocianina em função do CLA dos SABs formados por PEG1500+sulfato de sódio + água, PEG 2000+sulfato de sódio + água

PEG 4000+sulfato de sódio + água, PEG 6000+sulfato de sódio + água na temperatura de 20°C, pH 2

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Exemplos de sistemas aquosos bifásicos

Tabela 2: Sistemas aquosos bifásicos formados por PEG e sal, utilizados na separação de biomoléculas

Tabela 3: Antocianidinas naturais de maior ocorrência

Tabela 4: Composições globais para os sistemas formados por PEG 1500+ sulfato de sódio, expressas em porcentagem mássica (%m/m)

Tabela 5: Composições globais para os sistemas formados por PEG 2000+ sulfato de sódio, expressas em porcentagem mássica (%m/m)

Tabela 6: Composições globais para os sistemas formados por PEG 4000+ sulfato de sódio, expressas em porcentagem mássica (%m/m)

Tabela 7: Composições globais para os sistemas formados por PEG 6000+ sulfato de sódio, expressas em porcentagem mássica (%m/m)

Tabela 8: Frações mássicas (%m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500g/mol, sulfato de sódio e água, pH 2

Tabela 9: Frações mássicas (%m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 2000g/mol, sulfato de sódio e água, pH 2

Tabela 10: Frações mássicas (%m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000g/mol, sulfato de sódio e água, pH 2

Tabela 11: Frações mássicas (%m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 6000g/mol, sulfato de sódio e água, pH 2

Tabela 12: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração para o sistema PEG

Tabela 13: Densidade, índice de refração e viscosidade para sistemas compostos por PEG1500+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas

Tabela 14: Densidade, índice de refração e viscosidade para sistemas compostos por PEG 2000+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas

Tabela 15: Densidade, índice de refração e viscosidade para sistemas compostos por PEG 4000+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas

Tabela 16: Densidade, índice de refração e viscosidade para sistemas compostos por PEG 6000+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas

Tabela 17: Coeficientes de partição e recuperação teórica da antocianina e CLA nos sistemas PEG1500+sulfato de sódio + água, PEG 2000+sulfato de sódio + água PEG 4000+sulfato de sódio + água PEG 6000+sulfato de sódio + água na temperatura de 20 °C, pH 2

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- SAB – Sistema aquoso bifásico
- PEG – Polietileno Glicol
- A – Composição global
- LB – Linha Binodal
- FI – Fase Inferior
- FS – Fase Superior
- LA – Linha de Amarração
- CLA – Comprimento da Linha de Amarração
- ILA – Inclinação da Linha de Amarração
- C_{PS} – Composição do Polímero na Fase Superior
- C_{PI} – Composição do Polímero na Fase Inferior
- C_{SS} - Composição do Sal na Fase Superior
- C_{SI} – Composição do Sal na Fase Inferior
- CP – Ponto Crítico
- ρ – Densidade
- η – Viscosidade
- N_d – Índice de refração

Sumário

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO GERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
REVISÃO DE LITERATURA	3
Extração líquido - líquido.....	3
Sistemas Aquosos Bifásicos.....	3
Diagrama de fase.....	6
Componentes do sistema.....	9
Polietileno glicol (PEG) e sal	9
Fatores que influenciam no diagrama de fases.....	10
Efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases	10
Efeito da massa molar do polímero sobre o equilíbrio de fases	12
Propriedades termofísicas dos sistemas aquosos bifásicos	12
Densidade.....	13
Viscosidade	14
Índice de Refração.....	14
Coeficiente de Partição.....	15
Aplicação dos Sistemas Aquosos Bifásicos na separação de biomoléculas.....	16
Antocianinas.....	17
Fatores que influenciam a cor e a estabilidade de antocianinas	18
Propriedades antioxidantes das antocianinas	21
Jamelão.....	22
MATERIAL E MÉTODOS	24
Preparo do Sistema Aquoso Bifásico	24
Determinação dos dados de equilíbrio	26
Coleta das fases	26
Medida de volume das fases.....	27
Quantificação do teor de polietileno glicol	27

Quantificação do teor de água.....	28
Quantificação do teor de sal.....	28
Massa específica.....	28
Viscosidade	28
Índice de refração.....	29
Partição do extrato antocianico	30
Quantificação das antocianinas totais.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
Propriedades físicas.....	47
Partição da antocianina do jamelão	52
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

INTRODUÇÃO

As antocianinas são pigmentos bastante instáveis, que, apesar de existirem em vários vegetais e frutas, como uva, jabuticaba, morango, amora, jamelão, azeitona, figo, ameixa e outros, poucas frutas e verduras se apresentam como fonte comercial, por isso a busca de fontes que apresentem baixo custo e formas de estabilizar esse pigmento tem estimulado estudos nessa área. O jamelão é uma fruta que apresenta um alto teor de antocianina, tornando-se viável de extração.

Existem métodos de extração líquido-líquido da antocianina. No entanto, um problema para a utilização desse pigmento em alimentos é a possibilidade da presença de resíduo de éter de petróleo, que é utilizado no processo de extração e purificação com a finalidade de remover as clorofilas. Esse fato gera a necessidade de buscar novas tecnologias para o processo de separação e purificação das antocianinas, que, além de preservarem intactas as suas propriedades, levem à obtenção de produtos que não acarretem problemas à saúde humana e sejam economicamente viáveis.

Entre os processos existentes para a separação de compostos de origem biológica, vem se destacando uma ramificação da extração líquido-líquido chamada extração por Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs). Esse processo tem como princípio a utilização de duas fases aquosas imiscíveis, que podem ser obtidas pela adição de duas soluções aquosas de dois polímeros hidrófilos naturais ou sintéticos ou de uma solução polimérica e uma solução salina. Portanto, a separação e purificação das biomoléculas são realizadas em ambiente adequado e em condições amenas, já que as fases de um SAB são compostas, em sua maioria, de água (70% a 90%), o que favorece seu uso na extração de compostos de origem biológica e a sua estabilidade (ALBERTSSON, 1986).

Os dados de equilíbrio para os sistemas de polietileno glicol e sulfato de sódio estão disponíveis na literatura (ANATHAPADMANABHAN e GODDARD, 1987; SNYDER et al., 1992; SALABAT, 2001; FERREIRA e TEIXEIRA; 2011; LEMOS et al., 2011). Como não foram encontradas referências de estudos sobre sulfato de sódio nas temperaturas (20, 30, 40, 50)°C no pH 2, é necessário estudar sistemas com pH baixo na partição de antocianinas pela estabilidade dessa molécula.

OBJETIVO GERAL

Estudar o comportamento dos sistemas de duas fases constituídos por polímero e polieletrólito e avaliar as condições para sua aplicação na extração de antocianinas do jamelão.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter dados de equilíbrio dos sistemas compostos por polietileno glicol e sal no pH 2.
- Conduzir estudos para determinar as propriedades físicas de densidade, viscosidade, índice de refração do sistema aquoso bifásico estudado em diversas concentrações de polímeros e em uma ampla faixa de temperatura.
- Estudar a partição das antocianinas do jamelão no sistema de duas fases aquosas constituído por polímero e polieletrólito.

REVISÃO DE LITERATURA

Extração líquido-líquido

Muitos pares de espécies químicas, quando misturados numa certa faixa de composições para formar uma única fase líquida, podem não satisfazer o critério de estabilidade e, conseqüentemente, se dividirem em duas fases líquidas com composições diferentes. Se as fases estão em equilíbrio termodinâmico, o fenômeno é um exemplo de equilíbrio líquido-líquido, que é importante em muitas operações industriais, como a extração com solventes (SMITH, 2000).

A extração líquido-líquido se fundamenta na separação de componentes de uma solução submetida ao contato direto com um líquido imiscível ou parcialmente miscível (solvente). O contato direto causa uma distribuição desigual dos compostos nos dois líquidos. Conseqüentemente ocorre um fluxo de massa dos solutos entre as fases formadas. Quando o equilíbrio é atingido, cada uma das fases conterá concentrações diferentes dos componentes (FOUST et al., 1982).

Portanto, os métodos de extração líquido-líquido baseiam-se principalmente em propriedades de superfície e são os mais clássicos, talvez, os mais difundidos em química orgânica nas várias escalas (ALBERTSSON, 1960). Esta operação também é vital na separação e purificação de biomoléculas, como proteínas, enzimas, vitaminas, uma vez que elas são muito sensíveis às condições do meio, principalmente pH e temperaturas altas (KULA et al., 1982; HATTI-KAUL, 2001).

Uma variante da extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a partição em SAB, a qual vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros biocompostos. Uma das principais vantagens do SAB é o ambiente aquoso, que oferece condições adequadas à distribuição das biomoléculas, tais como as proteínas, nas fases, sem que ocorram mudanças na sua conformação e conseqüente perda de atividade biológica (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

Sistemas aquosos bifásicos

O Sistema Aquoso Bifásico (SAB) foi descoberto, em 1896, por Beijerinck, que, ao misturar soluções aquosas de amido e gelatina ou ágar-ágar e gelatina, percebeu que o sistema resultante apresentava uma turbidez característica e que, ao permanecer em

repouso, separava-se em duas fases espontaneamente. Além disso, constatou que a fase superior era rica em gelatina, e a fase inferior, em ágar (ou amido). Posteriormente, estudos realizados por Ostwald e Hertel (1929) constataram que amidos de diferentes fontes geravam diagramas de fases distintas. Esta descoberta permitiu concluir que pequenas variações nas interações moleculares têm influência sobre as composições das fases em equilíbrio. Em 1947, Dobry e Boyer-Kawenoki concluíram que o processo de separação de fases poderia ser obtido pela combinação de vários tipos de polímeros.

Em 1956, Albertsson estudou um processo de separação/purificação de materiais de origem biológica usando SABs compostos por soluções aquosas de polietileno glicol e dextrana. Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SABs uma ferramenta na partição e concentração de diversos tipos de solutos, como organelas celulares (BANIK et al., 2003; SANTESSON et al., 2004), proteínas (HAGHTALAB et al., 2003), DNA (EVERBERG et al., 2006), nanopartículas (ALEJANDO et al., 2007), íons (DA SILVA et al., 2006; DA SILVA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008) e corantes (AKAMA et al., 1999; MAGESTE et al., 2009).

Em um sistema aquoso bifásico, quando as espécies químicas (polieletrólitos, polímeros, líquidos iônicos, entre outras) são misturadas em determinadas composições e temperatura dividem-se em duas fases de composições diferentes, que se encontram em equilíbrio termodinâmico. As fases apresentam propriedades termodinâmicas intensivas, como índice de refração, composição e densidade. Mas quando as duas fases do SAB estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica varia em uma dimensão temporal, ou, ainda, não existe troca resultante de matéria e energia entre as fases. Essas fases são separadas por uma interface, que é a região onde as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo ao valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO et al., 2007).

Um dos fatores que conferem a utilização do SAB na partição de biomoléculas é a baixa tensão interfacial, quando comparada àquela existente entre uma fase aquosa e outra não aquosa. Isto ocorre por ser a água o componente majoritário do sistema aquoso bifásico. A água se encontra presente em maior quantidade nas três regiões do SAB (fase superior, fase inferior, interface). Sendo assim, a composição das fases é muito parecida; há uma pequena diferença entre a energia livre de Gibbs e, portanto, um pequeno valor de tensão interfacial.

Os SABs podem ser obtidos pela combinação de dois polímeros hidrossolúveis, que apresentam estruturas quimicamente diferentes, ou pela mistura de um polímero e um sal (orgânico ou inorgânico) e, mais recentemente, pela mistura de líquidos iônicos e sais inorgânicos. Alguns exemplos de SABs estão listados na Tabela 1.

Para que haja a separação de fases entre duas soluções aquosas de polímeros, é necessário que a energia de Gibbs do sistema seja minimizada, e isso ocorre quando os polímeros estão em fases distintas. Neste caso, a interação das moléculas dos dois polímeros distintos é de caráter repulsivo, ocasionando um estado energeticamente favorável quando ocorre a separação das fases (ALBERTSSON, 1960).

Em relação à formação de duas fases em sistemas constituídos por polímeros, sal e água, isso se deve também à agregação dos íons do sal de forma a liberar as moléculas de água das camadas de solvatação e aumentar a entropia do sistema (MACHADO, 1999).

Todos os tipos de SABs podem ser empregados na separação de biomoléculas, todavia, para uso em escala industrial, a dextrana apresenta um custo elevado. Os sistemas PEG/sais apresentam vantagens em relação aos sistemas compostos por polímeros-polímeros-água pelo custo reduzido, menor tempo de separação de fases e propriedades físicas favoráveis à operação em larga escala, como elevada seletividade e diferenças de densidade, viscosidade entre as fases adequadas para o trabalho com equipamentos de extrações disponíveis no mercado. Assim, os sistemas PEG e sal têm sido usados para a extração, uma vez que podem ser formados à temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG, e a fase inferior, rica em sal. A separação das fases é atingida mais rapidamente em virtude da menor densidade da fase salina em relação à fase polimérica, o que facilita o uso de sistemas polímeros-sal em aplicações industriais (SALABAT, 2001; HUSTED et al., 1985). Entretanto, para aplicar os sistemas aquosos bifásicos ao estudo de partição de biomoléculas é importante que se conheça previamente seus diagramas de fases. Esses diagramas representam graficamente a composição na qual se formam duas fases líquidas em equilíbrio termodinâmico.

Tabela 1: Exemplos de sistemas aquosos bifásicos.

Polímero ¹	Polímero ¹
Polipropileno Glicol	Polietileno Glicol (PEG) Dextrana (Dx) Polivinil álcool (PVA) Maltodextrina (MD)
Polietileno glicol	Dextrana (Dx) Polivinil álcool (PVA) Maltodextrina (MD) Hidroxipropil-amido (HPS)
Polímero ¹	Componente de baixa massa molar ¹
Polietileno Glicol e copolímeros	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₂ CO ₂ NH ₄ , Na ₂ HPO ₄ , K ₂ CO ₃ , Na ₂ SO ₄ , LiSO ₄ , FeSO ₄
Polietileno Glicol	Glicose , maltose
Líquido iônico ²	Eletrólito ²
Methylimidazolium chloride Ethyl imidazolium chloride	K ₃ PO ₄

Fonte: ZASLAVSKY, 1995¹; Louros, 2009 ²

Diagrama de fase

Os diagramas de fases ou diagrama de equilíbrio é uma representação gráfica das composições de cada uma das fases do SAB, podendo ser de forma triangular ou retangular. A Figura 1 apresenta a forma retangular de um sistema aquoso bifásico formado por um polímero e um sal inorgânico.

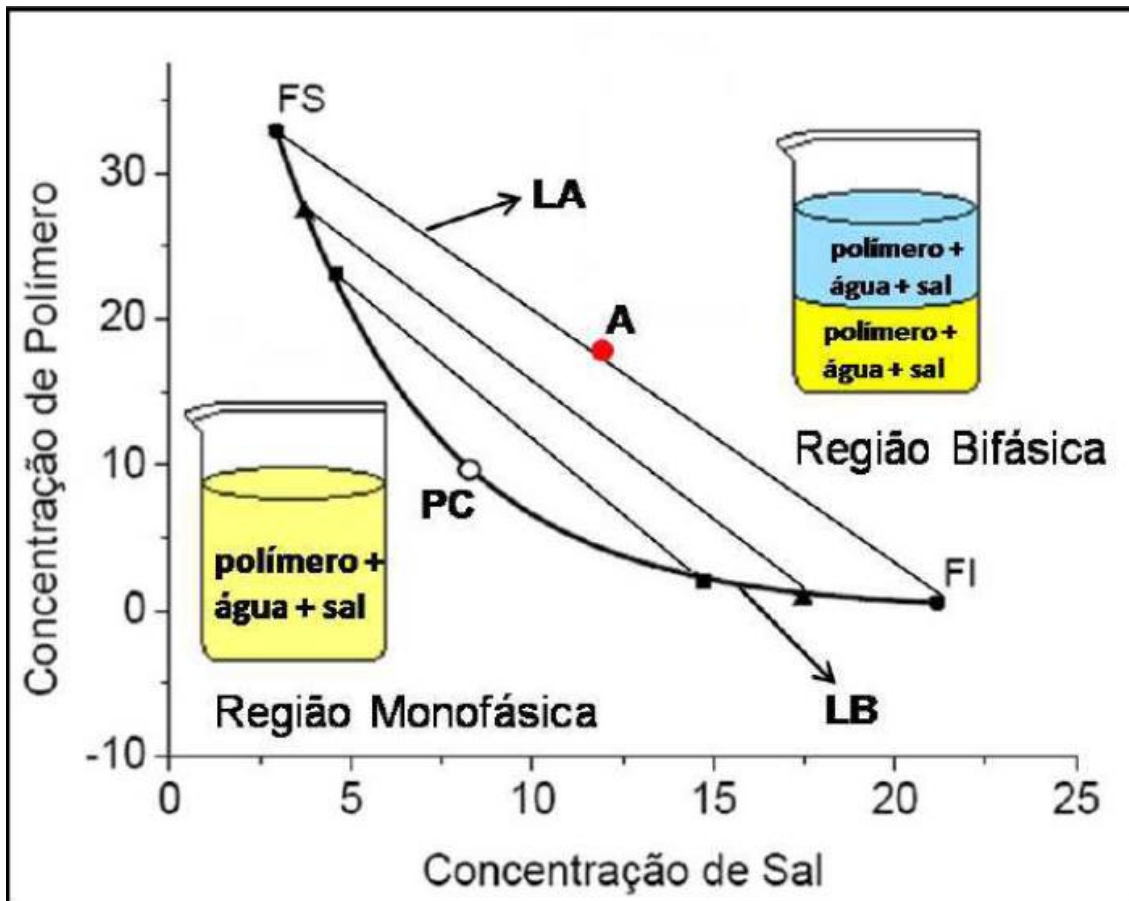


Figura 1: Representação esquemática de um diagrama de fase retangular.

Fonte: Brito; 2007.

Os diagramas de fase podem ser expressos por diversas unidades, porém é comum expressá-los em percentuais mássicos (% m/m). Os eixos cartesianos denotam as composições de polímero e sal. Convencionalmente, para SAB formado por polímero+sal+água, o eixo das abscissas refere-se à concentração de sal, e o eixo das coordenadas, à concentração de polímero.

Neste diagrama, encontram-se informações fundamentais para o entendimento e a aplicação do SAB, tais como as composições globais (A), as composições da fase superior e inferior. A linha binodal (LB) corresponde às mínimas composições de equilíbrio, nas quais o sistema se apresenta com duas fases, e sua posição no diagrama pode variar com a hidrofiliicidade/hidrofobicidade, a massa molar média do polímero, a natureza química do sal, a temperatura, a pressão e o pH do meio (MARTINS et al., 2009). Existem distintos métodos para a obtenção da linha binodal, entretanto o mais utilizado envolve titulação turbidimétrica e análise das composições das fases (ZASLAVSKY, 1995).

Na Figura 1, o diagrama pode ser dividido basicamente em duas regiões: na região situada acima da linha binodal, ocorre a formação de duas fases; e abaixo dessa linha, o sistema se mantém homogêneo (BRITO, 2007). A binodal determina os pontos de máxima composição em que um sistema permanece unifásico e representa a composição das fases superiores e inferiores de uma determinada Linha de Amarração (LA). A linha de amarração é uma reta que liga pontos no diagrama, que representam a composição das duas fases em equilíbrio termodinâmico, e é limitada pelo ponto F_s , que expressa a composição da Fase Superior, e pelo ponto F_I , que representa a composição da Fase Inferior. Quaisquer pontos que pertençam à região bifásica e estejam na mesma linha de amarração terão as mesmas propriedades termodinâmicas intensivas (densidade, volume molar, entalpia molar etc.), porém sendo distintas as variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume etc.). O mesmo raciocínio aplica-se para as fases inferiores formadas por composições globais localizadas sobre a mesma linha de amarração (ZASLAVSKY, 1995; DA SILVA E LOH, 2006).

O Comprimento da Linha de Amarração (CLA) é um parâmetro termodinâmico que é utilizado para medir as propriedades intensivas entre as fases. Quanto maior o valor do CLA, maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases e maior será a eficiência na extração e/ou partição de soluto de interesse no SAB (SANTOS, 2012). O valor do CLA pode ser calculado em função das diferenças de concentrações dos componentes nas fases, conforme Equação (1):

$$CLA = [(C_{ps} - C_{PI})^2 + (C_{ss} - C_{si})^2]^{0,5} \quad (1)$$

em que C_{ps} e C_{PI} são as concentrações de polímeros na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto C_{ss} e C_{si} são as concentrações do sal na fase superior e inferior, respectivamente. À medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composições entre as fases.

A Inclinação da Linha de Amarração (ILA) é uma característica importante em um diagrama de equilíbrio, pois é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química, como a temperatura e a massa molar, por exemplo. O valor da inclinação pode ser calculado pela Equação 2,

$$ILA = (C_{ps} - C_{PI}) / (C_{SS} - C_{SI}) \quad (2)$$

em que C_{ps} e C_{PI} são as concentrações de polímeros na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto C_{SS} e C_{SI} são as concentrações do sal na fase superior e inferior, respectivamente. Este parâmetro apresenta-se atualmente como uma característica importante dos diagramas de fases uma vez que o seu valor é geralmente constante, quando está presente um SAB de polímeros (ALBERTSSON, 1986).

O Ponto Crítico (PC) é outra relação no diagrama de fases. Este ponto é aquele no qual as propriedades físico-químicas, composição e volume, entre outras, das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1960; DA SILVA et al., 2006). Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases, e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

Componentes do sistema

Polietileno glicol (PEG) e sal

O polímero denominado polietileno glicol (PEG) ou poli(óxido) de etileno (PEO), $HO-(CH_2-CH_2-O)_n-H$, Figura 2, é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico, que constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes (MURRELL e JENKINS, 1994). Esse polímero é obtido pela polimerização do óxido de etileno (EO) por meio de indicadores básicos, ácidos ou de metais (Li, Na, Mg) (BAILEY et al. 1991). O PEG está disponível no mercado em diversas massas molares que podem ultrapassar 1×10^6 g/mol.

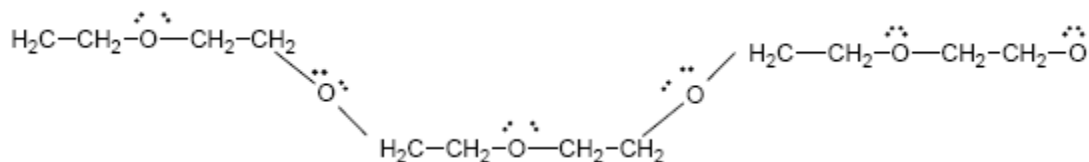


Figura 2: Representação plana parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.

O polietileno glicol é mais utilizado para separação de biomoléculas e íons metálicos, pois tem baixo custo em relação aos outros polímeros e é atóxico, mantendo-se dentro dos princípios da química verde (MARTINS et al., 2008). O PEG foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), sendo considerado não antigênico nem imunogênico. Estas características têm permitido a larga utilização de PEG e seus derivados em cosméticos, sabões e medicamentos. É importante destacar que, na indústria de alimentos, é regulamentada a sua utilização como veículo em adoçantes de mesa e em suplementos vitamínicos ou minerais (BRASIL, 2005). Pode ser empregado na separação de macromoléculas biológicas por meio da extração líquido-líquido e da precipitação. Pode ser considerado o melhor agente precipitante na produção de cristais de proteínas, etapa decisiva na determinação da sua estrutura molecular (ANNUNZIATA et al., 2002).

A maioria dos polímeros sintéticos é composta por moléculas que contêm centenas ou milhares de grupos de átomos interligados chamados unidades. A macromolécula de PEG é formada por apenas um tipo de unidade repetida e, por isso, é chamada homopolímero; quando é formada por mais de um tipo de unidade repetida é chamada copolímero (MURRELL e JENKINS, 1994). Em seu estado cristalino, a cadeia de polietileno glicol apresenta conformação helicoidal contendo sete unidades químicas (-CH₂CH₂-O-) e duas rotações em torno da cadeia a cada 19,3 Å (URBAN, 1993).

O sulfato de sódio (Na₂SO₄) é um sal branco, cristalino, com solubilidade em água de 16,86 g/100 mL a 18 °C. Apresenta pH entre 5,2 e 9,2 a 20 °C quando em solução de 50 g/L de sulfato de sódio em água (MERCK, 2004). Tem larga aplicação industrial, em particular nas indústrias têxtil, de papel, detergente e vidro.

Fatores que influenciam no diagrama de fases

No processo de separação de fases dos diagramas em sistemas aquosos bifásicos, a região bifásica é fortemente afetada por diversos fatores, como temperatura, massa molar do polímero, sal formador.

Efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases

A literatura reporta que o aumento da temperatura pode provocar o aumento da região bifásica em diagramas do tipo polímero + sal (MURUGESAN e

PERUMALSAMY, 2005; JAYAPAL et al., 2007; AMARESH et al., 2008; REGUPATHI et al., 2009). A relação entre o aumento da temperatura e o aumento da região bifásica está associada ao fato de que o processo de separação é endotérmico. Entretanto, vários artigos mostram que a temperatura pode ter um efeito tão pequeno, que, do ponto de vista estatístico, não há diferença entre as curvas binodais (MARTINS et al., 2008).

O efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases também é analisado quanto às propriedades termodinâmicas entalpia e entropia (CARVALHO et al., 2007). Para a análise entálpica desse processo, deve-se inicialmente considerar o efeito da temperatura na constante de equilíbrio (K) da reação de formação da interação sal-PEG após a saturação do polímero (Equação 3). Segundo DA SILVA e LOH (2000), na interação entre os íons do sal e o polímero, na formação do SAB, ocorre a absorção de energia, ou seja, esta interação é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura favorece a formação dos produtos e aumenta a intensidade da interação sal-PEG.



Sendo que:

$$K = \frac{[sal - PEG]}{[sal] \times [PEG]}$$

Dessa maneira, a interação sal-PEG levaria ao aumento na quantidade de sal a ser adicionada ao sistema para que ocorresse a formação do sistema aquoso bifásico. O aumento da temperatura leva à diminuição da quantidade de sal e consequente aumento da região bifásica do diagrama de equilíbrio. Assim, deve-se analisar a influência da temperatura quanto à entropia. No momento em que a energia na forma de calor é fornecida ao sistema e sua temperatura aumenta, a energia interna aumenta, elevando a energia cinética média das moléculas. Desse modo, as moléculas estão mais livres para se movimentarem na solução, aumentando também a entropia configuracional.

O aumento da temperatura também pode fazer com que a transferência de água da fase superior para a fase inferior seja maior e, dessa forma, o volume das fases se altera. O aumento da temperatura causa o aumento da hidrofobicidade da fase e, assim, há exclusão de moléculas de água de solvatação do polímero, de modo a transportá-las para fase mais hidrofílica. A temperatura também afeta a inclinação da linha de

amarração. Este fato é consequência da transferência de moléculas de água (MARTINS et al., 2008).

Graber et al. (2004), estudando o efeito das temperaturas de 5 °C, 25 °C e 45 °C em sistemas PEG 4000+ sulfato de lítio+água, observaram que o aumento da temperatura provoca o deslocamento da curva binodal, aumentando a região bifásica, o que implica numa menor concentração do sal e do polímero necessários para a formação do sistema aquoso bifásico. Resultado semelhante foi obtido por Regupathiet al. (2011), quando investigaram a influência da temperatura (25, 30, 35, 40, 45) °C em sistemas aquosos PEG+ citrato de amônio+ água, e por Zafarani-Moattar et al. (2004), que estudaram a influência da temperatura no equilíbrio de fases de sistemas compostos por PEG 6000, citrato de sódio e água.

Efeito da massa molar do polímero sobre o equilíbrio de fases

Estudos mostram que o número de monômeros da macromolécula afeta diretamente a área em que o sistema permanece com duas fases. O aumento da massa molar do polímero promove a ampliação da área bifásica, o que foi observado inicialmente por Albertsson (1960); em relação à formação do SAB, quanto maior a massa molar do polímero, menor será a concentração de sal (ou do outro componente constituinte do sistema) requerida para que ocorra a separação de fases. Este comportamento é observado tanto para sistemas polímero-polímero-água, quanto para sistemas polímero-sal-água.

Zafarani-Moattar e Sadeghi (2001) estudaram o efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais para o sistema PEG + NaH₂PO₄ + água, a 25 °C e verificaram que o aumento da massa molar do PEG provocou o deslocamento das curvas binodais para menores concentrações de PEG e sal. Resultados semelhantes também foram obtidos por Voros et al. (1993); Tubío et al. (2006); Oliveira et al.(2001); Graber et al. (2001), para sistemas aquosos contendo polietilenoglicol e sais. Esse efeito ocorre pela redução da solubilidade do PEG em água, com o aumento da massa molar do PEG.

Propriedades termofísicas dos sistemas aquosos bifásicos

A preparação do SAB e do processo de extração envolve basicamente as operações unitárias de mistura, dispersão e separação. Portanto, propriedades físicas, tais como viscosidade, densidade e índice de refração, são importantes na formação e no

tipo de aplicação de um SAB. Sistema tipo polímero-polímero tende a apresentar fases mais viscosas do que o sistema polímero e sal (MACHADO, 1999). Os sistemas com baixa massa molecular estão associados à baixa viscosidade da fase polimérica, e o tempo que o sistema leva para entrar em equilíbrio é pequeno.

Densidade

A densidade é uma propriedade termodinâmica intensiva, pois não depende da quantidade de massa presente no sistema e pode ser representada pela seguinte relação (LEVINE, 2011), Equação 4:

$$\rho = m/v \quad 4$$

Onde: ρ = densidade; m = massa; v = volume

A densidade é influenciada pela temperatura, logo se trata de uma propriedade termofísica. Vários autores demonstraram que o aumento da temperatura contribui para a redução da densidade de sistemas com mais de um componente (MORÁVKOVÁ et al., 2011; ZHOU et al., 2010; KU e TU, 2005).

O conhecimento das propriedades volumétricas de soluções aquosas contendo macromoléculas e eletrólitos é de extrema importância na pesquisa de SAB. A compreensão das interações que envolvem soluto-solvente e soluto-soluto, mostrando como se encontra o estado conformacional da molécula de polímero na solução, possibilita estimar o comportamento de um sistema aquoso bifásico. Medidas de densidades são relatadas por alguns autores na literatura, entre eles: Rahbari-Sisakht et al. (2003) determinaram as densidades de misturas binárias compostas por polietileno glicol (massa molar 200, 300 e 6000), dissolvida em água e etanol nas temperaturas de (20, 35, 40, 45, 55, 60 e 65) °C. Nesse estudo, concluíram que as densidades do PEG 6000+água a 20 °C eram mais altas do que a 65 °C e que o aumento da massa molar do polímero influenciava linearmente no aumento da densidade. Entretanto, se fixasse uma temperatura e variasse o solvente no caso PEG 300+ água ou etanol, onde houve maiores valores de densidade foi nas amostras de PEG 300+água. Zafarani-Moattar et al. (1995) determinaram a densidade de várias soluções binárias compostas por PEG 1000+ água e PEG 6000+ água nas temperaturas de (25, 35, 45) °C e de misturas ternárias compostas por PEG 1000+ sal+ água e PEG 6000+ sal+água com diferentes

sais nas mesmas temperaturas. Observaram que, mantendo a temperatura constante das soluções binárias e aumentando a massa molar do polímero, aumentava-se a densidade, enquanto aumentando a temperatura e a variação da concentração desses compostos ocorria uma diminuição da densidade. Zafarani-Moattar e Mehrdad (2000) determinaram a densidade de soluções aquosas de sistemas PEG + Sal nas temperaturas de 25 °C, 35 °C, 45 °C. Nos estudos, utilizaram PEG de massa molar 2000 e 4000 e os sais (NaHSO₄, NaHPO₄, Na₂HPO₄). Com os resultados obtidos, concluíram que, conforme aumentava a concentração do sal, aumentava a densidade e, conforme aumentava a temperatura, diminuía a densidade. Com relação ao PEG, conforme aumentava a concentração, aumentava a densidade e, conforme aumentava a temperatura, diminuía a densidade.

Viscosidade

Segundo Gunduz (1996), a viscosidade das fases é uma variável importante para projeto de equipamentos, pois influencia diretamente nos processos de transferência de massa. São poucos os dados dessa propriedade relatados na literatura de sistemas aquosos bifásicos.

Machado (1999), estudando sistemas formados por PEG/maltodextrina, constatou que a viscosidade da fase inferior do sistema foi maior do que a da fase superior. Verificou também que essa propriedade aumentou com a elevação da concentração e da massa molar dos constituintes do sistema.

Cruz et al. (2000) determinaram a viscosidade de polímeros com massas molares de PEG 200, 400, 600, 1000, 1500 e 3350, nas temperaturas de 20 °C e 30 °C. Observaram que à medida que se aumentava a massa molar do polímero, os valores da viscosidade aumentavam; comportamento semelhante foi encontrado no trabalho de Lee e Teja (1990); Ninni et al. (2003); Mei et al. (1995) Santos, 2012.

Índice de Refração

O parâmetro índice de refração em soluções aquosas de sal e agente biológico é em parte utilizado em técnicas bioquímicas. Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para medir esse parâmetro físico em líquidos, sendo o mais comum o refratômetro.

Na literatura são descritos alguns trabalhos com PEG e sal utilizando esse método. Estudos feitos por Graber et al. (2002) mediram o índice de refração de uma

mistura ternária contendo PEG 4000+ NaNO₃ + água, nas temperaturas de (15°, 20°, 25°, 30°, 35°, 40°) C . Concluíram que, conforme aumentava a concentração das frações molares de PEG e de sal no sistema, havia aumento do índice de refração, sendo observado em todas as temperaturas.

Graber et al. (2004) mediram o índice de refração de sistema composto por PEG 2000+ carbonato de sódio+ água em quatro temperaturas diferentes. Nesse trabalho, os autores concluíram que o índice de refração diminui com o aumento da temperatura, e conforme aumentava a fração de massa do PEG ou do sal na mesma temperatura, ocorria o aumento do índice de refração.

Coefficiente de Partição

No momento em que materiais biológicos são adicionados em um sistema aquoso bifásico, eles se distribuem entre a fase superior e a fase inferior, sem perda da atividade biológica. A relação entre as concentrações de certa biomolécula nessas fases define o coeficiente de partição (*K*) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986), conforme Equação 5:

$$K = W_{fs}/W_{fi} \quad 5$$

Em que W_{fs} é a concentração da biomolécula na fase superior, e W_{fi} é a concentração de biomolécula na fase inferior.

Existem outras relações capazes de expressar o coeficiente de partição; pode ser citada, por exemplo, segundo DIAMOND e HSU (1989), a Equação 6:

$$K = K_{amb} + K_{est} \quad 6$$

Em que K_{amb} e K_{est} representam as contribuições dos fatores ambientais e de ordem estrutural, respectivamente. Entre os fatores ambientais, estão consideradas as propriedades do SAB, como tipo e concentração de sais, tipo, concentração e massa molar do polímero, pH, temperatura e ligantes específicos. Albertsson (1986) propôs um modelo, Equação 7, mais simples para o cálculo de *K*, desmembrando-o em:

$$\ln p = \ln K_{el} + \ln K_{hidrof} + \ln K_{hifil} + \ln K_{conf} + \ln K_{lig} \quad 7$$

em que os índices *el.*, *hidrof.*, *hifil.*, *conf.* e *lig.* referem-se às contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas, de conformação e de interação com os ligantes, respectivamente.

Aplicação dos sistemas aquosos bifásicos na separação de biomoléculas

Existe uma extensa quantidade de combinações de substâncias químicas capazes de originar SAB, segundo a literatura. Estas combinações são obtidas por tentativa e erro, já que não há uma teoria capaz de prever quais relações entre as espécies químicas resultariam na segregação de fases e formação desses sistemas. Na Tabela 2, estão apresentados alguns exemplos de formação de SAB para separação de macromoléculas.

Tabela 2: Sistemas aquosos bifásicos formados por PEG e sal, utilizados na separação de biomoléculas.

Polímero	Sal	Soluto particionado	Referência
PEG	Fosfato de potássio	Alfa-amilase	CHEN et al.,1992
PEG	Fosfato de potássio	Insulina	HARAGUCHI et al.,2004
PEg	Tartarato de sódio	Corante Carmim de chonilha	MAGESTE et al., 2009
PEG	MgSO ₄	Ovomucoide Proteinase	OLIVEIRA et al.,2009 KLOMLAO et al, 2005
PEG	K ₂ CO ₃ ou Na ₂ CO ₃	Th ⁴⁺ , PU ⁴⁺ , AM ³⁺	ROGERS et al.,1993

As observações sobre a partição de pigmentos em sistemas aquosos bifásicos começaram em 1954, quando Albertsson notificou a partição de cloroplastos em sistemas constituídos por polietileno glicol e sal. Mas recentemente, Mageste et al.

(2009) estudaram a partição do corante carmim em SABs constituídos por polímero e sal. Os estudos sobre a partição de pigmentos em sistemas aquosos bifásicos têm sido pouco retratados na literatura, embora existam relatos de que a utilização do SAB para a extração e purificação de corantes é uma excelente alternativa por ser de baixo custo e estaria dentro dos princípios da química verde, pela não utilização de solventes tóxicos. Isso significa que não há geração de descartes perigosos ao meio ambiente e à saúde humana (LENARDÃO et al., 2003).

O surgimento de estudos de que é possível extrair pigmentos, sem que ocorra mudança na sua estrutura, irá mudar o comércio de aditivos, uma vez que a tendência demonstrada pelo mercado em restringir o uso de corantes sintéticos em alimentos e as restrições impostas pela organização mundial de saúde têm levado a indústria e os pesquisadores ao interesse por materiais naturais, em particular hortifrutícolas, que são usados como corantes. Sendo assim, existem interesses pelos processos de separação de corantes naturais. Como os antioxidantes são biomoléculas fotossensíveis e termossensíveis, a técnica de sistemas aquosos é indicada.

Antocianinas

Entre os fatores sensoriais na escolha de um alimento está a cor, que influencia na aceitação do produto e, muitas vezes, determina o poder de compra. O uso de antocianinas como corantes em alimentos é limitado pela sua sensibilidade a fatores como luz, temperatura, estabilidade metálica, exposição ao oxigênio, processo de extração, além de serem mais caras que os corantes artificiais (PIMENTEL, 1995; STRINGHETA, 1991).

O termo antocianina deriva das palavras gregas *anthos* (flor) e *kyanos* (azul) (VON ELBE et al., 1996). São compostos solúveis em água, responsáveis por uma variedade de cores atrativas de frutas, flores e folhas, que variam do vermelho alaranjado, como no morango (*Fragaria vesca* L.), ao roxo, no jamelão (*Syzygiumcumini*), passando pelo vermelho vivo, na cereja vermelha (*Prunusavium* L.). Quimicamente, as antocianinas são glicosídeos de antocianidinas, cujo núcleo básico é o cátion flavilium, o qual é formado pelo esqueleto de carbono $C_6C_3C_6$, característico também de outros flavonóides naturais, e que permite sua associação com flavonóides não antociânicos. Esses compostos representam um significativo papel na prevenção, ou

retardam o aparecimento, de várias doenças por suas propriedades antioxidantes (VOLP et al., 2008).

As antocianidinas apresentam-se naturalmente em dezoito formas diferentes, sendo derivadas de polihidroxi e polimetoxi de sais 2-fenilbenzenopirilium (falvilium), como pode ser observado na Figura 3 e Tabela 3.

As antocianinas encontradas em alimentos são todas derivadas das agliconas pertencentes a três pigmentos básicos: pelargonidinas, cianidina e delphinidina, todas com hidroxilas nas posições três, cinco e sete. Embora existam antocianinas derivadas de outras antocianidinas, elas são encontradas com menos frequência na natureza (BOBBIO, 2003).

Fatores que influenciam a cor e a estabilidade de antocianinas

Como muitos corantes naturais, as antocianinas sofrem uma instabilidade inerente com a alteração do pH; elas são mais estáveis sob condições ácidas. Podem ser degradadas por vários mecanismos possíveis para soluções descoloridas ou produtos coloridos marrons ou insolúveis. A degradação pode ocorrer durante a extração/purificação e durante o processamento e estocagem de alimentos. Um conhecimento dos fatores que governam a estabilidade das antocianinas é vital para a eficiência da sua extração/purificação e para o seu uso como corante de alimentos (JACKMAN e SMITH, 1996).

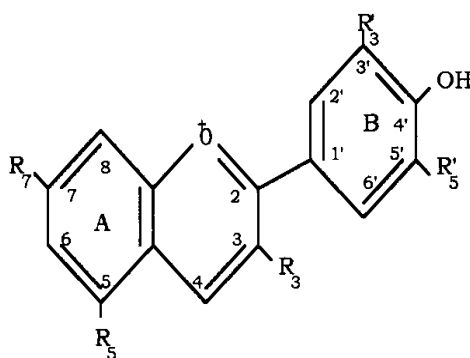


Figura 3: Estrutura de antocianinas de ocorrência natural. Fonte: (adaptado de HENDRY E HOUGHTON, 1996).

Tabela 3: Antocianidinas naturais de maior ocorrência

Antocianidina	Posição de Substituição (R)						Cor
	3	5	6	7	3'	5'	
Pelargodina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	H	Alaranjado
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	H	Alaranjado- vermelho
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	H	Alaranjado- vermelho
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	Azul-vermelho
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	Azul-vermelho
Apigeninidina (Ap)	H	OH	H	OH	H	H	Alaranjado
Luteolinidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	H	Alaranjado
Tricetinidina (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	Vermelho
Auratinidina (Au)	OH	OH	OH	OH	H	H	Alaranjado
6-Hidroxi-Cy (6OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	H	Vermelho
6-Hidroxi-Dp (6OHDp)	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Rosinidina (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	H	Vermelho
Hirsutidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe	Azul-vermelho
5-Metil-Cy (5MCy)	OH	OMe	H	OH	OH	H	Alaranjado- vermelho
Puchelidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	Azul-vermelho
Europinidina (EU)	OH	OMe	H	OH	OMe	H	Azul-vermelho
Capensinidina (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	Azul-vermelho

Fonte: Adaptada JACKMAN E SMITH, 1991; MAZZA E MINIATI, 1993.

Segundo Francis (1992), as soluções de antocianinas apresentam uma coloração vermelha mais intensa quando em pH abaixo de 3,0. Quando o pH é elevado para a faixa de 4,0 a 5,0, a coloração vermelha tende a desaparecer. Aumentos adicionais de pH levam as antocianinas a apresentarem uma coloração azulada, que, após a estocagem ou aquecimento, torna-se amarelada. As antocianinas estão sujeitas à mudança de cor com a variação do pH por causa da formação da estrutura hemiacetal (B) sem cor em pH próximo a 4,0 (SILVA, 2006).

Em meio ácido, existe um equilíbrio entre quatro estruturas de antocianina/aglicona: a base quinoidal (A), o cátion flavilum (AH^+) e as espécies descoloridas (B) e chalcona (C) (STRIGHETA, 1992). Estas transformações estruturais das antocianinas em função do pH são apresentadas na Figura 4.

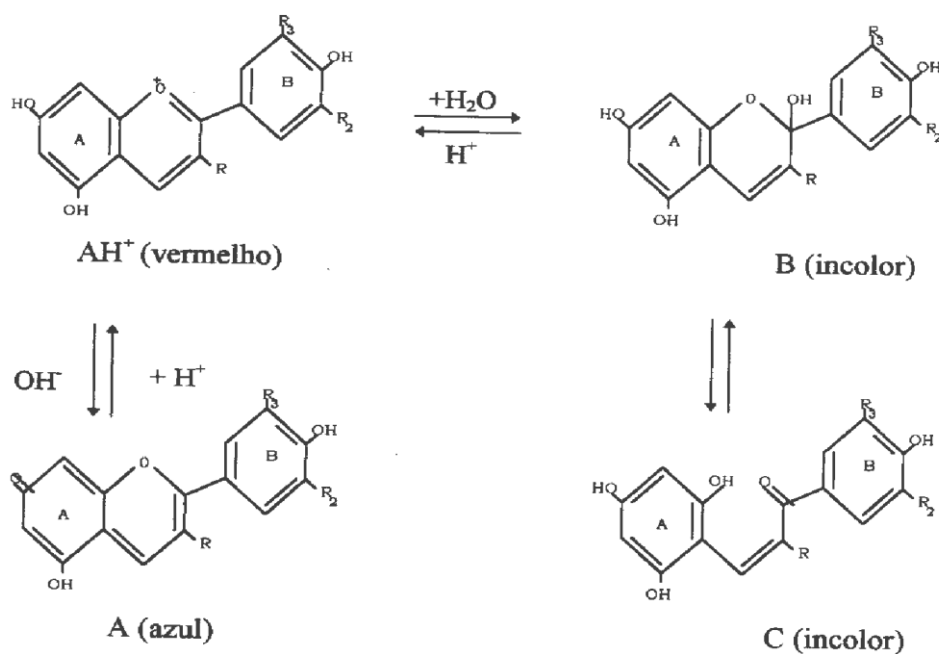


Figura 4: Transformações estruturais das antocianinas em função do pH. Fonte: (IACOBUCCI e SWEENY, 1983).

Assim como em muitas reações químicas, a estabilidade das antocianinas e a taxa de sua degradação são marcadamente influenciadas pela temperatura. Em geral, as estruturas características que conduzem para o aumento da estabilidade em relação ao pH também conduzem para o aumento da estabilidade térmica. A degradação de antocianinas é virtualmente pH-independente em condições anaeróbicas. Porém, na presença de oxigênio, a substituição elevada de metoxi, glicosídeo e/ou acil geralmente

conduz para um aumento no pH, no qual ocorre o máximo de estabilidade térmica (CALVI e FRANCIS, 1978).

Com poucas exceções, a degradação de antocianinas segue cinéticas de primeira ordem. O mecanismo de degradação é dependente da temperatura. Segundo Cemeroglu et al. (1994) e Markakis (1982), citados por Jackman e Smith (1996), em temperaturas de estocagem (isto é, $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), os valores da energia de ativação (E_a) e z (variação da temperatura requerida para mudar o tempo de destruição térmica por um fator de dez, o qual reflete a degradação térmica) ficarão em torno de 70 kJ/mol e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, enquanto em temperaturas de processamento (isto é, $> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$) os valores de E_a e z ficarão em torno de 95 kJ/mol a 113 kJ/mol e $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Portanto parece que as antocianinas têm estabilidade relativamente melhor em temperaturas maiores, apesar de, em condições favoráveis, ocorrer a formação de antocianinas incolores, principalmente as chalconas. Em seu trabalho, Rommel et al. (1992) recomendam utilizar alta temperatura e pequeno tempo de processamento para alcançar um máximo de retenção de pigmento nos produtos alimentícios contendo antocianinas. Os pequenos tempos envolvidos podem ser suficientes para prevenir a degradação de antocianinas ou a sua transformação em espécies incolores.

Propriedades antioxidantes das antocianinas

Segundo Volp et al. (2008), a propriedade mais descrita das antocianinas é sua ação antioxidante. Células e tecidos do organismo humano estão continuamente sofrendo agressões causadas pelos radicais livres e espécies reativas do oxigênio, os quais são produzidos durante o metabolismo normal do oxigênio ou são induzidos por danos exógenos.

A deficiência natural de elétrons das antocianinas faz esses compostos serem particularmente reativos, apresentando também uma grande sensibilidade a mudanças de pH e temperatura. Os polifenóis são doadores efetivos de hidrogênio.

As antocianinas são incluídas na lista dos compostos naturais capazes de agir como potentes antioxidantes. Seu potencial antioxidante é regulado por suas diferenças na estrutura química. Variando a posição e os tipos de grupos químicos nos anéis aromáticos das antocianinas, a capacidade de aceitar elétrons desemparelhados de moléculas de radicais também varia. Seu potencial antioxidante também é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilas e sua conjugação, assim como da

presença de elétrons doadores no anel da estrutura, pela capacidade que o grupo aromático tem de suportar o desaparecimento de elétrons.

Jamelão

O jamelão (*Syzygiumcumini*) é uma planta da família Myrtaceae, também conhecido, popularmente, como jamelão, cereja, jalão, kambol, jambu, jambul, azeitona-do-nordeste, ameixa-roxa, azeitona, murta, baga-de-freira, guapê, jambuí e azeitona-da-terra, entre outros nomes. A árvore é de grande porte, podendo alcançar vários metros de altura, e os frutos, que são do tipo baga, se assemelham bastante à azeitona (MARTINS et al., 2002; VIZZOTTO e FETTER, 2009). Sua coloração, inicialmente branca, torna-se vermelha e, posteriormente, preta, quando maduro. O fruto possui uma única semente, envolvida por uma polpa carnosa e comestível, mucilaginoso, doce, adstringente, sendo geralmente agradável ao paladar (LORENZI e MATOS, 2002; VIZZOTTO et al., 2008).

O jamelão é originário da Indonésia, da China e das Antilhas, no entanto é cultivado em vários países. É encontrado em grande parte do Brasil, nas planícies litorâneas, nas serras e nos planaltos e cresce muito bem em vários tipos de solo (GOMES et al., 1983; BARENJEE e DASGUPTA, 2005) No Brasil, o fruto é geralmente consumido *in natura*, porém, na Índia, é, geralmente, processado na forma de compotas, licores, vinhos, vinagre, geleias, geleiadas, tortas e doces, entre outras (GOMES, 1983; BANERJEE e DASGUPTA, 2005). Os frutos do jamelão se caracterizam por apresentar alta atividade antioxidante, além de serem uma rica fonte de antocianinas, como a delfinidina-3-glicosídeo (REYNERTSON et al., 2008), a petunidina-3-glicosídeo e a malvidina-3-glicosídeo(VEIGAS et al., 2007). Porém, a casca seca do fruto apresenta atividade antioxidante baixa, provavelmente pela perda de compostos antioxidantes no processo de secagem (BANERJEE e DASGUPTA, 2005; VIZZOTTO; 2008).

Segundo a literatura, o potencial do jamelão pode ser verificado na produção de alimentos funcionais e em medicamentos que podem combater algumas enfermidades que atingem a humanidade (GROVER et al., 2000; BRITO et al., 2007; VIZZOTTO e FETTER, 2009), porém há necessidade de desenvolver novas técnicas para a separação e concentração de tais compostos, sem que ocorra a perda das propriedades funcionais.

No que diz respeito à presença de compostos bioativos, Veiga et al. (2007) comprovaram a existência de elevados teores de antocianinas. Esses resultados sugerem que a atividade antioxidante do extrato do jamelão, aliada ao forte potencial do corante, com características desejáveis de solubilidade e estabilidade, poderia estimular a incorporação de extrato como aditivo natural para ser empregado em alimentos e formulações farmacêuticas.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Processos e no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Itapetinga, na Bahia.

Preparo do sistema aquoso bifásico

Para a montagem dos sistemas aquosos bifásicos, compostos de PEG-sal-água, foram preparadas soluções estoque com PEG em água e sal em água. A concentração da solução de PEG foi de 50% m/m, e a solução salina de sulfato de sódio foi de 22% m/m. A solução salina teve valores de pH igual a 2, obtidos a partir do ajuste com o ácido conjugado, o ácido sulfúrico, e conferidos em pHmetro.

Foram determinados dados de equilíbrio de sistemas formados por PEG 1500+ sulfato de sódio + água; PEG 2000+ sulfato de sódio + água; PEG 4000+ sulfato de sódio + água; PEG 6000+ sulfato de sódio + água. Todos os sistemas foram analisados em temperaturas de 20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C. As soluções e diluições foram preparadas usando balança analítica (GEHAKA, modelo AG-200). As curvas binodais foram determinadas pelo método turbidimétrico (ALBERTSSON, 1985), que indica o início da região bifásica. O procedimento consistiu em pesar 1 g da solução estoque do polímero em tubos de vidro, para melhor visualização da turvação. O tubo contendo a solução do polímero foi levado a um banho termostático, onde foi deixado por 5 minutos para atingir o equilíbrio térmico. Foram adicionadas alíquotas de 10 µL da solução de sal com uma pipeta automática, mantendo-se a agitação manual do tubo dentro do banho, até ocorrer a turvação do sistema e que a solução dentro do tubo tivesse um aspecto esbranquiçado. Nesse momento foi anotada a quantidade de sal que provocou a turvação. Em seguida foi titulada água destilada no sistema até se tornar límpida e, depois, anotada a quantidade de água que foi necessária para o que o sistema ficasse homogêneo. Novamente foi adicionado mais sal até promover uma nova turvação e, após atingir esse ponto, novamente foi adicionada água ao sistema. A titulação foi realizada repetidamente até que os pontos necessários para fazer a curva fossem obtidos.

As linhas de amarração que foram usadas para a construção dos diagramas foram obtidas com base na curva turbidimétrica, de forma que os pontos globais estivessem acima da curva onde se encontra a região bifásica. Foram utilizados cinco pontos globais para cada sistema PEG-Sal, os quais estão apresentados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. Os sistemas foram formados com a adição de quantidade adequada de solução estoque PEG, sal e água para uma massa total do sistema de 50 g, em tubos de centrífuga graduados com fundo cônico. A mistura resultante foi agitada em agitador vortex (PHOENIX, modelo AP-56) por aproximadamente 3 minutos e centrifugada a 3000g (SP LABOR, modelo Sp-701) por 20 minutos para acelerar a formação das duas fases. Em seguida foram mantidas em repouso durante 24 horas em estufa B.O.D. (LONGEN SCIENTIFC, modelo LG340 FT220) nas temperaturas estudadas. O equilíbrio termodinâmico foi considerado atingido quando as fases estavam totalmente límpidas.

Tabela 4: Composições globais para os sistemas formados por PEG 1500+ sulfato de sódio, expressas em porcentagem mássica (%m/m)

Ponto	20 °C		30 °C		40 °C		50 °C	
	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal
Global								
1	14	9	15	8	15	8	14	8
2	15	10	16	9	16	9	15	9
3	16	11	17	10	17	10	16	10
4	17	12	18	11	18	11	17	11
5	18	13	19	12	19	12	18	12

Tabela 5: Composições globais para os sistemas formados por PEG 2000+ sulfato de sódio, expressas em porcentagem mássica (%m/m)

Ponto	20 °C		30 °C		40 °C		50 °C	
	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal
Global								
1	10	9	14	8	13	8	13	8
2	11	10	15	9	14	9	14	9
3	12	11	16	10	15	10	15	10
4	13	12	17	11	16	11	16	11
5	14	13	18	12	17	12	17	12

Tabela 6: Composições globais para os sistemas formados por PEG 4000+ sulfato de sódio, expressas em porcentagem mássica (%m/m)

Ponto	20 °C		30 °C		40 °C		50 °C	
	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal
Global								
1	17	7	17	6	16	6	15	6
2	18	8	18	7	17	7	16	7
3	19	9	19	8	19	8	17	8
4	20	10	20	9	19	9	18	9
5	21	11	21	10	20	10	19	10

Tabela 7: Composições globais para os sistemas formados por PEG 6000+ sulfato de sódio, expressas em porcentagem mássica (%m/m)

Ponto	20 °C		30 °C		40 °C		50 °C	
	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal
Global								
1	9	9	8	8	7	12	13	8
2	10	10	9	9	8	13	14	9
3	11	11	10	10	9	14	15	10
4	12	12	11	11	10	15	16	11
5	13	13	12	12	11	16	17	12

Determinação dos dados de equilíbrio

Coleta das fases

Depois de ter atingido o equilíbrio e as duas fases lípidas terem sido observadas, uma alíquota da fase superior foi coletada com o auxílio de uma seringa até que restasse uma camada dessa fase de, aproximadamente, 5 mm acima da interface. Esse procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada. Depois da coleta da fase superior, foi inserida, cuidadosamente, uma seringa (com agulha longa) na célula de equilíbrio, perturbando a interface o mínimo possível. Depois de uma hora em repouso, o equilíbrio foi restabelecido, e o êmbolo da seringa foi puxado vagarosamente até que permanecesse na célula uma camada de 5 mm da fase inferior. As fases foram

coletadas em recipientes com tampa e armazenadas em refrigeração até que todas as análises fossem realizadas. Os componentes do sistema foram quantificados em cada fase, e os diagramas de equilíbrio foram construídos.

Medida de volume das fases

Para todos os tubos (ou célula de equilíbrio), foi obtida uma relação entre a massa de água e a altura da coluna de água atingida por essa massa. A partir da densidade da água, nas temperaturas estudadas, a relação da equação 4, a curva analítica foi construída em função do volume de água e da altura da coluna de água. Dessa forma, antes da retirada das alíquotas das fases, a altura de cada fase foi medida com régua, e o volume, calculado. A altura da fase inferior foi lida a partir do fundo do tubo até a interface, e a altura da fase superior foi calculada subtraindo a medida da altura total (medida do fundo do tubo até a superfície da fase superior) com a medida da altura da fase inferior.

$$\rho = m/v \quad 4$$

Onde: ρ = densidade; m = massa; v = volume

Quantificação do teor de polietileno glicol

A concentração de PEG foi determinada por meio da extração líquido-líquido, utilizando clorofórmio como solvente. Inicialmente, foram pesados aproximadamente 2 g de cada fase em tubos de 15 mL. Foram adicionados 3 mL de clorofórmio, em seguida, foram agitados em vortex e centrifugados a 4000g (BIOSYSTEMS, modelo MPW-350) por 5 min. A fase inferior, contendo PEG, foi coletada e armazenada em tubos, previamente secos e pesados. A fase superior foi submetida a mais duas extrações para que todo o PEG existente fosse extraído. Por fim, os tubos contendo PEG + Clorofórmio foram levados para a estufa a 105 °C por 12 horas para evaporação do clorofórmio, e a massa de PEG foi obtida com a diferença de peso dos tubos secos.

Quantificação do teor de água

A determinação de água foi pela técnica liofilização, utilizando o equipamento (LV2000 TERRONI®). Esse método consiste basicamente na pesagem da amostra antes e depois da secagem, em condições controladas e padronizadas.

Foram utilizados tubos de plástico de 3 cm de diâmetro e 4 cm de altura previamente pesados sem tampa. Aproximadamente um grama de cada fase foi pesado, anotando-se a massa obtida. Os tubos foram mantidos congelados a -80 °C durante 24 horas e, assim, levados ao liofilizador, na temperatura -33 °C e à pressão de 12 N/m, para a secagem das amostras durante 24 horas. Os tubos foram novamente pesados para o cálculo da diferença da massa correspondente à água evaporada.

Quantificação do teor de sal

A concentração salina nas fases foi determinada com a utilização de medições de condutividade (tecnal, Tec-4MC) com uma precisão de $\pm 0,01$ escala completa. Foi preparada uma curva de calibração com solução salina de sulfato de sódio 0,01% a 1%; a partir da faixa da curva, as fases foram diluídas de modo que a concentração estivesse dentro da faixa de calibração.

Massa específica

A massa específica foi determinada nas temperaturas de (20, 30, 40 e 50) °C. Para determinação da massa específica, utilizou-se um Densímetro Digital de Bancada DMA 5000M (ANTON PAAR) com uma precisão de $\pm 5 \times 10^{-6}$ g.cm⁻³ e repetibilidade de $+ 1 \times 10^{-6}$ g.cm⁻³ na faixa de operação 0 a 3 g.cm⁻³. A faixa de temperatura do equipamento é de 273,15 K a 363,15 K com uma precisão de $+ 0,01$ K e repetibilidade de $+ 0,001$ K.

Viscosidade

A viscosidade foi realizada em um viscosímetro rotativo, marca Brookfield, modelo DVII+Pro, fabricado por Brookfield Engineering Laboratories, Inc., EUA. Este equipamento foi conectado a um banho termostático Brookfield TC-500 (Brookfield Engineering Laboratories, Massachusetts, EUA), com precisão de 0,1°C, que tem sua saída de água acoplada ao cilindro encamisado do viscosímetro que contém a amostra. A temperatura foi, assim, ajustada em (20, 30, 40, 50) °C.

Para a realização das análises, foram utilizados, para cada medida, 9 mL de amostra aproximadamente. A velocidade angular foi de 100 rpm com 6 medições com o spindle SC4- 31.

Cada ensaio foi feito em três repetições para cada uma das temperaturas das fases. Os resultados foram registrados pelo software Rheocalc em computador acoplado no equipamento. Posteriormente os dados foram tabulados em planilhas do Excel.

Índice de refração

Para o índice de refração, foi utilizado o refratômetro digital (ATAGOHI and refractometer, precisão 0,2%). Este aparelho foi conectado a um banho termostático (Tecnal, Te-184), que permitia o controle da temperatura com uma precisão de 0,1 °C. O equipamento foi devidamente calibrado com água destilada na temperatura de estudo, em seguida foi colocada a amostra no prisma do refratômetro para proceder à leitura direta.

Obtenção do extrato antociânico do Jamelão

Os frutos de jamelão foram colhidos no estágio de maturação para consumo na região Sudoeste da Bahia e levados para o Laboratório de Engenharia e Processo da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Os frutos foram selecionados e imersos em água corrente para remoção das sujidades. Após a lavagem, as frações comestíveis foram separadas das sementes manualmente com auxílio de facas. Em seguida, foram homogeneizadas com auxílio de liquidificador semi-industrial e acondicionadas em sacos de polietileno, fechados numa seladora a vácuo e armazenados a -20 °C.

O extrato antociânico foi obtido da polpa de jamelão, com a mesma metodologia utilizada por Fuleki e Francis (1968). A amostra previamente triturada foi macerada com um solvente extrator (Etanol-água (70:30)), acidificada com HCl a pH 2,0, durante 24 horas, a uma temperatura em torno de 25 °C e ao abrigo de luz. Após essa etapa, o extrato foi filtrado em papel Whatman 1 a vácuo, em um funil de Büchner. O extrato obtido foi imediatamente concentrado em evaporador rotatório, em pressão reduzida, à temperatura de 35 ± 1 °C, até se obter um volume final correspondente a 30 do volume original.

Partição do extrato antociânico

Após o equilíbrio das fases dos sistemas PEG-sal-água, realizou-se a separação das fases superior e inferior, da forma supracitada, para fazer a partição da antocianina.

O extrato da polpa de jamelão foi adicionado (100 µL) diretamente na fase salina, durante a montagem dos sistemas, em um volume de 3,0 mL. Em seguida, foram adicionados 3mL da fase superior ao sistema. Os sistemas foram submetidos à agitação durante 3 minutos e, então, centrifugados a 2000g (BIOSYSTEMS, modelo MPW-350), por 20 minutos, para acelerar a separação de fases. Subsequentemente, os tubos foram mantidos em repouso, em estufa B.O.D., durante 24 horas, na temperatura de operação estabelecida.

Posteriormente, foram coletadas as fases em tubos e, em seguida, foi feita a quantificação das antocianinas totais.

Quantificação das antocianinas totais

A quantificação das antocianinas totais foi realizada de acordo com o método do pH diferenciado descrito por Giusti e Wrolstad (2001).

As diluições foram feitas com tampão de cloreto de fosfato, pH =1, sendo que a percentagem da amostra na solução final não pode exceder os 20 %, para não passar da capacidade do tampão.

Com os fatores de diluição determinados, foram preparadas diluições das amostras tanto em tampão de cloreto de fosfato, pH=1, como em tampão de acetato de sódio, pH=4,5, deixando as soluções estabilizarem por um período de 15 minutos; em seguida, fez-se a leitura das absorbâncias a $\lambda_{520\text{nm}}$ e a $\lambda_{700\text{nm}}$. O registro da absorbância a um comprimento de onda de 700 nm permite eliminar desvios na leitura provocados pela eventual presença de materiais coloidais; a este comprimento de onda, não existe absorbância por parte das antocianinas.

O cálculo da concentração das antocianinas, expresso em equivalentes de cianidina-3-glucósido, foi realizado utilizando-se a Equação 9.

$$\text{Antocianinastotais} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = (A * MM * FD * 10^3) / (\epsilon * d) \quad (9)$$

Onde: $A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{ph\ 1,0} (A_{520nm} - A_{700nm})_{ph\ 4,5}$,

em que: A, MM, FD, ϵ e d são absorvância, massa molar da cianidina-3-glucósido(449,2 MM), fator de diluição, percurso óptico e coeficiente de absorvidade molar da cianidina ($30200\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), respectivamente.

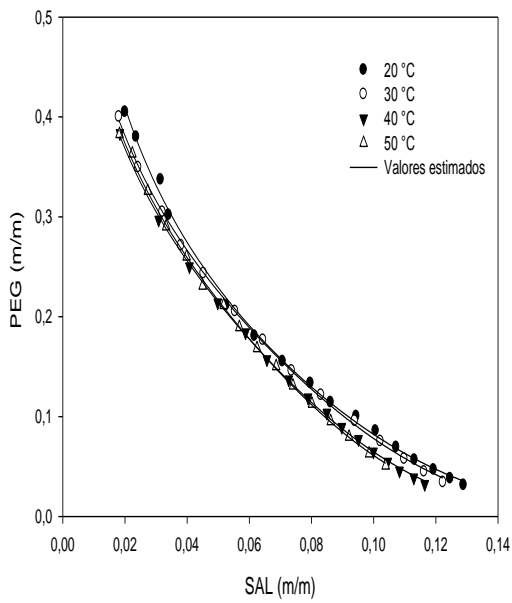
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da temperatura nos diagramas de equilíbrio dos sistemas PEG-Sulfato-Água

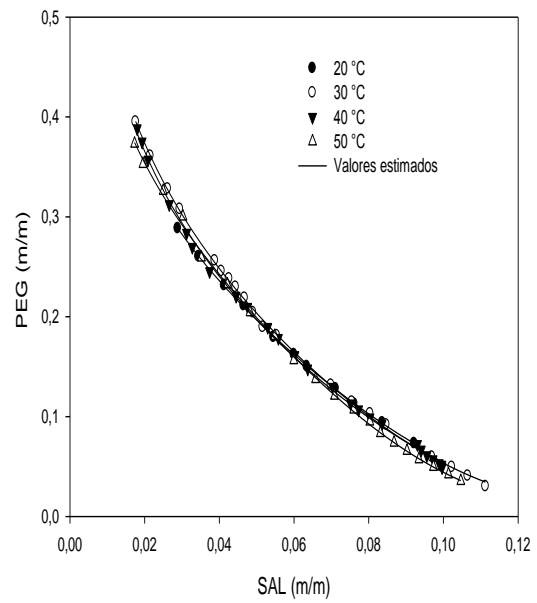
Nas Figuras 5, estão representados os diagramas de fases dos sistemas PEG-Sulfato-Água, em função da temperatura de trabalho. Estes diagramas delineiam o comportamento dos sistemas aquosos bifásicos e são únicos para cada sistema em condições de temperatura, concentração de sal e concentração de polímero, sendo que a formação das duas fases aquosas depende da concentração do sistema. Abaixo das concentrações críticas do polímero e de sal, mistura desses componentes são completamente miscíveis formando uma fase homogênea; e, acima das concentrações críticas de sal e PEG, ocorre um sistema com duas fases. Sendo assim, o diagrama de fases separa a região monofásica (abaixo da curva) da bifásica (acima da curva) de acordo com a concentração de cada componente expressa em % m/m; essa curva é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio.

A partir da análise dos dados binodais, verificou-se que a solubilidade do PEG diminui à medida que a temperatura aumenta; isto, provavelmente, deve-se à solvatação das moléculas de água para a fase inferior. Esse efeito é conhecido como “salting-out” e se torna mais forte com o aumento da temperatura. Tal comportamento foi observado por Ferreira e Teixeira (2011).

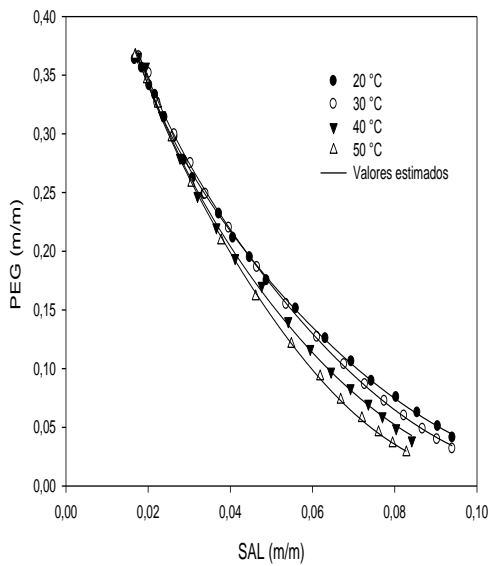
Observou-se que os sistemas PEG 1500+ sulfato de sódio+ água e PEG 2000+ sulfato de sódio+água não sofrem variação da região bifásica com aumento da temperatura (Figura 5 a b). Este fato indica que há uma variação insignificante da capacidade calorífica das fases e, conseqüentemente, baixa variação de entalpia associada ao processo de separação. Em relação aos sistemas PEG 4000+ sulfato de sódio+ água e PEG 6000+ sulfato de sódio+ água, nota-se que, à medida que diminui a concentração do polímero e aumenta a concentração de sal no sistema, ocorre um aumento das regiões bifásicas com o aumento da temperatura (Figura 5 c d). Isso ocorre porque a interação sal-PEG na formação do SAB é endotérmica, ou seja, a formação do SAB é favorecida pelo aumento da temperatura.



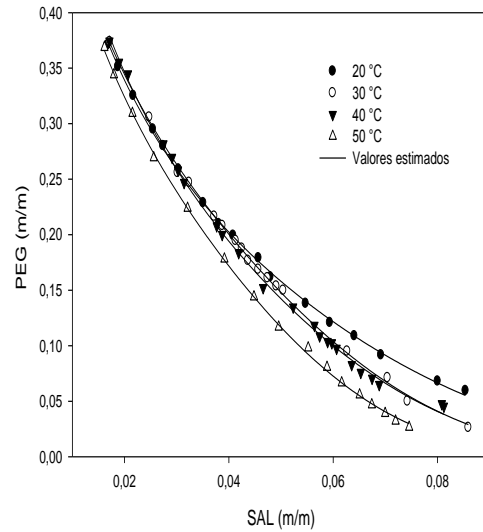
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5: Diagrama de fase nas temperaturas 20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C, pH 2. a) PEG 1500+ Sulfato de Sódio+ água, b) PEG 2000+ Sulfato de Sódio+ água; c) PEG 4000+ Sulfato de Sódio+ água; d) PEG 6000+ Sulfato de Sódio+ água.

As composições de equilíbrio dos SABs formados por PEG 1500+sulfato de sódio+ água, PEG 2000+sulfato de sódio+ água, PEG 4000+sulfato de sódio+ água, PEG 6000+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas no pH 2 estão

apresentadas nas Tabelas 8 a 10, respectivamente, em que os dados referentes aos componentes das fases estão expressos em termos de fração mássica (%m/m). Foram determinadas cinco linhas de amarração em cada diagrama. Os desvios padrões encontrados para as análises foram de 0,67 para a quantificação do PEG; 0,34 para a quantificação do sal; e 0,37 na quantificação da água. Com os resultados apresentados nas Tabelas 8 a 10, pode-se afirmar que existe uma relação de exclusão entre o polímero e o sal formador do sistema para todos os sistemas estudados independentemente da temperatura. Esta exclusão é comum em todos os sistemas aquosos bifásicos formados por polímeros+sal, sendo que a fase superior é composta majoritariamente por polímero e água, e a fase inferior é composta principalmente por sal e água. O mesmo fenômeno foi observado por Regupathi et al. (2011) quando estudaram PEG 2000+ [(NH₄)₂HC₆H₅O₇]; Lemos et al. (2011) com PEG 1500 para (NH₄)₂SO₄, ZnSO₄ e K₂HPO₄; e Ferreira e Teixeira (2011) quando estudaram PEG 8000+ NaSO₄. Porém, os sistemas formados por PEG + NaNO₃ apresentam um comportamento de exclusão muito menos intenso que os demais sistemas aquosos bifásicos (ZAFARANI-MOATTAR et al., 2008). Esta exceção pode ser associada à solubilidade de sais de nitrato com o polímero. De acordo com os resultados obtidos, os sistemas estudados apresentam uma grande exclusão do polímero em relação ao sal na fase superior, aumentando a hidrofobicidade tanto no aumento da concentração em todos os sistemas quanto no aumento da massa molar do polímero. Além disso, pode ser observado que a quantidade de água diminui à medida que aumenta a concentração do polímero, ocorrendo uma solvatação da água. A água expulsa da fase superior irá para a fase inferior, havendo uma interação com o sal.

Os balanços de massa apresentam erro médio relativo de 1,56% para o balanço de massa global; de 1,12 para o PEG; de 1,2 % para o sulfato de sódio; e de 1,16% para a água. Quanto menores os erros no balanço de massa, mais alinhados estão os pontos.

Tabela 8: Frações mássicas (%m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500g/mo, sulfato de sódio e água, pH 2

LA	CLA	Composição global			Fase superior			Fase inferior		
		Wpeg	W sal	W agua	Wpeg	W sal	W agua	Wpeg	W sal	W agua
20°C										
1	25,12	14,00	9,00	77,00	24,81	4,00	69,64	1,77	14,00	83,24
2	32,51	14,86	9,91	75,23	30,18	3,40	65,47	0,21	16,00	81,17
3	36,47	16,00	11,00	73,00	33,72	3,15	62,98	0,61	18,45	72,26
4	41,70	17,00	12,00	71,00	38,00	2,36	60,11	0,21	20,00	79,31

5	45,40	18,00	13,00	69,00	40,50	2,00	57,47	0,03	22,58	77,38
30°C										
1	21,02	15,00	8,00	77,00	21,00	5,00	72,59	2,00	14,00	83,59
2	27,14	16,00	9,00	75,00	26,00	4,52	66,44	1,41	16,00	83,36
3	35,79	17,00	10,00	73,00	32,81	3,00	62,66	0,39	18,17	81,94
4	41,64	18,00	11,00	71,00	38,00	2,00	59,67	0,21	19,50	80,61
5	44,99	19,00	12,00	69,00	41,00	2,00	59,63	0,22	21,00	78,81
40°C										
1	27,99	15,00	8,00	77,00	28,54	4,13	67,98	1,83	12,48	83,37
2	32,48	16,00	9,00	75,00	32,15	3,90	63,66	1,21	13,78	85,89
3	36,50	17,00	10,00	73,00	34,98	3,42	62,39	0,62	15,73	82,47
4	40,69	18,00	11,00	71,00	38,06	2,89	59,29	0,12	17,62	80,79
5	44,41	19,00	12,00	69,00	40,87	2,47	56,30	0,07	20,00	79,12
50°C										
1	31,13	14,00	8,00	78,00	30,92	3,21	64,16	1,00	11,82	87,90
2	35,63	15,00	9,00	76,00	34,69	2,75	60,79	0,75	13,59	83,37
3	40,57	16,00	10,00	74,00	38,39	2,42	58,36	0,12	15,89	84,57
4	44,81	17,00	11,00	72,00	41,92	1,38	56,03	0,10	17,49	82,29
5	46,48	18,00	12,00	70,00	43,39	1,37	54,78	0,56	19,43	80,30

Tabela 9: Frações mássicas (%m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol

2000g/mol, sulfato de sódio e água, pH 2

LA	CLA	Composição global			Fase superior			Fase inferior		
		Wpeg	W sal	W água	Wpeg	W sal	W água	Wpeg	W sal	W água
20°C										
1	20,76	9,00	9,00	82,00	22,37	3,62	73,95	3,40	12,05	84,96
2	24,25	10,00	10,00	80,00	25,24	4,40	69,05	2,81	13,60	84,51
3	29,54	11,00	11,00	78,00	27,81	4,14	63,40	0,74	15,96	83,24
4	33,80	12,00	12,00	76,00	31,38	3,51	63,00	0,53	17,30	81,48
5	41,67	13,00	13,00	74,00	38,44	2,31	59,61	0,28	19,05	80,02
30°C										
1	24,52	8,00	8,00	84,00	23,21	4,39	75,55	0,30	13,13	88,36
2	31,74	9,00	9,00	82,00	29,70	3,13	70,36	0,20	14,83	87,52
3	35,14	10,00	10,00	80,00	32,51	2,95	66,88	0,20	16,78	86,00
4	37,83	11,00	11,00	78,00	34,34	2,93	63,96	0,21	19,25	84,53
5	42,11	12,00	12,00	76,00	38,11	1,76	59,94	0,20	20,09	82,27
40°C										
1	24,08	13,00	8,00	79,00	23,90	4,09	71,54	1,24	12,24	85,94
2	31,11	14,00	9,00	77,00	29,33	3,21	66,52	0,27	14,32	84,56
3	35,54	15,00	10,00	75,00	33,02	3,05	64,01	0,07	16,36	83,65
4	39,21	16,00	11,00	73,00	36,06	2,33	60,01	0,16	18,09	81,99
5	41,98	17,00	12,00	71,00	37,91	2,03	57,72	0,15	20,38	80,20
50°C										
1	27,54	14,00	9,00	77,00	27,33	4,49	68,78	1,35	13,66	86,47

2	34,34	15,00	10,00	75,00	32,48	3,65	64,30	0,39	15,88	85,63
3	39,73	16,00	11,00	73,00	37,39	2,74	59,79	0,43	17,30	83,99
4	42,31	16,99	12,00	71,01	38,95	2,76	58,52	0,23	19,82	82,14
5	46,36	18,00	13,00	69,00	42,33	2,15	55,36	0,16	21,43	80,43

Tabela 10: Frações mássicas (%m;/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000g/mol, sulfato de sódio e água, pH 2

LA	CLA	Composição global			Fase superior			Fase inferior		
		Wpeg	W sal	W água	Wpeg	W sal	W água	Wpeg	W sal	W água
20°C										
1	31,23	17,00	7,00	76,00	29,37	2,29	67,91	0,45	14,08	85,47
2	34,89	18,40	8,14	73,46	32,53	2,66	63,04	0,12	15,58	83,04
3	37,49	19,00	9,00	72,00	34,63	2,47	61,29	0,08	17,04	86,79
4	40,48	20,00	10,00	70,00	36,55	2,34	57,48	0,10	19,95	79,30
5	42,95	21,00	11,00	68,00	38,76	2,32	55,12	0,06	20,96	77,61
30°C										
1	22,73	17,00	6,00	77,00	21,16	4,41	70,86	0,56	14,01	86,83
2	26,98	18,00	7,00	75,00	24,09	3,56	68,92	0,34	16,37	84,86
3	31,10	19,00	8,00	73,00	27,06	3,13	69,32	0,14	18,70	78,88
4	34,98	20,00	9,00	70,99	29,94	2,99	61,57	0,10	21,24	80,85
5	38,86	21,00	10,00	69,00	34,00	2,56	63,06	0,82	22,79	81,73
40°C										
1	22,00	16,00	6,00	78,00	20,84	4,36	75,39	0,54	12,85	84,37
2	27,09	17,00	7,00	76,00	25,03	3,14	66,87	0,31	14,21	86,82
3	32,48	18,00	8,00	74,00	30,00	2,79	66,01	0,25	15,83	85,23
4	36,52	19,00	9,00	72,00	32,99	2,05	65,60	0,26	18,26	83,54
5	40,27	20,00	10,00	70,00	35,27	1,86	62,54	0,04	21,35	79,96
50°C										
1	23,30	15,00	6,00	79,00	24,26	3,77	70,82	1,83	10,09	88,23
2	32,28	16,00	7,00	77,00	31,37	2,80	64,67	0,45	12,09	87,67
3	37,75	17,00	8,00	75,00	36,14	2,17	60,98	0,21	13,76	89,17
4	40,68	18,00	9,00	73,00	38,32	1,89	59,21	0,04	15,64	84,77
5	42,80	19,00	12,20	68,80	40,11	1,71	57,92	0,39	17,64	81,94

Tabela 11: Frações mássicas (%m;/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 6000g/mol, sulfato de sódio e água, pH 2

LA	CLA	Composição global			Fase superior			Fase inferior		
		Wpeg	W sal	W água	Wpeg	W sal	W água	Wpeg	W sal	W água
20°C										
1	26,53	9,00	9,00	82,00	25,49	3,53	70,08	0,40	12,17	85,04
2	31,38	10,00	10,00	80,00	29,53	2,85	67,39	0,19	14,00	84,37

3	34,46	11,00	11,00	78,00	32,00	2,54	64,20	0,13	15,66	83,34
4	38,56	12,00	12,00	76,00	36,01	2,14	61,22	0,10	16,17	82,10
5	42,13	13,00	13,00	74,00	38,72	1,99	59,29	0,18	19,00	80,82
30°C										
1	19,13	8,00	8,00	84,00	19,22	3,81	75,55	1,12	10,01	88,36
2	26,29	9,00	9,00	82,00	25,83	2,80	70,36	1,11	11,78	87,52
3	32,47	10,00	10,00	80,00	31,34	2,24	66,88	0,72	13,04	86,00
4	35,47	11,00	11,00	78,00	33,04	2,22	63,96	0,13	15,46	84,53
5	39,95	12,00	12,00	76,00	37,18	1,76	59,94	0,10	16,63	82,27
40°C										
1	25,94	12,00	7,00	81,00	26,72	3,54	70,62	1,85	10,91	88,70
2	33,32	13,00	8,00	79,00	31,36	2,93	66,31	0,15	14,57	87,43
3	36,69	14,00	9,00	77,00	34,88	2,35	64,15	0,74	15,80	85,84
4	40,45	15,00	10,00	75,00	37,69	1,80	59,60	0,18	16,95	84,11
5	44,12	16,00	11,00	73,00	41,14	1,80	56,82	0,45	18,87	82,34
50°C										
1	24,31	15,00	6,00	79,00	24,22	3,29	71,76	0,68	9,41	89,53
2	28,88	16,00	7,00	77,00	27,55	2,56	67,32	0,27	12,01	88,43
3	35,36	17,00	8,00	75,00	33,59	2,02	64,16	0,10	13,34	86,87
4	40,18	18,00	9,00	73,00	38,04	1,63	59,54	0,14	14,96	84,88
5	43,37	19,00	12,20	68,80	40,87	1,30	57,02	0,18	16,32	84,55

Nas Tabelas de 8 a 10, também estão os valores do comprimento da linha de amarração (CLA) para cada sistema estudado. Nas Figuras de 6 a 9, verifica-se a relação linear entre o CLA e a composição global do sistema nas temperaturas de estudo, pois o CLA é dependente da diferença da concentração do sal e do polímero na fase superior e na inferior. Sendo assim, à medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença da composição entre as fases, elevando, conseqüentemente, a eficiência na extração de uma dada biomolécula.

O conhecimento do comprimento da linha de amarração de cada SAB é um parâmetro termodinâmico, normalmente utilizado para indicar o comportamento da partição de biomoléculas, sendo que, quanto maior o CLA, maior será a partição.

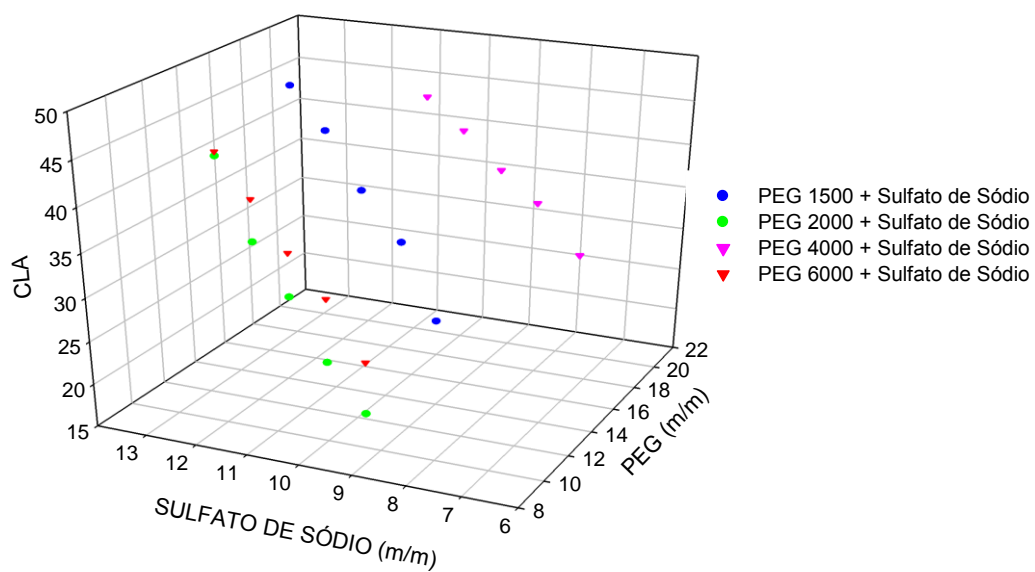


Figura 6: Relação linear entre o CLA x Sal x PEG a 20°C

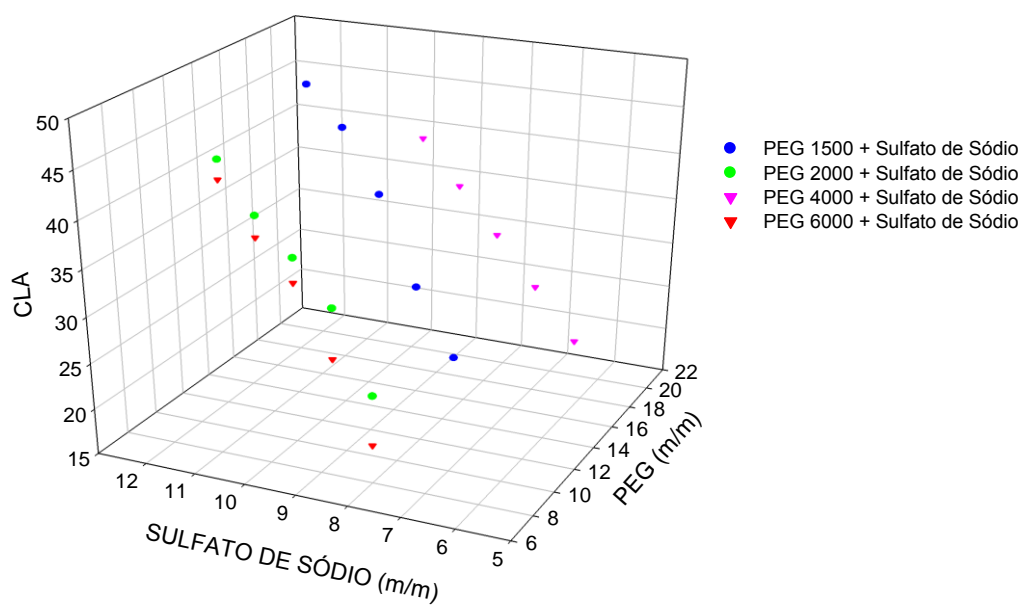


Figura 7: Relação linear entre o CLA x Sal x PEG a 30°C

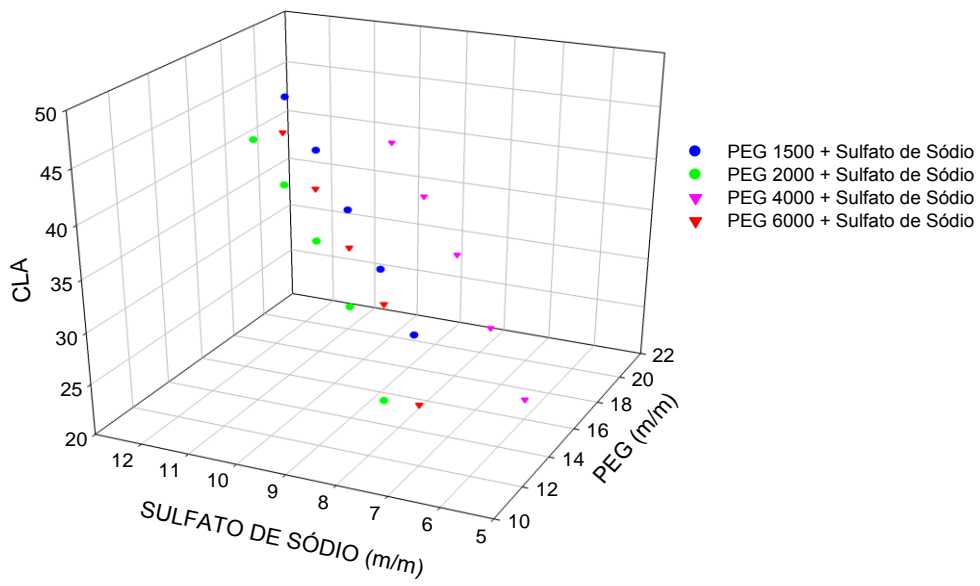


Figura 8: Relação linear entre o CLA x Sal x PEG a 40°C

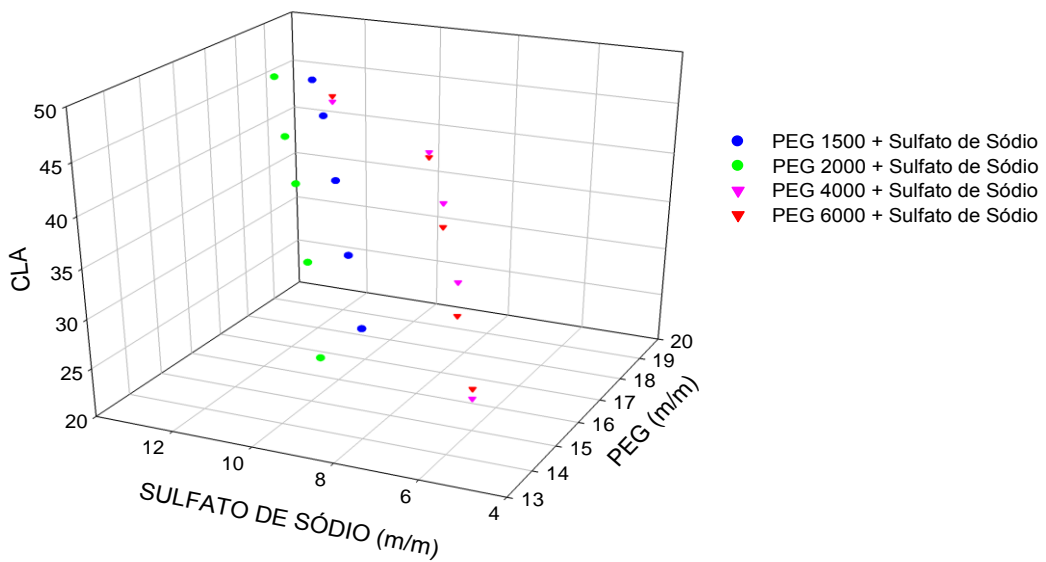


Figura 9: Relação linear entre o CLA x Sal x PEG a 50°C

A influência da temperatura sobre os dados de equilíbrio pode ser observada nos diagramas de fases nas Figuras 5. Para avaliar esse efeito, serão utilizados os valores da

inclinação da linha de amarração (ILA) para os quatros sistemas que estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração para o sistema PEG

Linhas de amarração	Temperatura (° C)			
	20	30	40	50
PEG 1500+ sulfato de sódio + água				
1	-2,30	-2,11	-3,20	-3,47
2	-2,38	-2,14	-3,13	-3,13
3	-2,16	-2,13	-2,79	-2,84
4	-2,14	-2,15	-2,57	-2,59
5	-1,96	-2,14	-2,32	-2,37
PEG 2000+ sulfato de sódio + água				
1	-2,25	-2,62	-2,78	-2,83
2	-2,43	-2,52	-2,61	-2,62
3	-2,28	-2,33	-2,47	-2,53
4	-2,24	-2,09	-2,27	-2,26
5	-2,28	-2,06	-2,05	-2,18
PEG 4000+ sulfato de sódio + água				
1	-2,45	-2,14	-2,38	-3,55
2	-2,51	-1,85	-2,23	-3,32
3	-2,31	-1,72	-2,28	-3,10
4	-2,07	-1,63	-2,01	-2,78
5	-2,07	-1,64	-1,80	-2,49
PEG 6000+ sulfato de sódio + água				
1	-2,90	-2,91	-3,37	-3,84
2	-2,63	-2,75	-2,68	-2,88
3	-2,42	-2,83	-2,53	-2,95
4	-2,56	-2,56	-2,47	-2,84
5	-2,26	-2,49	-2,38	-2,70

Na Tabela 12, observa-se que a ILA aumenta, se torna mais negativa, com o aumento da temperatura. Este comportamento era esperado, pois a variação da ILA se deve ao fato de que o aumento da hidrofobicidade, intensificado pelo aumento da temperatura, promove a migração de moléculas de água de solvatação do polímero da fase superior para a fase inferior. A diminuição de moléculas de água leva ao aumento da concentração de polímero na fase superior e a uma pequena diluição na fase inferior e, como consequência, um aumento da ILA. Nos sistemas formados por PEG 1500+ sulfato de sódio + água, PEG 2000+ sulfato de sódio + água, PEG 4000+ sulfato de

sódio + água, observa-se o aumento da inclinação da linha de amarração (ILA) com o aumento da temperatura quando comparados os dados para as temperaturas de 30 °C a 50 °C. Este aumento chega a até 79% no sistema PEG 4000+ sulfato de sódio + água nas linhas de amarração 2 e 3. Este comportamento era esperado porque o aumento da concentração do polímero provoca aumento da hidrofobicidade da fase superior. Sendo assim, o aumento da inclinação da linha de amarração acontece em virtude da transferência da água da fase superior para a fase inferior, resultando na diminuição da concentração de sal na fase inferior e aumento da concentração de PEG na fase superior.

Já em relação ao sistema formado por PEG 6000+ sulfato de sódio+água, foi observado o aumento da inclinação da linha de amarração com o aumento da temperatura. Esta diferença é mais acentuada quando a diferença de temperatura é maior, ou seja, quando a temperatura passa de 20 °C para 30 °C e de 40 °C para 50 °C, quando a inclinação aumenta 16% em ambos os casos. Sendo assim, pode-se observar que a ILA é um parâmetro que mede como as composições das fases variam com a modificação de propriedade do sistema.

Analisando os sistemas 2000+sulfato de sódio + água na LA 1, foi verificada uma variação crescente da ILA em relação à temperatura, sendo de 16%, 23% e 25% nas temperaturas de 30 °C, 40 °C e 50 °C, respectivamente, em relação à temperatura de 20 °C. Esta relação do aumento da linha de amarração em função da temperatura foi para todos os sistemas. Comportamento similar a este trabalho foi observado por Zafarani-Moattar e Sadeghi (2001), que verificaram que a inclinação e o comprimento das linhas de amarração aumentam com a elevação da temperatura. Resultados similares foram obtidos por Voros et al. (1993) e Mishima et al., (1995) quando estudavam sistemas contendo PEG e sal.

Segundo Da Silva e Loh (2000), a interação entre os íons do sal e o polímero, na formação do SAB, ocorre com absorção de energia, ou seja, esta interação é endotérmica. Sendo assim, o favorecimento da interação Sal-PEG levaria à diminuição da quantidade de sal a ser adicionada aos sistemas para que ocorresse a formação do SAB, logo, deslocando a curva binodal para região mais próxima aos eixos do diagrama de equilíbrio. Dessa forma, deve-se fazer a análise entrópica do comportamento do sistema.

Com o aumento da temperatura, a entropia conformacional do polímero aumenta pelo processo de enovelamento da cadeia e consequente diminuição da solubilidade em água. Desta forma, ocorre uma transferência de água da fase superior

para a fase inferior, reduzindo a concentração de sal na fase inferior e aumentando a ILA. Com essa observação, confirma-se a predominância da influência da entropia sobre a entalpia no comportamento dos SABs.

Nos diagramas de fases, pôde ser observada influência das temperaturas estudadas nos sistemas, em razão de uma pequena expansão da região bifásica quando se aumentou a temperatura. Uma tendência semelhante tem sido relatada por vários autores estudados em diferentes temperaturas, como Zafarani-Moattar e Sadeghi (2004), para PEG6000 + hidróxido de sódio; Oliveira et al. (2008), para PEG4000 + Sulfato de zinco; Carvalho et al. (2007), de PEG4000 + sulfato de sódio, PEG4000 + sulfato de lítio e PEG4000 + fosfato de potássio; Da Silva et al. (1997) para PEG1000 + fosfato bifásico de potássio.

Os sistemas PEG 1500 +sulfato de sódio+ água e PEG2000 + sulfato de sódio+ água não apresentaram variação da região bifásica com a temperatura, conforme pode ser observado abaixo (Figura 11 e 12). Já em relação aos sistemas PEG 4000 +sulfato de sódio+ água e PEG 6000 + sulfato de sódio+ água em função da temperatura pôde ser observado que, com aumento da temperatura, aumentava a inclinação da reta (Figura 13 e 14). Apesar de na região bifásica terem ocorrido modificações significativas com a temperatura, a inclinação da linha de amarração teve alteração com a variação da temperatura conforme pode ser observado na Tabela 12. Este fato indica que há uma variação insignificante da variação da capacidade calorífica das fases e, conseqüentemente, baixa variação de entalpia associada ao processo de separação.

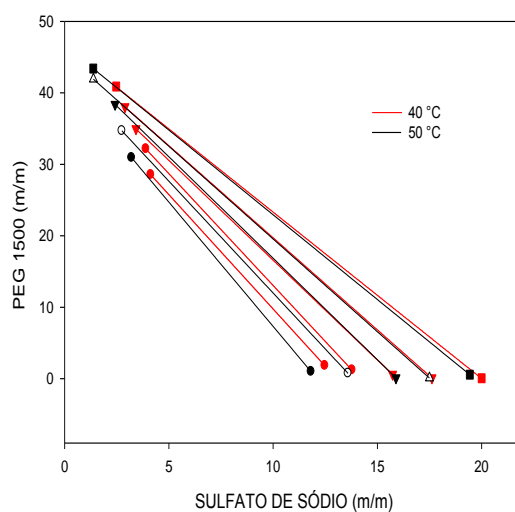
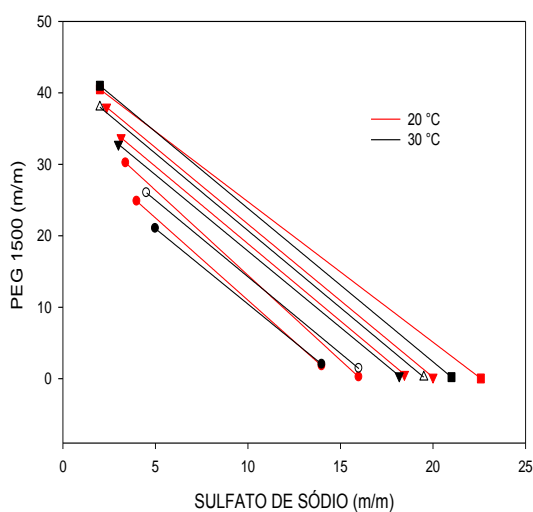


Figura 10: Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração PEG1500: a) temperatura de 20°C e 30 °C e b) temperatura de 40°C e 50°C

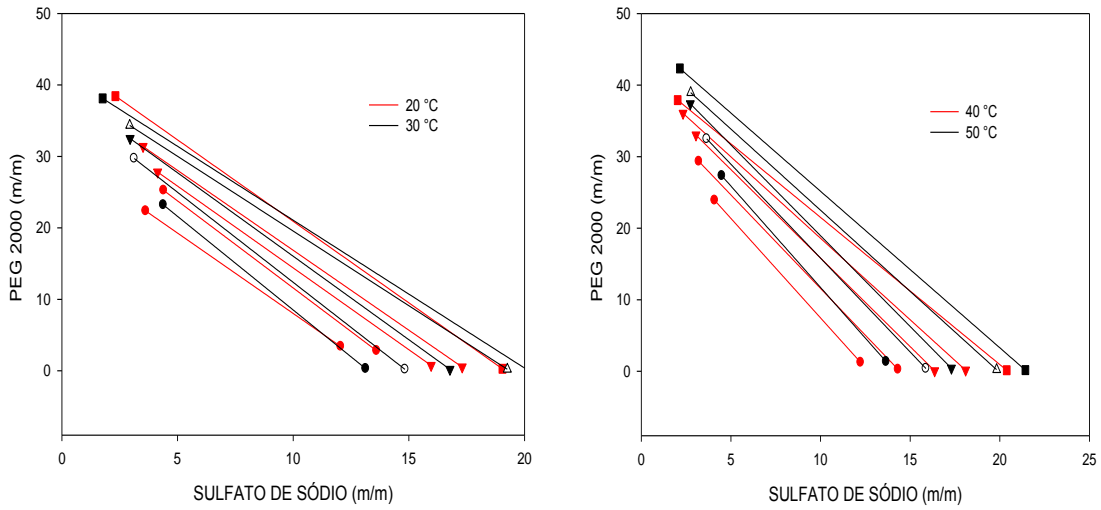


Figura 11: Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração PEG 2000: a) temperatura de 20 °C e 30 °C e b) temperatura de 40 °C e 50 °C

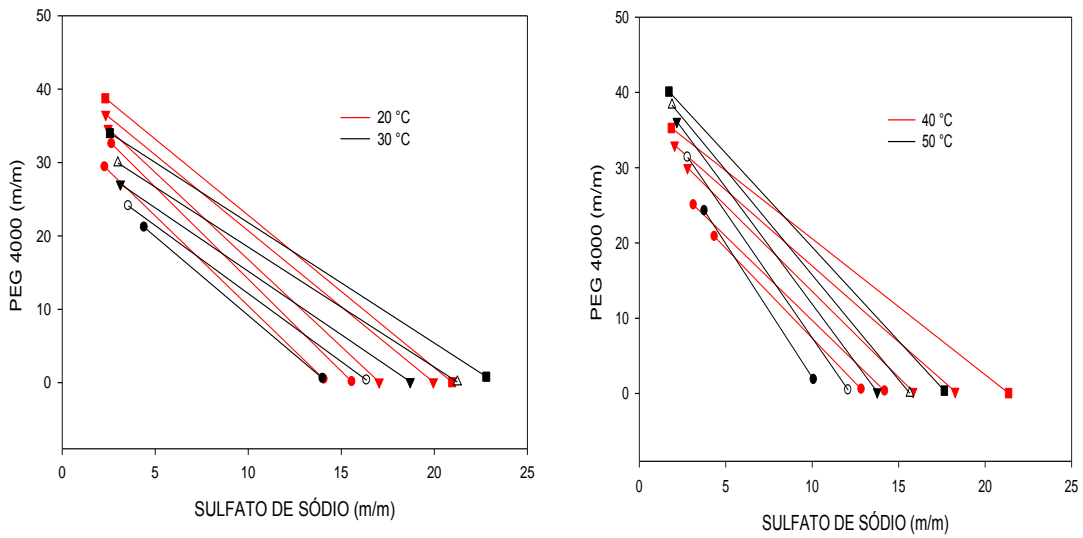


Figura 12: Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração PEG

4000: a) temperatura de 20°C e 30 °C e b) temperatura de 40°C e 50 °C

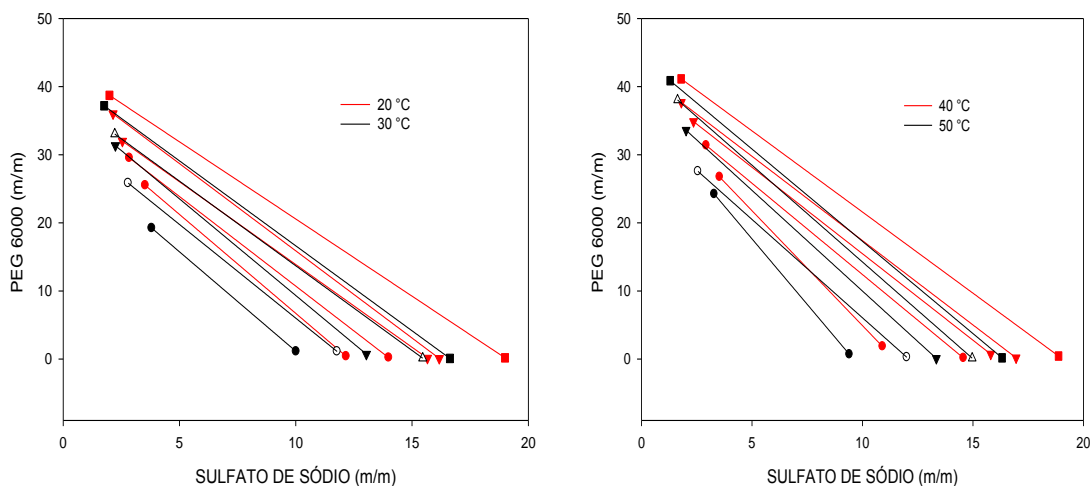


Figura 13: Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração PEG 6000: a) temperatura de 20 °C e 30 °C e b) temperatura de 40 °C e 50 °C

Efeito da massa molar do polímero nos diagramas de equilíbrio dos sistemas PEG-Sulfato de Sódio –Água

As Figuras 14 a 17 relacionam os diagramas formados por PEG (1500, 2000, 4000, 6000), sulfato de sódio e água nas temperaturas estudadas. Foi observado um aumento da região bifásica nos diagramas formados por polímero de maior massa. O PEG 6000, para todas as temperaturas de estudo, apresentou uma região bifásica maior que a dos demais polímeros. Logo, entende-se que o aumento da massa molar do polímero provoca um aumento da sua hidrofobicidade, contribuindo para que processo de segregação ocorra com menores quantidades de sal e polímero.

As Figuras 14 a 17 exemplificam como as curvas binodais tornam-se mais assimétricas e deslocam-se para concentrações menores de PEG e sal com o aumento da massa molar do polímero para sal na temperatura de estudo. Esse comportamento é atribuído à diminuição de solubilidade do PEG em água, que aumenta com a elevação da sua massa molar. Por isso, menores concentrações são requeridas para separação de fases. A fase rica em PEG satura-se em concentrações relativamente baixas com o aumento da massa molar do polímero. Essa tendência está de acordo com resultados

experimentais encontrados na literatura (Da SILVA et al., 1997; ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI, 2001; OLIVEIRA et al., 2008).

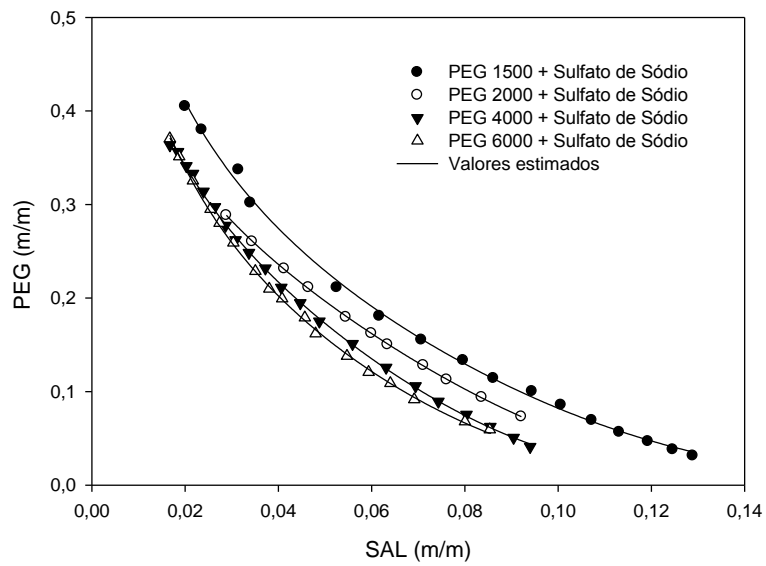


Figura 14: Efeito da massa molar do polímero no sistema na temperatura 20 °C

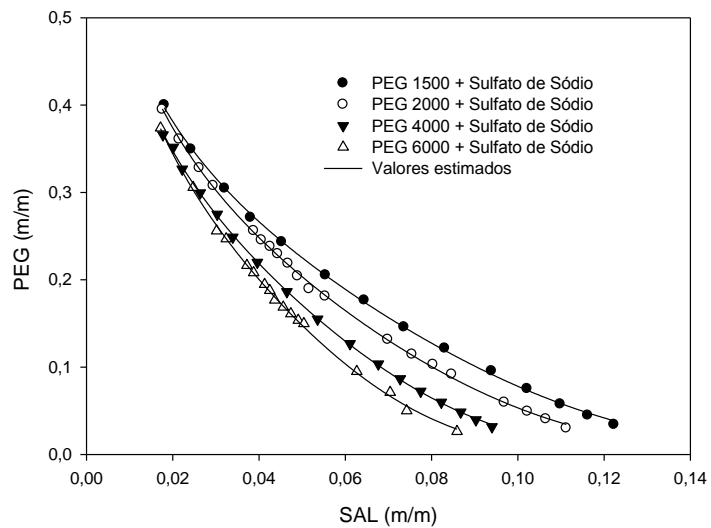


Figura 15: Efeito da massa molar do polímero no sistema na temperatura 30 °C

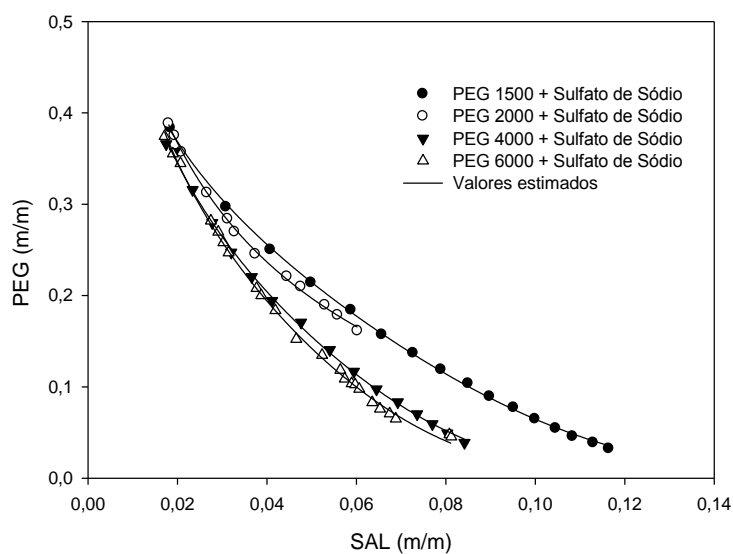


Figura 16: Efeito da massa molar do polímero no sistema na temperatura 40 °C

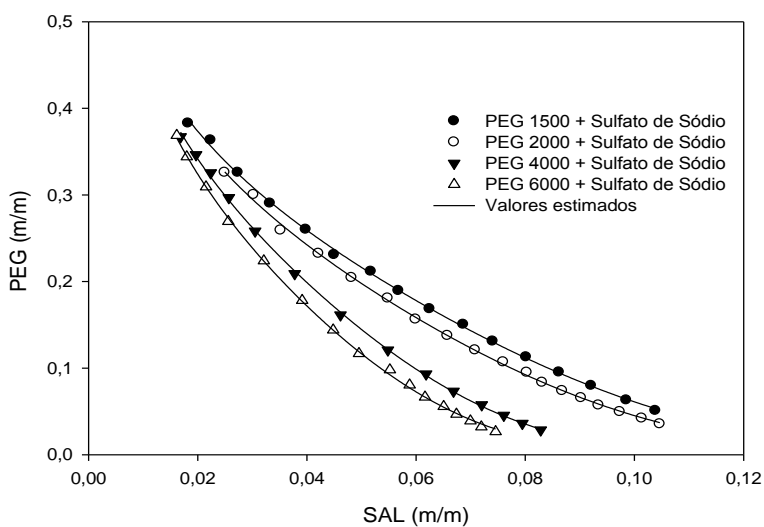


Figura 17: Efeito da massa molar do polímero no sistema na temperatura 50 °C

Nas Figuras 18 e 19, pode-se comparar o efeito da massa do PEG 1500 com PEG 2000 e o PEG 4000 com PEG 6000, respectivamente, na temperatura de 30 °C. Além do aumento da região bifásica com maior massa molar do polímero, verifica-se que existe um aumento da inclinação da linha de amarração dos sistemas na temperatura de 30 °C.

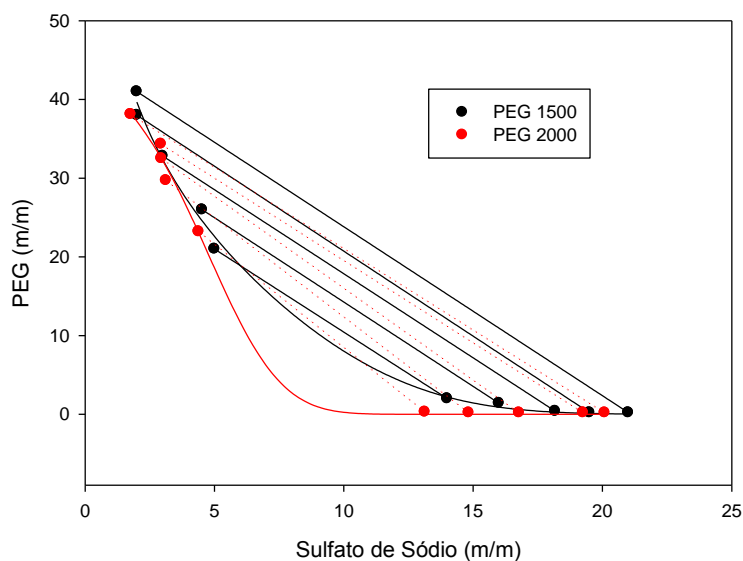


Figura 18: Efeito da massa molar no sistema de PEG 1500 E PEG 2000 na temperatura de 30 °C

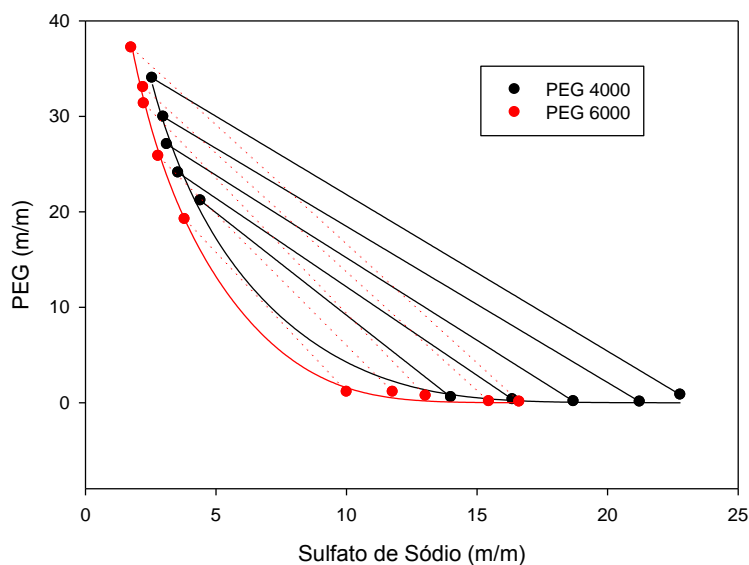


Figura 19: Efeito da massa molar no sistema de PEG 4000 E PEG 6000 na temperatura de 30 °C

Propriedades físicas

As propriedades físicas da fase superior e inferior em sistemas ternários apresentam características distintas em relação à composição e temperatura. Essas informações são necessárias para a concepção e aumento de escala de produção de

processos de extrações. Portanto, nas Tabelas de 13 a 16 estão apresentados os valores experimentais da viscosidade (η /mPa.s), da densidade (g.cm^{-3}) e do índice de refração (N_d) das fases dos sistemas compostos por PEG 1500+ sulfato de sódio+ água; PEG 2000+ sulfato de sódio+ água; PEG 4000+ sulfato de sódio+ água; PEG 6000+ sulfato de sódio+ água nas temperaturas de (20, 30, 40, 50)°C no pH 2.

Tabela 13: Densidade, índice de refração e viscosidade para sistemas compostos por PEG1500+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas

LA	Fase superior			Fase inferior		
	g.cm^{-3}	N_{1d}	$\eta_1/\text{mPa.s}$	g.cm^{-3}	N_{2d}	$\eta_1/\text{mPa.s}$
20°C						
1	1078,361	1,366	8,848	1137,345	1,355	3,549
2	1080,296	1,370	12,497	1159,921	1,357	3,699
3	1083,042	1,368	15,147	1175,624	1,353	3,749
4	1085,866	1,385	18,746	1194,085	1,357	3,849
5	1086,406	1,374	24,195	1213,742	1,362	3,899
30°C						
1	1076,995	1,358	5,849	1117,777	1,354	2,999
2	1078,803	1,373	8,898	1137,763	1,355	3,149
3	1080,585	1,376	10,398	1153,150	1,353	3,299
4	1081,026	1,369	17,146	1182,438	1,359	3,399
5	1081,943	1,369	19,447	1194,884	1,361	3,599
40°C						
1	1072,479	1,353	6,449	1125,385	1,352	2,100
2	1073,291	1,359	7,998	1143,312	1,351	2,399
3	1073,304	1,370	8,248	1151,069	1,355	2,449
4	1074,818	1,358	10,948	1177,620	1,354	2,499
5	1074,905	1,356	11,997	1190,331	1,346	2,549
50°C						
1	1061,175	1,358	23,995	1100,540	1,346	1,650
2	1063,413	1,354	26,994	1117,033	1,348	1,850
3	1066,416	1,357	32,793	1133,645	1,351	2,399
4	1067,996	1,354	39,392	1157,681	1,333	2,399
5	1071,928	1,359	43,648	1169,459	1,351	2,649

Tabela 14: Densidade, índice de refração e viscosidade para sistemas compostos por PEG 2000+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas

LA	Fase superior			Fase inferior		
	g.cm^{-3}	N_{1d}	$\eta_1/\text{mPa.s}$	g.cm^{-3}	N_{2d}	$\eta_1/\text{mPa.s}$
20°C						
1	1078,755	1,357	9,048	1117,663	1,352	2,999

2	1080,695	1,367	11,897	1136,408	1,339	3,299
3	1081,073	1,371	16,046	1154,728	1,355	3,499
4	1083,081	1,375	21,445	1175,315	1,356	3,599
5	1084,734	1,378	24,944	1189,272	1,359	3,599
30°C						
1	1108,002	1,361	7,548	1122,590	1,352	3,149
2	1074,024	1,374	16,496	1124,999	1,351	3,299
3	1076,676	1,375	14,896	1150,365	1,355	3,399
4	1080,13	1,377	17,296	1168,825	1,357	3,449
5	1080,435	1,370	21,395	1203,267	1,360	3,599
40°C						
1	1068,315	1,360	6,198	1099,715	1,349	2,099
2	1069,619	1,366	7,898	1133,984	1,350	2,249
3	1069,963	1,380	10,397	1140,626	1,351	2,399
4	1072,793	1,364	10,847	1157,021	1,354	1,699
5	1074,88	1,380	16,496	1176,971	1,355	1,599
50°C						
1	1060,114	1,352	5,898	1097,772	1,346	2,399
2	1063,308	1,352	7,898	1116,835	1,350	2,699
3	1066,031	1,354	9,048	1131,410	1,348	2,999
4	1066,931	1,373	10,597	1150,545	1,356	2,999
5	1070,074	1,366	12,947	1168,710	1,346	3,149

Tabela 15: Densidade, índice de refração e viscosidade para sistemas compostos por PEG 4000+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas

LA	Fase superior			Fase inferior		
	g.cm^{-3}	N_{1d}	$\eta_1/\text{mPa.s}$	g.cm^{-3}	N_{2d}	$\eta_1/\text{mPa.s}$
20°C						
1	1078,144	1,376	25,045	1149,029	1,355	2,699
2	1080,819	1,372	34,643	1159,059	1,353	3,599
3	1087,268	1,370	40,391	1178,408	1,355	3,749
4	1088,198	1,378	57,188	1196,385	1,360	3,749
5	1090,945	1,383	65,536	1203,422	1,361	3,899
30°C						
1	1071,487	1,369	13,497	1110,344	1,354	3,599
2	1075,533	1,374	23,145	1130,190	1,350	3,599
3	1079,572	1,370	27,444	1148,422	1,352	3,599
4	1081,384	1,365	35,242	1173,374	1,356	3,299
5	1084,344	1,380	45,940	1197,008	1,355	4,049
40°C						
1	1048,047	1,354	10,698	1132,455	1,353	2,499
2	1066,802	1,379	17,796	1109,013	1,349	3,149
3	1069,402	1,374	23,645	1132,141	1,351	3,299
4	1073,751	1,359	30,993	1142,887	1,352	3,499

5	1078,539	1,366	41,991	1186,546	1,356	3,850
			50°C			
1	1057,593	1,348	7,148	1079,030	1,345	2,100
2	1060,976	1,347	12,497	1093,508	1,345	2,250
3	1063,447	1,372	18,196	1107,898	1,351	2,100
4	1072,382	1,357	25,844	1140,012	1,351	2,399
5	1078,965	1,367	31,693	1196,175	1,342	2,699

Tabela 16: Densidade, índice de refração e viscosidade para sistemas compostos por PEG 6000+sulfato de sódio+ água em diferentes temperaturas

LA	Fase superior			Fase inferior		
	g.cm ⁻³	N _{1d}	η ₁ /mPa.s	g.cm ⁻³	N _{2d}	η ₁ /mPa.s
			20°C			
1	1075,340	1,349	25,745	1118,312	1,349	2,699
2	1078,150	1,361	42,491	1133,674	1,351	2,999
3	1079,978	1,353	54,938	1147,166	1,354	3,299
4	1082,381	1,372	62,383	1164,798	1,355	3,599
5	1084,628	1,385	71,385	1181,881	1,356	3,699
			30°C			
1	1067,907	1,358	10,678	1082,711	1,347	1,680
2	1070,650	1,355	13,947	1097,654	1,347	2,250
3	1070,699	1,368	18,046	1114,273	1,350	2,399
4	1071,228	1,361	31,543	1116,778	1,351	2,549
5	1072,405	1,359	44,790	1127,960	1,353	2,699
			40°C			
1	1061,696	1,351	15,197	1090,881	1,345	2,749
2	1064,725	1,352	19,546	1106,030	1,348	2,999
3	1068,717	1,364	32,993	1121,534	1,344	3,149
4	1071,733	1,377	43,141	1136,232	1,351	3,199
5	1074,084	1,372	54,888	1153,939	1,352	3,299
			50°C			
1	1054,527	1,345	13,397	1074,381	1,339	1,250
2	1057,551	1,355	17,246	1092,127	1,344	1,265
3	1060,799	1,349	24,045	1111,620	1,341	1,295
4	1063,405	1,367	35,742	1131,541	1,356	2,150
5	1066,207	1,372	42,691	1146,090	1,356	2,220

Na Tabela 13, observa-se que a densidade das fases superior e inferior do sistema composto por PEG 1500+sulfato de sódio+ água na temperatura de 20°C variou de 1078,361 g.cm⁻³ a 1086,406 g.cm⁻³ e 1137,345 g.cm⁻³ a 1213,742 g.cm⁻³, respectivamente. Por meio da análise dos dados, verificou-se um aumento da densidade com a elevação das concentrações dos constituintes dos sistemas, tanto na fase superior,

quanto na fase inferior. Além disso, pôde-se averiguar que a fase inferior, composta majoritariamente por sal e água, é mais densa que a fase superior, rica em PEG e água, conseqüentemente, a formação de fase será mais rápida em razão da maior densidade dos constituintes da fase inferior, principalmente. Estas observações também podem ser feitas para as temperaturas de 30 °C 40 °C 50 °C. O mesmo comportamento foi verificado para os outros sistemas compostos por PEG2000+ sulfato de sódio+ água, PEG4000+ sulfato de sódio+ água, PEG6000+ sulfato de sódio+ água, nas temperaturas estudadas, descritas nas tabelas 14,15 e 16, respectivamente.

Pôde ser verificado que a fase superior, rica em PEG, é mais viscosa que a fase inferior rica em sal. Avaliando o aumento da concentração dos constituintes nas linhas de amarração, foi constatado um aumento da viscosidade nos sistemas compostos por PEG15000+ sulfato de sódio+ água PEG2000+ sulfato de sódio+ água, PEG4000+ sulfato de sódio+ água, PEG6000+ sulfato de sódio+ água, nas temperaturas estudadas (Tabelas 13, 14 , 15 e 16). Podendo-se concluir que o aumento da viscosidade é em razão da diminuição da solubilidade do PEG com a água à medida que aumenta a concentração de PEG. Por outro lado, observou-se que o aumento da temperatura do sistema leva à diminuição da viscosidade das soluções com maior impacto sobre a solução polimérica.

No sistema PEG 1500+sulfato de sódio+água, na linha de amarração 5, a diferença da viscosidade foi 620% entre a fase superior e inferior. Segundo Rao et al. (1991), alta diferença de viscosidade entre as fases é ideal em termos operacionais, pois diminui o tempo de separação.

De acordo com Machado (1999), estudando sistemas compostos por PEG + maltodextrina, pode-se verificar o aumento da densidade e viscosidade com a elevação da concentração e da massa molar dos constituintes do sistema. Este comportamento foi observado por Kalaivani et al. (2012).

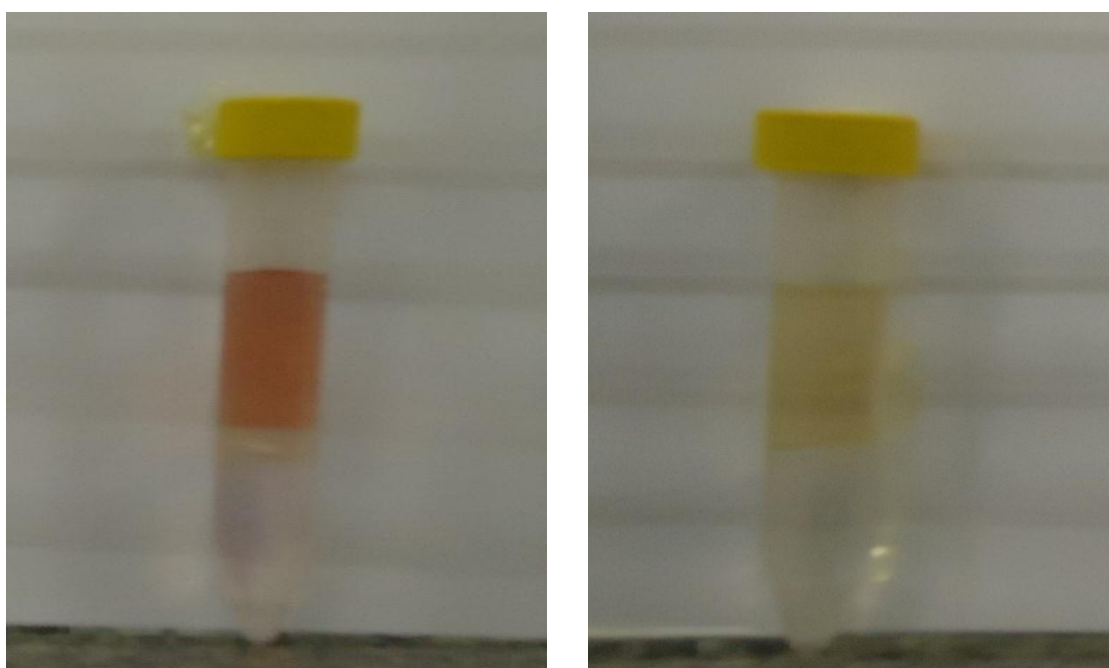
Diante disso, para o processo de extração pelo SAB, o ideal é apresentar valores de viscosidade baixos, o que é altamente benéfico em processos industriais, pois os sistemas de baixas viscosidades favorecem a transferência de massa da biomolécula entre as duas fases e melhoria na manipulação. Entretanto a escolha do sistema de maior eficiência irá depender da característica do soluto de extração.

Em relação ao índice de refração nos sistemas PEG1500+sulfato de sódio+água, PEG2000+ sulfato de sódio+ água, PEG4000+ sulfato de sódio+ água, PEG6000+ sulfato de sódio+ água para todas as temperaturas, houve uma diminuição irrelevante.

Observou-se que a fase superior apresenta valores maiores que a fase inferior, por causa do aumento da densidade, que torna a propagação de luz mais difícil. Este comportamento descrito foi também relatado na literatura para soluções contendo polímeros de diferentes massas molares (SANTOS et al., 2012).

Partição da antocianina do jamelão

Foram realizados experimentos de partição da antocianina do jamelão em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1500+ sulfato de sódio+água, PEG 2000+ sulfato de sódio+água, PEG 4000+ sulfato de sódio+água e PEG 6000+ sulfato de sódio+água, nas temperaturas de 20 °C e 40 °C, no pH 2. A Figura 25 mostra sistemas constituídos por PEG 1500+sulfato de sódio nas temperaturas de 20 °C e 40 °C, nos quais foi realizada a partição do extrato da antocianina. Pôde-se observar que o extrato se concentra na fase superior do sistema (fase rica em polímeros), fornecendo-lhe uma coloração rosa e amarela para a temperatura de 20 °C e 40 °C, respectivamente.



(a)

(b)

Figura 20: Foto da partição da antocianina no sistema formado por PEG1500+sulfato de sódio+ água pH 2: a) temperatura de 20 °C; b) temperatura de 40 °C.

As antocianinas, como os demais corantes naturais, apresentam problemas de estabilidade. A partição na temperatura de 40 °C apresentou uma cor amarela

significando que ocorreu degradação das antocianinas. A degradação pode ocorrer desde a extração, purificação dos pigmentos até o processo de estocagem. Estes são os fatores que afetam a estabilidade: estrutura e concentração, pH, temperatura, luz, presença de copigmento, associação independente, íons metálicos, enzimas, oxigênio, ácido ascórbico, açúcares e produtos de sua degradação, proteínas e dióxido de enxofre (FRANCIS, 1989; MAZZA E MINIATI, 1993; RODRIGUEZ-SAONA et al., 1999). Segundo Jackman et al. (1987), a mudança da pigmentação do vermelho para o amarelo pode ser pelo tratamento com calor; e estudos constatam que a elevação da temperatura provoca aumento logarítmico na degradação das antocianinas, com aparecimento da forma molecular chalcona (DYRBY et al. 2001).

Em razão da degradação na antocianina na temperatura 40 °C, foi quantificada a partição da antocianina somente à temperatura de 20 °C. Os valores experimentais estão descritos na Tabela 17, sendo apresentados os valores dos coeficientes de partição e os valores de recuperação teórica (%) da antocianina na fase superior. Observa-se que os valores de recuperação teórica, maiores que 84,00%, são considerados elevados para todos os sistemas avaliados. Pode-se concluir que os sistemas formados por PEG e sulfato de sódio nas condições avaliados neste trabalho são adequados para concentração da antocianina da fase superior.

Tabela 17: Coeficientes de partição e recuperação teórica da antocianina e CLA nos sistemas PEG1500+sulfato de sódio + água, PEG 2000+sulfato de sódio + água PEG 4000+sulfato de sódio + água PEG 6000+sulfato de sódio + água na temperatura de 20 °C, pH 2.

LA	PEG 1500			PEG 2000		
	CLA	KP	Ysup (%)	CLA	KP	Ysup (%)
1	25,12	25,00	97,95	20,76	11,00	91,66
2	32,51	28,00	98,21	24,25	13,00	92,85
3	36,47	29,00	97,43	29,53	21,00	97,14
4	41,70	37,50	97,50	33,79	24,00	94,73
5	45,40	41,00	92,85	41,67	32,50	95,65
LA	PEG 4000			PEG 6000		
	CLA	KP	Ysup (%)	CLA	KP	Ysup (%)
1	31,23	15,05	93,93	26,53	15,00	92,85
2	34,88	15,75	86,66	31,38	17,00	84,21
3	37,49	15,00	93,33	34,46	18,66	95,65
4	40,48	16,00	94,12	38,55	20,00	92,00
5	42,94	21,00	95,45	42,12	25,50	88,88

O efeito do comprimento da linha de amarração na partição da antocianina nos sistemas estudados é apresentado na Figura 21. Com o aumento do CLA, houve um aumento do coeficiente de partição da antocianina para a fase superior para todos os sistemas. À medida que aumenta a composição de PEG e sal, o número de polímeros envolvidos na separação da antocianina também aumenta, resultando em um maior coeficiente de partição.

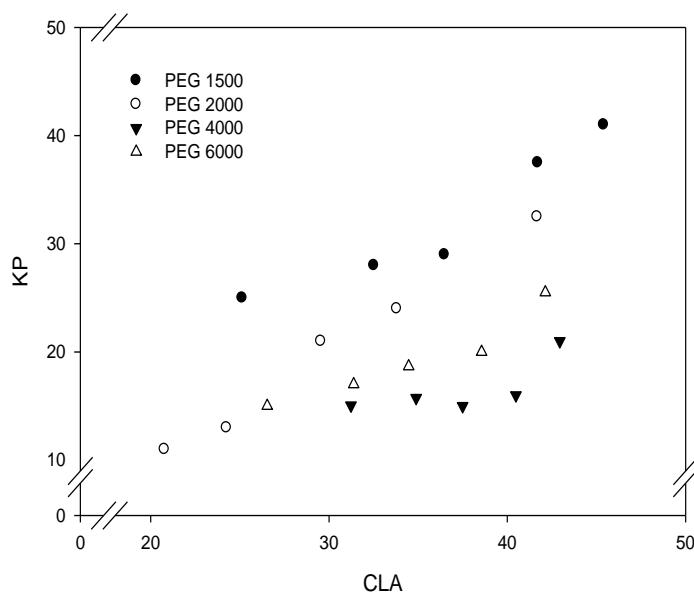


Figura 21: Coeficiente de partição (K) da antocianina em função do CLA dos SABs formados por PEG1500+sulfato de sódio + água, PEG 2000+sulfato de sódio + água, PEG 4000+sulfato de sódio + água, PEG 6000+sulfato de sódio + água na temperatura de 20°C, pH 2.

Como pode ser observado na Figura 21, o aumento da massa molar do PEG diminuiu de maneira expressiva o coeficiente de partição da antocianina, por causa do aumento da hidrofobicidade da fase superior. Este comportamento também foi observado por Mageste et al. (2009), quando estudava partição do corante carmim em sistema formado por PEG 1500 e por copolímero L35. Os autores constataram que, quando trocava o sistema do SAB PEG 1500 pelo copolímero L35, o coeficiente de partição diminuía. Este fato indica que o corante carmim é hidrofílico e não se solubiliza no interior hidrofóbico, o mesmo pode ser concluído para antocianina.

CONCLUSÃO

Foram construídos diagramas compostos por PEG 1500+ sulfato de sódio+água, PEG 2000+ sulfato de sódio+água, PEG 4000+ sulfato de sódio+água, PEG 6000+ sulfato de sódio+água, nas temperaturas de (20, 30, 40, 50) °C no pH 2. Constatou-se que o efeito da temperatura sobre os sistemas não apresentou grandes variações na região bifásica. Porém, houve um aumento na inclinação da linha de amarração à medida que a temperatura ia aumentando, podendo-se concluir que ocorreu transferência das moléculas de água da fase superior para a fase inferior. Pôde-se também constatar que o aumento da massa molar ocasionou um aumento da região bifásica em todas as temperaturas de estudo.

Foram determinados experimentalmente valores de viscosidade, densidade e índice de refração para todos os sistemas estudados. Em relação às propriedades físicas viscosidade e densidade sob o efeito da concentração, houve aumento dessas propriedades com o aumento dos constituintes dos sistemas, tanto na fase polimérica, quanto na salina. Entretanto, o índice de refração não sofre efeito significativo com o aumento da concentração.

Os sistemas aquosos bifásicos podem ser uma alternativa para a purificação da antocianina do jamelão. Este estudo revelou que as moléculas de antocianina particionam preferencialmente para fase superior, rica em macromoléculas, de cada sistema.

A partição da antocianina na temperatura de 20 °C foi maior para o sistema de PEG 1500, em razão do aumento da hidrofobicidade quando houve o aumento da massa molar do polímero. Por causa deste fato, pode-se concluir que a antocianina é hidrofílica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P. A. Chromatography and Partiton of cells and cell fragments. *Nature*, 177, 771-774; 1956.
- ALBERTSSON, P-Ä. Partition of Cell Particles and Macromolecules. Stockolm: Almquist & Wiksells, 231 p. 1960
- ALBERTSSON, P.A. Partition of cell and macromolecules. New York: John Wiley, 1986
- ALEJANDO, N.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Aqueous two-phase recovery of bionanoparticles: A miniaturization study for the recovery of bacteriophage T4. *J. Chromatogr. B*, 854, 13-19, 2007.
- AKAMA, Y.; TONG, A.; ITO, M.; TANKA, S. The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system. *Talanta*, 48, p. 1133-137, 1999.
- AMARESH, S. P.; SHREELA, M.; REGUPATHI, I.; MURUGESAN, T. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly (ethylene glycol) 4000 + diAmmonium Hydrogen Phosphate + Water at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data* 53, p. 1574–1578, 2008
- ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; GODDARD, E. D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. *Langmuir*, v. 3, p. 25-31, 1987
- ANNUNZIATA, O.; LOMAKIN, A.; PANDE, J.; OGUN, O.; BENEDEK, G. B. Effect of polyethylene glycol on the liquid–liquid phase transition in aqueous protein solutions. *Biophysics*, v. 99, n. 22, p. 14165-14170, 2002.
- BAILEY, F. E.; KOLESKE, J. V.; *Alkylene Oxides and Their Polymers*; Marcel Dekker Inc, 1991
- BANIK, R. M.; SANTHIAGU, A.; KANARI, B.; SABARINATH, C.; UPADHYAY, S. N. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, p. 337-348, 2003.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; de, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 90, p. 727-733, 2005
- BEIJERINCK, M. W. Ueber eine eigentümlichkeit der löslichen stärke. *Zbl. Bakt. II Natur.* 627, p. 697-699; 1896.
- BOBBIO F. O.; BOBBIO P. A. *Introdução á química de alimentos*, 3 e, São Paulo, Livraria Varela, 2003.
- BRITO, F. A.; LIMA, L. A.; RAMOS, M. F. S.; NAKAMURA, M. J.; CAVALHER-MACHADO, S. C.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M.; SAMPAIO, A. L. F.

Pharmacological study of anti-allergic activity of syzygium cumini (L) Skeels. Brazilian Journal of medical and biological research, v. 40, n.1, p. 100-879, 2007.

BRITO, G. M. Termodinâmica de partição de partição do ânion $[\text{CO}(\text{NO}^2)_6]^{-3}$ em sistemas aquosos. 2007, 91f Dissertação (mestrado em agroquímica) Universidade Federal de viçosa, Viçosa- MG, 2007.

BRASIL. Aprova o Regulamento Técnico que aprova o uso dos aditivos alimentares, coadjuvantes de tecnologia, estabelecendo suas funções e limites, e veículos para suplementos vitamínicos e ou minerais. Resolução RDC no 24, de 15 de fevereiro de 2005. ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. Brasília, 16 de fevereiro de 2005.

CALVI, J. P.; FRANCIS, F. J., Stability of concord grape (V. Labrusca) anthocyanins in model systems. Journal of Food Science 43 5, p. 1448-1458, 1978

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

CEMEROGLU, B., VELIOGLU, S.; ISIK,S., Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. Journal of food science 59 (6), p. 1216-1217, 1994.

CHEN, J. P. Partitioning and separation of a-lactalbumin and b-lactoglobulin in PEG/potassium phosphate two phase systems. Journal of Fermentation and Bioengineering. v. 73 (2), p. 140–147, 1992.

COIMBRA, J.S. R.; TEIXEIRA, J. Engineering Aspects of Milk and Dairy Products. Boca-Raton, CRC Press, 2009.

CRUZ, M. S.; CHUMPITAZ, L. D. A.; ALVES, J. G. L. F.; MEIRELLES, A. J. A. Kinematic viscosities of Poly (ethylene glycols). J. Chem. Eng. Data, v. 45p. ,61-63. 2000.

DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; JÚNIOR, J. A.; GUIMARÃES, R. O. MARTINS, J. P. Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixture of triblock copolymers L35 and F68 with Na₂SO₄, LiSO₄, or MgSO₄. Journal chemical eng. Data,51, p. 2260-2264, 2006.

DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; FRANCISCO, K.R.; CARDOSO, M. V. C.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R. PEO-[M(CN)5NO]_x- (M=Fe, Mn or Cr) Interraction as driving force in the partitioning of the pentacynonitrosylmetallate anion in ATPS: The strong effect of the central atom. J. Phys. Chem.. B. 112, p. 11669-11678, 2008.

DA SILVA, C. A. S., COIMBRA, J. S. R., ROJAS, E. E. G., MINIM, L. A., DA SILVA, L. H. M. Partitioning of caseinomacropetide in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 857, p. 205–210. 2007.

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

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly (ethylene oxide) and electrolytes (or dextran). *J. Phys. Chem. B*, v. 104, p. 10069- 10073, 2000.

DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; DE AQUINO, R. A. N.; FRANCISCO, K. R.; CARDOSO, M. V. C.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R.; *J. Phys. Chem. B*, 110, p. 23540. 2006.

DA SILVA, L. H. M.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Equilibrium phase behavior of poly (ethylene glycol) + Potassium Phosphate+ water Two- phase systems at various pH and temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, v 42, p. 398-401, 1997.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Fundamental studies of biomolecules partitioning in aqueous two-phase systems. *Biotech. Bioeng.* v. 34, p. 1000–1014, 1989.

DOBRY, A.; BOYER-KAWENOKI, F. J. Phase separation in polymer solution. *Polymer Sci.* 2, p. 90-100, 1947.

DYRBY, M. WESTERGARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink models systems. *Food Chemistry*, 72, 431- 437, 2001.

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. *J. chromatogr. A*, 1118, p. 244-252, 2006.

FERREIRA, L. A.; TEIXEIRA, J. A. Salt effect on the aqueous two-phase system PEG 8000 – Sodium Sulfate. *J. Chem. Eng. Data*, 56, p. 133-137, 2011.

FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP, C. W. ANDERSEN, L. B. “Princípios das Operações Unitárias”. 2ª Edição, Editora LTC, Rio de Janeiro, 1982.

FRANCIS, F.J. A new group of food colorants. *Trends in Food Science e Technology*, Cambridge, v. 3, p. 27-30. 1992.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In MARKAKIS, P. Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, 1982.

FULEKI, T. FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, v. 3, n 30, p. 72, 1968.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001.

GOMES, R.P. *Fruticultura brasileira*. 9. ed. São Paulo: Nobel, p.269. 1983

GRABER, T. A.; MARIA, E. T.; ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Influence of Molecular Weight of the Polymer on the Liquid-Liquid Equilibrium of the

Poly(ethylene glycol) + NaNO₃ + H₂O System at 298.15 K. J. Chem. Eng. Data, 46, 765–768. 2001

GRABER, T. A.; GALLEGUILLOS, H.; ; ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. a. Refractive index, density and viscosity in the NaNO₃ + H₂O+ Poly(ethylene glycol) system at various temperature. J. Chem. Eng. Data, V. 47, p. 174-178, 2002.

GRABER, T. A. G.; HECTOR, R. C.; CAROL, C.; MARIA, E. T. Density, refractive index, viscosity, and electrical conductivity in the Na₂CO₃+ POLY(ethylene glycol)+ H₂O system from (293,15 to 308,15 K) J. Chem. Eng. Data, v. 49, p. 1254-1257, 2004.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S. DAWAR, R. traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. J. ethnopharmacol., v.76, p. 233-238, 2000.

GUNDUZ U. Evaluation of viscosidade of polymer-water solutions used in aqueous two-phase systems. J. Chromatography B, 680, p. 262-266, 1996.

HAGHTALAB, A.; MOKHTARANI, B.; MAURER, G. Experimental results and thermodynamic modeling of the partitioning of lysozyme, bovine serum albumin, and α -amylase in aqueous two-phase systems of PEG and K₂HPO₄ or Na₂SO₄. Journal chem.. eng data, 48, p. 1170-1177, 2003.

HARAGUCHI, L.H.; MOHAMED, R.S.; LOH, W; PESSÔA FILHO, P.A. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. . Fluid Phase Equilibria , v 215, p. 1- 15, 2004

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

HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. Natural Food Colorants. Loandon: Blackie Academic, p. 1-103, 1996

HUSTED, H., CORNER K.H., KULA, M.R. Partition in aqueous two-phase systems, Trends Biotech, v. 3, p. 139-144, 1985.

IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins and related flavylum salts. Tetrahedron, v. 39, n. 19, p. 3005-3038, 1983.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Antocyanins and betalains. In HERDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J.D. (Eds) Natural food colorants. 2 ed. Londres: Chapman hall, p. 245-309. 1996.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A. Review: separation, separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analisis. Journal of food Biochemistry, 11, p. 279-308, 1987.

JAYAPAL, M.; REGUPATHI, I; MURUGESAN, T. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly(ethylene glycol) 2000 + Potassium Citrate + Water at (25, 35, and 45) °C. J. Chem. Eng. Data. 52, p. 56-59, 2007

KALAIVANI, S.; SRIKANTH, C. K.;REGUPATHI, I. Densities and Viscosities of Binary and Ternary Mixtures and Aqueous Two-Phase System of Poly(ethylene glycol) 2000 +Diammonium Hydrogen Citrate + Water at Different Temperatures. J. Chem. Eng. Data, 57, p. 2528–2534. 2012

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SIMPSON, B. K.; KISHIMURA, H. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. Process Biochemistry. v. 40, p. 3061–3067, 2005.

KU, H.; TU, C. Densities and viscosities of binary and ternary Mixtures of Ethanol, 2-Butanone, and 2,2,4-Trimethylpentane at T) (298.15, 308.15, and 318.15) K. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 50, p. 608-615, 2005.

KULA, M. R., Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. Biosseparation,v. 1, p. 181-189, 1990.

KULA, M. R., KRONER, K. H., HUSTED, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. Adv. Biochem. Engn, v. 24, p. 73-118, 1982.

LEE, R.; TEJA, A. S. Viscosities of Poly (ethylene glycols). J. Chem. Eng. Data, v. 35, p. 385-387, 1990.

LEMOS; L.R.; SANTS, I. J. B.; RODRIGUES, G. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. D. H.; CARVALHO, R. M.M. Phase compositions of aqueous two-phase systems formed by L 35 and salts at different temperature, J. Chem. Eng. Data 55, 1193-1199, 2010.

LEMOS; L. R.; PATRÍCIO, P. R.; RODRIGUES, G. D.; DE CARVALHO, R. M. M.; DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed poly (etheylene oxide) 1500 and different electrolytes ((NH₄)₂ SO₄, ZnSO₄ and K₂HPO₄): Experimental and correlation. Fluid phase equilibria, 305, p. 19-24, 2011.

LERNADÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. “Green chemistry”- Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. Química nova, 26, p. 123-129, 2003.

LEVINE , I. N., Physical Chemistry,6 ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 2011.

LORENZI. H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Computação gráfica Osmar Gomes, 357p, 2002

LOUROS, C. L. S. Extraction of biomolecules with aqueous two phases systems. 2009. Dissertação.Universidade de Aveiro. Departamento de química. 2009.

MACHADO, F. L. C., Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietileno glicol-maltodextrina-água, 1999. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Minas gerais. 1999.

MAGESTE, A. B.; DE LEMOS, L. R.; DA SILVA, M. C. H.; FERREIRA, G. M. D.; 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. *J. Chromatography A* 1216, p. 7623-7629.2009

MARKAKIS, Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, p. 163-180. 1982.

MARTINS, L.; COUTINHO, E.L.; PANZANI, C.R.; CHAVIER, N.J.D. Fruteiras nativas do Brasil e exóticas. Campinas:CATI: Graça D´Auria, 75 p. 2002

MARTINS, J. P.; DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; SENRA, T. D. A.; FERREIRA, G. M. D.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; Liquid-liquid equilibria of na aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. *Journal Chemical Engineering Data*, v. 54, p. 2891-2894, 2009.

MARTINS, J. P.; DE OLIVEIRA, F. C.; COIMBRA, J. S. R.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; DO NASCIMENTO, I. S. B. Equilibrium phase behavior for ternary mixtures of poly(ethylene) glycol 6000+ water+ sulfate salts at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, 53, p. 2441-2443. 2008.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the Stabilization of Anthocyanins in food Products. *Food Chemistry*, Vol. 25, p 207-205, 1987.

MAZZA, G.; MINIATI, E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca raton: CRC press. p. 362, 1993

MEI, L.-H.; LIN, D-Q; HAN, Z-Z. Densities and viscosities of polyethylene glycol+salt+water systems at 20C. *J.Chem. Eng. Data*, v. 40, p. 1168-1171, 1995.

MERCK. Disponível em: <<http://chemdat.merck.de>>. Acesso em: 10/01/2013.

MISHIMA, K.; NAKATANI, K.; NOMIYAMA, T.; MATSUYAMA, K.; NAGATANI, M.; NISHIKAWA, H. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and dipotassium hydrogenphosphate. *Fluid Phase Equilibria*, v. 107, p. 269-276, 1995.

MORÁVKOVÁ, L., WAGNER, Z., SEDLÁKOVÁ Z., LINEK J. Volumetric behaviour of binary and ternary liquid systems composed of ethanol, isooctane, and toluene at temperatures from (298.15 to 328.15) K. Experimental data and correlation. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 43, p. 1906–1916, 2011.

MURRELL, J. N.; JENKINS, A. D. Properties of Liquids and Solutions, Second Edition. NewYork: J. Wiley, 303 p. 1994

MURUGESAN, T.; PERUMALSAMY, M. Liquid-liquid equilibria of poly- (ethylene glycol) 2000 + sodium citrate + water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. *J. Chem. Eng. Data* 50, p. 1392-1395, 2005.

NINNI, L.; FUNG, W. H.; MEIRELLES, A. J. A. Kinematic viscosities of poly(Ethylene glycols). J. Chem. Eng. Data. V 45, p. 61-63. 2000.

OSTWALD, W.; HERTEL, R. H. Kolloidchemische reaktionen zwischen solen von Eiweibkörpern und polymeren Kohlehydraten. I Kolloid Z. Z. Polym. 47, p. 258-268. 1929.

OLIVEIRA, F. C.; COIMBRA, J. S. R.; SILVA, L. H. M.; ROJAS, E. E. G.; SILVA, M. C. H. Ovomucoid partitioning in aqueous two-phase systems. Biochemical Engineering Journal. v. 47, p. 55-60, 2009.

OLIVEIRA, R. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. SILVA, L. H. M.; FONTES, M. P. F. Liquid-Liquid Equilibria of Biphasic Systems Composed of Sodium Citrate + Polyethylene(glycol) 1500 or 4000 at Different Temperatures. Journal of Chemical & Engineering Data, v. 53, p. 895-899, 2008.

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

PERIN, J.D. Efeito de diferentes copigmentos sobre a estabilidade de antocianinas extraídas de berinjela (*Solanum melongena* L.). Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 1999.

PIMENTEL, F. A. Avaliação do métodos de obtenção e da estabilidade de pigmentos de semente de urucum (*Bixa orellana*, L.). Viçosa, MG: UFV, 1995. 132p. Dissertação-Universidad Federal de Viçosa, 1995.

RAHBARI-SISAKHT, M.; TAGHIZADEH, M., ELIASSI, A. Densities and viscosities of binary mixtures of poly (ethylene glycol) and poly (propylene glycol) in water and ethanol in the 293,15-338,15 k temperature range. J. Chem. Eng. Data, v. 48, p. 1221-1224, 2003.

REGUPATHI, I.; SRIKANTH, C. K.; SINDHU, N. Liquid-liquido equilibrium of poly(ethylene glycol) 2000+ diammonium hydrogen citrate+ water system at different temperatures. J. chem.. eng. Data. V. 56, p. 3643-3650, 2011.

REGUPATHI, I.; SHREELA, M.; GOVINDARAJAN, R.; AMARESH, S. P.; MURUGESAN, T. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly(ethylene glycol) 6000 + Triammonium Citrate + Water Systems at Different Temperatures. J. Chem. Eng. Data 54, p. 1094-1097, 2009

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE ASILE, M. J.; KENNELLY ENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. Food Chemistry, Amsterdam, v. 109, p. 883-890, 2008.

RODRIGUES, G. D.; DA SILVA, M. D. H.; DA SILVA, L. H. M.; PAGGIOLLI, F. J.; MINIM, L.A.; COIMBRA, J. S. R. Liquid- liquid extraction of metal íons without use of organic solvent. *Sep. purify. Technol.*62, p. 687-693, 2008.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Color and pigment stability of red radich and red fleshsd potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science*, v. 64, 451-456, 1999.

ROGERS, R. D.; BOND, A. H.; BAUER, C. B. Aqueous Biphasic Systems for Liquid/Liquid Extraction of f-Elements Utilizing Polyethylene Glycols. *Sep. Sci. Technol.* v. 28, p. 139-153, 1993

ROMMEL, A.; WROLSTAD, R. E.; HEATHERBELL, D. A.; Blackberry juice and wine: processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance. *Journal food sci.* 57, p. 385-410, 1992.

SANTESOON, S.; RAMIREZ, I. B. R.; VIBERG, P.; JERGIL, B.; NILSSON, S. Affinity two-phase partitioning in acoustically levitated drops. *Anal. Chem.* 76, p. 303-308, 2004.

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*, v. 187-188, p. 489, 2001.

SANTOS, I. J. B.; CARVALHO, R. M. M.; DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M. Phase Diagram, Densities, and the Refractive Index of New Aqueous Two-Phase System Formed by PEO1500 + Thiosulfate + H₂O at Different Temperatures. *J. Chem. Eng.Data*, 57, p. 274–279. 2012

SILVA, S. R. Extração e estabilidade de pigmentos antociânicos de frutos de Maria-Pretinha (*Solanum americanum*, Mill). Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG , 76f. 2006.

SILVÉRIO, S. C.; MADEIRA, P. P.; RODRÍGUEZ,O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. $\Delta G(\text{CH}_2)$ in PEG-Salt and Ucon-Salt Aqueous Two-Phase Systems. **J. Chem. Eng. Data**. v. 53,p. 1622–1625, 2008.

SMITH, J.M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M.M. Introdução á termodinâmica da engenharia química. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos, p. 697, 2000.

SNYDER, S. M.; COLE, K. D.; SZLAG, D. C. Phase composed of polyethylene Glycol and various salts at 25 °C. *J. Chem. EW ht*, v. 37, p. 288-274, 1992.

STRIGHETA, P.C., Anthocianinas - estudos de novas fonts. *Rev. Bras. Cor. Nat.*, v. 1, p. 188-193, 1992.

SUN, X. ZHU, K., ZHOU, H. Protein extraction from defatted wheat germ by reverse micelles: Optimization of the forward extraction. *Journal of Cereal Science*, v. 48, p. 829–835, 2008.

TUBIÒ, G.; PELLEGRINI, L.; NERLI, B. B.; PICO, G. A. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate J. Chem. Eng. Data, 51, p. 209-212, 2006

URBAN, M. W. Vibrational spectroscopy of molecules and macromolecules on surfaces. New York: John Wiley & Sons, . 384 p.1993

VEIGAS, J. M.; NARAYAN ARAYAN ARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. Food Chemistry. Amsterdam v. 105, p. 619-627, 2007.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C.; CASTILHO, P. M.; COUTO, M. Quantificação de compostos fenólicos, antocianinas, carotenóides e determinação da atividade antioxidante em brácteas de hibiscos (*Hibiscus sabdariffa* L.). In: Congresso Brasileiro Brasileiro de Ciência e Tecnologia e Tecnologia de Alimentos Alimentos SEMINÁRIO LATINO AMERICANO E DO CARIBE DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS, 15., 2008, Belo Horizonte. Ciência e inovação para o desenvolvimento sustentável. Belo Horizonte: SBCTA, 1 CD-ROM. 2008.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Caracterização das propriedades funcionais do Jamelão. Boletim de pesquisa e desenvolvimento- Embrapa Clima temperado, Pelotas, n 79, 26p, 2006.

VIZZOTTO, M.; FETTER, M. R. Jambolão: o poderoso antioxidante. Embrapa Clima Temperado. Artigo de Divulgação na Mídia. Publicado em 2009. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/jambolao_Marcia.pdf. Acesso em: 12 de novembro de 2012.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. P.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. Revista Brasileira nutrição Clinica ;23, p. 141-149, 2008.

VON ELBE, L. H.; SCHAWARTZ, S. J. Colorants. In; FENEMA, O. R. Food Chemistry. 3 ed. New York: Marcel Dekker. p. 651-722. 1996.

VOROS, N.; PROUST, P.; FREDENSLUND, A. Liquid-liquid phase equilibria of aqueous twophase systems containing salts and polyethylene glycol. Fluid Phase Equilibria, v. 90, p.333-353, 1993.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMZEHZADEH, S.; HOSSEINZADEH, S; fluid phase equilibr. 268,p. 142, 2008.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. Fluid Phase Equilib. v. 181, p. 95-112, 2001.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R.; HAMID, 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. 147-153, 2004.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; MEHRDAD, A. measurement and correlation of density for PEG+ H₂O+ NaHSO₄, NaHPO₄ and Na₂HPO₄ at three temperatures. J. Chem. Eng. Data, v. 45, p. 386-390, 2000.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SALABAT, A.; KABIRI-BADR, M. Volumetric properties of PEG + salt + water. J. Chem. Eng. Data, v. 40, p.559-562, 1995.

ZASLAVSKY, B.Y. Aqueous Two-Phase Partitioning, Physical chemistry and bioanalytical applications. New York: Marcel Decker, 696 p., 1995.

ZHOU, Q., SONG, Y., YU, Y., HE , H., ZHANG, S. Density and Excess Molar Volume for Binary Mixtures of Naphthenic Acid Ionic Liquids and Ethanol. Journal of Chemical and Engineering Data, v, 55, p. 1105–1108, 2010