



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA

EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO E PARTIÇÃO DE ALBUMINA
DE SORO BOVINO E LISOZIMA EM SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS ENVOLVENDO PEG E SAIS

CAMPINAS – SP

2020

AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA

EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO E PARTIÇÃO DE ALBUMINA
DE SORO BOVINO E LISOZIMA EM SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS ENVOLVENDO PEG E SAIS

*Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título
de Doutora em ENGENHARIA QUÍMICA.*

Orientadora: PROFA. DRA. ROBERTA CERIANI

Coorientador: PROF. DR. ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA AMANDA CRISTINA DE
OLIVEIRA, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ROBERTA CERIANI.

CAMPINAS – SP

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

OL4e Oliveira, Amanda Cristina, 1982-
Equilíbrio líquido-líquido e partição de albumina de soro bovino e lisozima em sistemas aquosos bifásicos envolvendo PEG e sais / Amanda Cristina de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Roberta Ceriani.
Coordenador: Elias de Souza Montelero Filho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Equilíbrio líquido-líquido. 2. Sistemas aquosos bifásicos. 3. Extração líquido-líquido. 4. Proteínas. 5. Polietileno glicol. I. Ceriani, Roberta, 1976-. II. Montelero Filho, Elias de Souza. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Liquid-liquid equilibrium and partitioning of bovine serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems involving PEG and salts

Palavras-chave em inglês:

Liquid-liquid equilibrium
Aqueous biphasic systems
Liquid-liquid extraction
Protein

Polyethylene glycol

Área de concentração: Engenharia Química

Títuloção: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Roberta Ceriani [Orientador]

Cintia Bernardo Gonçalves

Sônia Maria Alves Bueno

Jose Guilherme Lembi Ferreira Alves

Hosiberto Batista de Sant'Ana

Data de defesa: 28-07-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas deste trabalho:
- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-1121-0864>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6504632546327101>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA em 28 de julho de 2020 pela banca examinadora constituída pelos doutores.

Profa. Dra. Roberta Ceriani - Presidente e Orientadora
FEQ / UNICAMP
(Videoconferência)

Dra. Cintia Bernardo Gonçalves
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / USP
(Videoconferência)

Profa. Dra. Sonia Maria Alves Bueno
FEQ / UNICAMP
(Videoconferência)

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves
Universidade Federal de Lavras
(Videoconferência)

Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana
Universidade Federal do Ceará
(Videoconferência)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedicatória

A Deus, aos meus pais, Elio e Islene
(in memoriam), ao meu esposo,
Anderson e ao meu filho, Thiago.

Agradecimentos

A Deus, por direcionar todos os meus caminhos.

Aos meus pais, Elio Cândido de Oliveira e Islene Aparecida de Oliveira (*in memoriam*), pelo alicerce ao longo de toda a minha vida.

Ao meu querido esposo, Anderson Lopes Bonfim, pelo apoio emocional, financeiro e pela paciência durante a confecção desta tese.

Ao meu amado filho, Thiago de Oliveira Lopes, que mesmo tão pequenino foi muito importante nesta etapa da minha vida.

Aos meus queridos irmãos, Wyner, Alessandra, Aretha por sempre torcerem pela minha vitória.

Aos meus sobrinhos, Carlos Eduardo, Lucas Gabriel e Gabriel Henrique por proporcionarem inúmeros momentos de alegria.

Ao meu eterno orientador, Prof. Dr. Martin Aznar (*in memoriam*), pelos ensinamentos, carisma e exemplo de profissional dedicado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Roberta Ceriani, pela extrema paciência e pelos valiosos ensinamentos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Elias de Souza Monteiro Filho, pelo empenho em colaborar com este trabalho.

À UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz) por me proporcionar um período de docência que foi importantíssimo para o meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Mariana Conceição da Costa por disponibilizar o Laboratório de Equilíbrio de Fases (LEF) para realização de parte desta tese.

À coordenação do Laboratório ExTrAE da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP por permitir o uso do espectrofotômetro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por ter proporcionado todas as condições para o desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Sistemas aquosos bifásicos (SABs) são uma eficiente alternativa para a recuperação e purificação de diversos bioprodutos. Os efeitos das partições de biomoléculas nesses sistemas são muito complexos e as diferentes teorias utilizadas para explicar os resultados experimentais ainda são pouco compreendidas. Nesse contexto, o objetivo desta tese foi obter dados de equilíbrio líquido-líquido de diferentes tipos e características para avaliar o comportamento de partição de duas proteínas modelos, a albumina de soro bovino (BSA) e a lisozima (LS), em alguns desses sistemas. Os SABs estudados foram de dois tipos: polietilenoglicol (PEG 1500, 4000 e 6000) /sal (inorgânico ou orgânico) e líquido iônico (LI) ([bmim]BF₄)/ sal (orgânico). O estudo de partição foi realizado apenas no primeiro tipo de sistema. Os sais utilizados foram o acetato de sódio, citrato de sódio, citrato de potássio, tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, tiosulfato de sódio, fosfato dipotássico e fosfato monopotássico. Os sistemas com tiosulfato de sódio e [bmim]BF₄ foram avaliados nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C, e os demais SABs a 30 °C, mesma temperatura das partições. Nos diagramas de fases destes sistemas foram estudadas, dependendo do tipo de SAB, a influência da temperatura, da massa molar do PEG e do pH. A qualidade das linhas de amarração foi validada pelas equações de Othmer e Tobias e Bancroft e a modelagem dos dados experimentais de ELL foi realizada utilizando o modelo NRTL (*Non-Random Two-Liquid*), apresentando desvios globais médios na faixa de 0,456 a 1,133%, com exceção do SAB do tipo PEG1500/tiosulfato de sódio, cujo desvio obtido foi de 1,781%. A capacidade de *salting-out* dos SABs formados por PEG e sal a 30°C foi verificada e comparada com valores de energia de Gibbs de hidratação (ΔG_{hyd}) dos ânions dos sais de alguns sistemas. Os resultados de partição mostraram que os melhores sistemas para separação da BSA e lisozima a 30°C foram, respectivamente, PEG 4000/ tartarato de sódio e potássio e PEG 1500/ citrato de potássio, nos quais foram observadas eficiências de extração entre 80 - 93 % para o primeiro e 94 - 98% para o segundo.

Palavras chave: Equilíbrio líquido-líquido (ELL), Sistema aquoso bifásico (SAB), Extração líquido-líquido, Proteínas, Polietileno glicol (PEG).

ABSTRACT

Aqueous two-phase systems (SABs) are an efficient alternative for the recovery and purification of several bioproducts. The effects of biomolecule partitions in these systems are very complex and the different theories used to explain the experimental results are still poorly understood. In this context, the objective of this thesis was to obtain liquid-liquid equilibrium data (LLE) of ATPSs of different types and characteristics for apply them for the partition of two model proteins, the bovine serum albumin (BSA) and the lysozyme (LS), in some of systems studied. The studied ATPSs were of two types: polyethylene glycol (PEG 1500, 4000 or 6000) / salt (inorganic or organic) and ionic liquid (IL) ([bmim] BF₄) / salt (organic). Partitioning was evaluated only on the first type of system, since this IL is hydrolysable, as detected later. The salts used were sodium acetate, sodium citrate, potassium citrate, sodium tartrate, sodium and potassium tartrate, sodium thiosulfate, potassium dihydrogen phosphate and potassium hydrogen phosphate. The systems with sodium thiosulfate and [bmim] BF₄ were evaluated at temperatures of 20, 30 and 40 °C, while the other ATPSs only at 30°C, the same temperature of the partitions. In these systems, according to type of ATPS, the influence in the phase diagrams of temperature, molar mass of PEG and pH were studied. Quality of the tie lines was validated by the equations of Othmer-Tobias and Bancroft, and modeling of LLE experimental data was performed using the NRTL model (Non-Random Two-Liquid), for which average global deviations were between 0.456 and 1.133%, but for the ATPSs of type PEG1500/ sodium thiosulfate the deviation was 1.781%. In addition, the *salting-out* capacity of ATPSs formed by PEG and salt at 30°C was verified and compared with values of hydration Gibbs energy (ΔG_{hyd}) of the salts' anions of each system. Results of the partitions showed that the more suitable systems for BSA and lysozyme separation at 30°C were PEG 4000 / sodium and potassium tartrate and PEG 1500 / potassium citrate, respectively, for which extraction efficiencies between 80 - 93% for the first and 94 - 98% for the second were observed.

Key words: Liquid-liquid equilibrium (LLE), Aqueous two-phase systems (ATPSs), Liquid-liquid extraction, Protein, Polyethylene glycol (PEG).

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1: Diagramas de fases para sistemas aquosos bifásicos, expressos em coordenadas retangulares (a) e triangulares (b).	28
Figura 2. 2: Estruturas químicas de cátions e ânions mais comuns na formação dos LIs	32
Figura 2. 3: Estruturas químicas e nomenclaturas de alguns LIs do tipo imidazólio	32
Figura 3. 1: Esquema da vista lateral da célula de equilíbrio (medidas em cm): 1) Entrada de água; 2) Saída de água; 3) Coletor de amostra; 4) Área de armazenamento da amostra; 5) Área de circulação de água; 6) Septo de vedação.	46
Figura 3. 2: Seção experimental para obtenção das curvas binodais.	48
Figura 3. 3: Obtenção das linhas de amarração: (a) Tubos de vidro em repouso no banho termostático; (b) Fases próximas ao menisco de separação das fases na seringa em repouso no banho termostático com tubos de ensaio revestidos com isolante de algodão.	49
Figura 3. 4: Esquema de coleta das fases: (a) Equilíbrio líquido-líquido; (b) Coleta de parte da fase superior; (c) Material coletado próximo ao menisco; (d) Fases superior e inferior, coletadas na etapa (c), em repouso na seringa.	50
Figura 4. 1: Validação do diagrama de fases do sistema formado por PEG 4000 (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água a 25 °C	57
Figura 4. 2: Influência da massa molar do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C em diferentes valores de pH.	59
Figura 4. 3: Influência do pH nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C.	60
Figura 4. 4: Diagramas de fases para os sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C e análise da influência do PEG na inclinação das linhas de amarração.....	66
Figura 4. 5: Diagramas de fases para os sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C e análise da influência do pH na inclinação das linhas de amarração.	67
Figura 4. 6: Influência do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.	70
Figura 4. 7: Influência do pH nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.	70
Figura 4. 8: Influência do PEG na inclinação das linhas de amarração dos diagramas de fases dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.	71

Figura 4. 9: Influência do pH na inclinação das linhas de amarração dos diagramas de fases dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C	75
Figura 4. 10: Efeito da temperatura nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes massas molares de PEG.....	78
Figura 4. 11: Efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.	79
Figura 4. 12: Análise do comprimento da linha de amarração (CLA) em função da composição global de sal ($100w_2$) para os sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas e massas molares de PEG	83
Figura 4. 13: Diagramas de fases e influência da temperatura na inclinação das LAs dos sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) a 20, 30 e 40°C.	84
Figura 4. 14: Influência da massa molar do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + fosfato dipotássico (K_2HPO_4) ou citrato de potássio ($K_3C_6H_5O_7$) (2) + água (3) a 30°C.....	86
Figura 4. 15: Influência da massa molar do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tartarato de sódio ($Na_2C_4H_4O_6$) ou tartarato de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6$) (2) + água (3) a 30°C.....	87
Figura 4. 16: Comparação das curvas binodais deste trabalho a 30°C com dados da literatura em diferentes temperaturas para sistemas formados por: (a) PEG 4000 (1) + tartarato de sódio (2) + água (3); (b) PEG 6000 (1) + citrato de potássio (2) + água (3).....	88
Figura 4. 17: Diagramas de fases e influência da massa molar do PEG na inclinação das LAs dos sistemas formados por PEG (1) + citrato de potássio ($K_3C_6H_5O_7$) ou fosfato dipotássico (K_2HPO_4) (2) + água (3) a 30°C.....	93
Figura 4. 18: Diagramas de fases e influência da massa molar do PEG na inclinação das LAs dos sistemas formados por PEG (1) + tartarato de sódio ($Na_2C_4H_4O_6$) ou tartarato de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6$) (2) + água (3) a 30°C.	93
Figura 4. 19: Comparação com a literatura (HAN <i>et al.</i> , 2010) e efeito da temperatura nas curvas binodais dos SABs formados por [bmim]BF ₄ (1) + acetato de sódio ($NaC_2H_3O_2$), citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) ou tartarato de sódio ($Na_2C_4H_4O_6$) (2) + água (3).	96
Figura 4. 20: Efeito do tipo de sal nas curvas binodais dos sistemas formados por [bmim]BF ₄ (1) + acetato de sódio ($NaC_2H_3O_2$), citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) ou tartarato de sódio ($Na_2C_4H_4O_6$) (2) + água (3) em diferentes temperaturas.....	97

Figura 4. 21: Diagramas de fases e influência da temperatura na inclinação das LAs dos sistemas formados por [bmim]BF ₄ (1) + acetato de sódio (NaC ₂ H ₃ O ₂), citrato de sódio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇) ou tartarato de sódio (Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆) (2) + água (3) a 30°C.	99
Figura 4. 22: Influência dos ânions dos sais nas curvas binodais formadas por PEG (1) + tiossulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃), tartarato de sódio (Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆) ou tartarato de sódio e potássio (KNaC ₄ H ₄ O ₆) (2) + água (3) a 30°C	102
Figura 4. 23: Influência dos ânions dos sais nas curvas binodais formadas por PEG (1) + fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄) ou citrato de potássio (K ₃ C ₆ H ₅ O ₇) (2) + água (3) a 30°C.	102
Figura 4. 24: Influência dos ânions dos sais nas curvas binodais formadas por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C: tiossulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃); tartarato de sódio (Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆), tartarato de sódio e potássio (KNaC ₄ H ₄ O ₆), citrato de sódio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇), formiato de sódio (NaCHO ₂) ou succinato de sódio (Na ₂ C ₄ H ₄ O ₄)	103
Figura 4. 25: Influência do CLA e massa molar do PEG no coeficiente de partição (K _P) da albumina de soro bovino (BSA) ou lisozima (LS) nos sistemas do tipo PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C: (A) e (B) citrato de potássio; (C) e (D) tiossulfato de sódio.....	115
Figura 4. 26: Influência do CLA e massa molar do PEG no coeficiente de partição (K _P) nos sistemas do tipo PEG (1) + tartarato de sódio (2) + água (3) a 30°C: (A) albumina de soro bovino (BSA); (B e C) lisozima (LS).....	116
Figura 4. 27: Influência do CLA no coeficiente de partição (K _P) nos sistemas do tipo PEG (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 30°C: (A) albumina de soro bovino (BSA); (B) lisozima (LS)	116
Figura 4. 28: Influência do CLA no coeficiente de partição (K _P) nos sistemas do tipo PEG (1) + fosfato de potássio, pH 7,0 (2) + água (3) a 30°C: (A) albumina de soro bovino (BSA); (B) lisozima (LS).	117
Figura 4. 29: Eficiência de extração em função da CLA para o sistema formado por PEG (1) + tiossulfato de sódio (2) + água (3) a 30°C.....	120
Figura 4. 30: Eficiência da extração da lisozima (LS) em função da CLA para os SABs formados por PEG (1) + sal (2) + água a 30°C.	120
Figura 4. 31: Eficiência da extração da albumina de soro bovino (BSA) em função da CLA para os SABs formados por PEG (1) + sal (2) + água a 30°C	121
Figura 4. 32: Influência do eletrólito no coeficiente de partição (K _P) da albumina de soro bovino (BSA) nos sistemas do tipo PEG 4000 ou 6000 (1) + sais tartaratos (2) + água (3) a 30°C..	123
Figura 4. 33: Influência do eletrólito no coeficiente de partição (K _P) da lisozima (LS) nos sistemas do tipo PEG 1500 (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.	123

Figura A 1: Curvas binodais do SAB formado por PEG 4000 (1) + tampão citrato de sódio (2), pH 5,0 + água (3) a 25°C.....	148
Figura A 2: Diagrama de fases dos SABs formados por PEG 1500 (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C em diferentes pHs. Comparação com dados da literatura (NASCIMENTO et al., 2018).....	149
Figura D 1: Curvas de absorção a 280 nm de solução de BSA ou lisozima em água.	167
Figura F 1: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG 1500 (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.....	169
Figura F 2: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG 4000 (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.....	170
Figura F 3: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG 6000 (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.....	171
Figura F 4: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG (1) + citrato de potássio (2) + água (3) a 30°C.....	172
Figura F 5: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG (1) + fosfato dipotássico (2) + água (3) a 30°C.....	173
Figura F 6: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG (1) + tartarato de sódio (2) + água (3) a 30°C.	174
Figura F 7: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 30°C.	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1: Características dos compostos químicos utilizados nesta tese de doutorado	45
Tabela 3. 2: Características das proteínas utilizados neste trabalho	45
Tabela 4. 1: Dados das curvas binodais dos sistemas formados por PEG 4000 (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 25°C.	56
Tabela 4. 2: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por PEG 4000 (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 25°C.....	56
Tabela 4. 3: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para os sistemas formados por PEG 4000 (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 25°C	56
Tabela 4. 4: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C	62
Tabela 4. 5: Dados para análise das linhas de amarração (LAs) da Tabela 4. 4 para os sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C.....	64
Tabela 4. 6: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C.....	68
Tabela 4. 7: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.....	72
Tabela 4. 8: Dados para análise das linhas de amarração (LAs) da Tabela 4.7 para os sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C	74
Tabela 4. 9: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C	76
Tabela 4. 10: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) para os sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.....	80
Tabela 4. 11: Dados para análise das linhas de amarração (LAs) da Tabela 4.10 para os sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.....	82
Tabela 4. 12: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.....	85
Tabela 4. 13: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.	90
Tabela 4. 14: Dados para análise das linhas de amarração (LAs) da Tabela 4.13 para os sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.....	92

Tabela 4. 15: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.....	94
Tabela 4. 16: Dados das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por [bmim]BF ₄ (1) + sal (2) + água (3) em diferentes temperaturas.	98
Tabela 4. 17: Parâmetros das Equações (3.9 e 3 .10) para os sistemas formados por [bmim]BF ₄ (1) + sal (2) + água (3) em diferentes temperaturas.	100
Tabela 4. 18: Energia de Gibbs de hidratação dos íons (ΔG_{hyd}) de alguns sais deste trabalho	100
Tabela 4. 19: Parâmetros de interação binária regredidos para o modelo NRTL e desvios médios quadráticos (Eq. 3.15) obtidos para as interações entre os componentes dos SABs formados por PEG (1) + sal (2) + água (3): sistemas a 30°C e com variação de temperatura	105
Tabela 4. 20: Coeficientes de partição (K_P , Eq. 3.11) e eficiência de extração (% ϵ , Eq. 3.12) da albumina de soro bovino (BSA) em sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.....	110
Tabela 4. 21: Coeficientes de partição (K_P , Eq.3.11) e eficiência de extração (% ϵ , Eq.3.12 ou 3.13) da lisozima (LS) em sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C	111
Tabela A 1: Dados das curvas binodais para o sistema: PEG 4000 (1) + tampão citrato de sódio (2), pH 5,0 + água (3) a 25°C.	148
Tabela B 1: Dados das curvas binodais para o sistema: PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C e pressão atmosférica ^a	150
Tabela B 2: Dados experimentais da curva binodal para o sistema PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C e pressão atmosférica ^a	152
Tabela B 3: Dados experimentais da curva binodal para o sistema formado por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas e pressão atmosférica ^a	154
Tabela B 4: Dados experimentais da curva binodal para o sistema PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C e pressão atmosférica ^a	157
Tabela B 5: Dados experimentais da curva binodal para o sistema [bmim]BF ₄ (1) + sal (2) + água (3) em diferentes temperaturas e pressão atmosférica ^a	160
Tabela C 1: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para o sistema PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C	162
Tabela C 2: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para os sistemas formados por PEG (1) +tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.	163
Tabela C 3: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para os sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.....	164

Tabela C 4: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para os sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.....	165
Tabela C 5: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para o sistema [bmim]BF ₄ (1) + sal (2) + água (3).....	166

NOMENCLATURA

A_{ij}	Parâmetro de interação binária ij
A_{ji}	Parâmetro de interação binária ji
α_{ij}	Parâmetro de não-aleatoriedade da mistura ij
α_{ji}	Parâmetro de não-aleatoriedade da mistura ji
B_{ij}	Parâmetro de interação binária ij
B_{ji}	Parâmetro de interação binária ji
BSA	Albumina de soro bovino
$[BIO]_{sal}$	Concentração da biomolécula na fase rica em sal
$[BIO]_{PEG}$	Concentração da biomolécula na fase rica em PEG
C_i	Concentração de proteína total na fase superior ou inferior [mg/l]
CLA	Comprimento da linha de amarração
ELL	Equilíbrio líquido-líquido
f_i	Fugacidade da espécie i pura [atm]
\hat{f}_i	Fugacidade da espécie i em solução [atm]
ILA	Inclinação da linha de amarração
K_p	Coefficiente de partição
K_i	Coefficiente de partição da espécie i
LI	Líquido iônico
LA	Linha de amarração
LS	Lisozima
NRTL	Non-Random Two-Liquid
P	Pressão absoluta [atm]
P_c	Ponto crítico
PEG	Polietilenoglicol
T	Temperatura [Kelvin ou °C]

w_i	Fração mássica da espécie i no ELL
x_i	Fração molar da espécie i na fase líquida

Sobrescrito

l	Fase líquida
T	Fase superior
B	Fase inferior
I	Fase superior
II	Fase inferior
M	Mistura

Subscrito

B	Fase inferior
p	Partição por concentração total
T	Fase superior

Letras Gregas

γ_i	Coefficiente de atividade da espécie i na solução
μ_i	Potencial químico da espécie i
α, β	Fases em equilíbrio
$\% \varepsilon$	Eficiência de extração
π	Número de fases

Sinais

\wedge	Propriedade em solução
Δ	Operador diferença

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.2 – OBJETIVO GERAL	21
1.3 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1- SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.....	23
2.1.1-APLICAÇÕES DOS SABs.....	26
2.1.2-FUNDAMENTOS SOBRE A FORMAÇÃO DOS SABs	27
2.1.3 – EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM SABs.....	29
2.2- LÍQUIDOS IÔNICOS (LIs)	30
2.3- POLIETILENO GLICOIS (PEGs).....	33
2.4 – PROTEÍNAS.....	33
2.4.1- ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA)	33
2.4.2-LISOZIMA.....	34
2.5 – PUBLICAÇÕES SOBRE PARTIÇÕES EM SABs E ELL	35
2.6– EQUILÍBRIO-LÍQUIDO-LÍQUIDO	40
2.7 – MODELAGEM TERMODINÂMICA	41
2.7.1- MODELO NRTL (<i>Non-Random, Two-Liquid</i>).....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1- MATERIAL	44
3.1.1- REAGENTES QUÍMICOS	44
3.1.2- EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS	45
3.2- SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS DESTE TRABALHO	47
3.3 – DIAGRAMA DE FASES.....	47
3.3.1 – CURVAS DE SOLUBILIDADE.....	47
3.3.2 –LINHAS DE AMARRAÇÃO: EXPERIMENTO E ANÁLISE	48
3.4 – PARTIÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS.....	52
3.4.1 – PREPARO DOS SABs PARA PARTIÇÃO	52
3.4.2 – MEDIDA DO pH DAS FASES	52
3.4.3 – EQUAÇÕES PARA A ANÁLISE DAS PARTIÇÕES	53
3.4.4 – MODELAGEM DOS DADOS EXPERIMENTAIS	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55

4.1- VALIDAÇÃO DA TÉCNICA EXPERIMENTAL	55
4.1.1- <i>TURBIDIMETRIA E METODOLOGIA DE MERCHUK et al. (1998)</i>	55
4.2- EXPERIMENTOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO	57
4.2.1- <i>SISTEMA DO TIPO 1: PEG + TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO + ÁGUA</i>	57
4.2.2- <i>SISTEMA DO TIPO 2: PEG + TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO + ÁGUA</i>	68
4.2.3 – <i>SISTEMA DO TIPO 3: PEG + TIOSSULFATO DE SÓDIO + ÁGUA</i>	76
4.2.4- <i>SISTEMAS DO TIPO 4: PEG + SAL + ÁGUA A 30°C</i>	85
4.2.5 – <i>SISTEMA DO TIPO 5: [bmim]BF₄ + SAIS ORGÂNICOS + ÁGUA</i>	95
4.2.6– <i>INFLUÊNCIA DOS ÂNIOS DOS SAIS NAS CURVAS BINODAIS</i>	100
4.3 - MODELAGEM TERMODINÂMICA	104
4.4- RESUMO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ELL	106
4.5- PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS	108
4.5.1- <i>RESULTADOS OBTIDOS</i>	108
4.5.2 – <i>INFLUÊNCIA DO CLA NO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO</i>	114
4.5.3 – <i>INFLUÊNCIA DO CLA NA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO</i>	119
4.5.4 – <i>EFEITO DO SAL NA PARTIÇÃO</i>	122
4.6- RESUMO DOS RESULTADOS DA PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS	124
5. CONCLUSÕES	125
6. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS.....	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
APÊNDICE A- COMPARAÇÃO COM TRABALHOS DA LITERATURA.....	148
APÊNDICE B- CURVAS BINODAIS DOS EXPERIMENTOS DE ELL	150
APÊNDICE C- PARÂMETROS DA EQUAÇÃO DE MERCHUK ET AL. (1998)	162
APÊNDICE D – CURVAS DE CALIBRAÇÃO	167
APÊNDICE E – CÁLCULO DAS INCERTEZAS DO ELL	168
APÊNDICE F – TIE LINES EXPERIMENTAIS E CALCULADAS	169

1. INTRODUÇÃO

Sistemas aquosos de duas fases ou bifásicos (SABs) são frequentemente propostos como um meio adequado de extração líquido-líquido para a separação de diversos compostos químicos, dentre eles produtos biológicos.

Os SABs mais comuns são gerados pela mistura de um par de polímeros hidrofílicos (polímero /polímero), um polímero com um sal (polímero /sal) ou dois sais diferentes (sal /sal). Esses sistemas foram propostos em meados do século XX e, desde então, têm sido considerados como alternativas poderosas aos sistemas convencionais de extração líquido-líquido para o isolamento de bioprodutos. Eles compartilham uma série de vantagens importantes, como versatilidade, biocompatibilidade, baixo custo e excelente desempenho de purificação para uma variedade de moléculas e produtos. No entanto, os SABs ainda carecem de uma aplicação significativa em escala industrial (PEREIRA e COUTINHO, 2020).

A extração líquido-líquido usando sistemas de duas fases baseados em solventes orgânicos é amplamente utilizada na indústria química, mas não obteve amplo reconhecimento no campo da biotecnologia devido à baixa solubilidade das proteínas nesses sistemas e à tendência desses solventes em desnaturar tais biomoléculas (SANTHI *et al.*, 2020).

Apesar dos grandes progressos em biotecnologia, o custo dos processos a jusante ainda é um desafio para o sucesso dos processos comerciais de biomateriais (TAGHAVIVAND *et al.*, 2014). Em outras palavras, esses métodos mais comumente utilizados para purificar materiais biológicos são, muitas das vezes, caros devido ao uso de várias unidades operacionais, alto custo dos reagentes e dificuldades em aumentar a escala. Assim, o desenvolvimento de métodos de purificação para a manutenção da atividade biológica, sem os problemas mencionados acima, tem atraído a atenção dos pesquisadores. (MORADI e SHAHROUZI, 2020). SABs formados por líquido iônico (LI)/sal e polietileno glicol (PEG)/sal têm se tornado potenciais substitutos para esses sistemas tradicionais (PLOTKA-WASYLKA *et al.*, 2017, YAZDABADI *et al.*, 2019).

SABs envolvendo PEG e sais apresentam vantagens devido ao baixo custo, rápida separação de fases e baixa viscosidade. Além disso, são considerados benéficos ambientalmente, disponíveis comercialmente e biocompatíveis (HAMTA e DEGHANI, 2017; HUANG *et al.*, 2020). No entanto, em altas concentrações do sal pode ocorrer desnaturação de biomoléculas (PEREIRA e COUTINHO, 2020).

LIs são um grupo de sais formados por ânions orgânicos ou inorgânicos e cátions orgânicos volumosos com pontos de fusão abaixo de 100 ° C (TRUJILLO-RODRIGUEZ *et al.*,

2019), apresentando, portanto, pressão de vapor baixa ou desprezível à temperatura ambiente. Por esse motivo, são considerados solventes ecológicos em comparação aos solventes orgânicos convencionais (PLOTKA-WASYLKA *et al.*, 2017).

Os SABs formados por LI e sal são vantajosos devido à ausência de solventes orgânicos voláteis, eficiência de extração elevada, ambiente suavemente biocompatível, além de apresentarem pouca formação de emulsão (GONZALEZ-MARTIN *et al.*, 2019). Portanto, a sustentabilidade ambiental desses sistemas combinada com as propriedades únicas dos LIs gera uma promissora metodologia biocompatível de extração (VENTURA *et al.*, 2017). No entanto, apesar de serem descritos como plataformas promissoras para a extração e separação de proteínas, LIs baseados em imidazólio podem suscitar algumas preocupações de biocompatibilidade e biodegradabilidade (BELCHIOR *et al.*, 2020).

Os principais fatores que influenciam a partição de biomoléculas, ainda são muito complexos e pouco compreendidos. Vários estudos teóricos e experimentais tentaram revelar e desenvolver modelos e relações termodinâmicas para caracterizar os mecanismos de separação de fases e particionamento de solutos. No entanto, seu amplo uso ainda foi limitado devido à sua complexidade e ao número de combinações possíveis (PEREIRA e COUTINHO, 2020).

Portanto, são necessários esforços adicionais para revelar completamente a natureza desses sistemas e, assim, permitir o desenvolvimento de modelos preditivos de separação de fases. Da mesma forma, considerando a infinidade de solutos que podem ser particionados /separados com essas plataformas e prevendo a implementação em larga escala, o estabelecimento de modelos confiáveis para prever o particionamento de solutos é de extrema importância (PEREIRA e COUTINHO, 2020). Neste contexto, este trabalho propõe o uso de diferentes tipos de SABs para um melhor entendimento desse complexo comportamento de partição de bioprodutos.

1.2 – OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi estudar experimentalmente SABs de diferentes tipos e características para disponibilizar na literatura um amplo material experimental que possibilite a avaliação do comportamento de partição de diversos solutos, tais como proteínas, fármacos, metais, dentre outros. E, além disso, analisar o comportamento de partição de proteínas modelo em sistemas aquosos formados por PEG e sais.

1.3 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo geral desta tese foi alcançado a partir de duas etapas:

- ✓ Determinação dados de equilíbrio líquido-líquido de SABs formados por líquido iônico ([bmim]BF₄) e sais (acetato de sódio, tartarato de sódio e citrato de sódio) ou PEGs (1500, 4000 ou 6000) e sais (tiosulfato de sódio, citrato de potássio, citrato de sódio, tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, fosfato monopotássico e fosfato dipotássico) em diferentes temperaturas (20, 30 e 40 °C);

- ✓ Análise da partição da albumina de soro bovino (BSA) e lisozima (LS) em alguns dos sistemas do tipo PEG/sal obtidos experimentalmente a 30°C.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

SABs são conhecidos desde o final do século 19. Em 1896, Beijerinck descobriu que soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, formavam misturas turvas que, em repouso, separavam-se espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era rica em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases (GHAFARI, *et al.*, 2019).

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 (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Em 1958, Albertsson propôs sistemas de duas fases compostos por polietilenoglicol (PEG) e dextrana para a separação de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, e outros (ALBERTSSON, 1958). Além da mistura do tipo polímero/polímero, esse pesquisador também formou SABs misturando um polímero e um sal inorgânico (ALBERTSSON, 1986; GÓMEZ e MACEDO *et al.*, 2019; RESCHKE *et al.*, 2014).

Tiselius *et al.* (1963) deixaram evidente a grande potencialidade de aplicação dos SABs quanto à partição ou purificação de materiais, desde proteínas até células. Como o solvente é a água em ambas as fases e geralmente se encontra presente em grande quantidade, estes sistemas fornecem um ambiente ameno para as biomoléculas, evitando assim mudanças em suas estruturas e perda das atividades biológicas (SANTHI *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2019).

Os Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) ou, em inglês, Aqueous Two-Phase Systems (ATPSs) são compostos de duas espécies químicas hidrofílicas, que quando misturadas em determinadas faixas de composição e temperatura, dividem-se em duas fases com composições diferentes, em equilíbrio termodinâmico (VIEIRA *et al.*, 2019). Esses sistemas são tipicamente formados por misturas aquosas de dois polímeros (ALBERTSSON, 1958; BAI *et al.*, 2019), um polímero e um sal (BASKARAN *et al.*, 2018; JIMÉNEZ *et al.*, 2020;

MURUCHI *et al.*, 2019;), ou dois sais (GÓMEZ e MACEDO *et al.*, 2019; GUO *et al.*, 2020). Outros SABs, formados por um polímero ou LI e um carboidrato (GHASEMZADEH *et al.*, 2019; YAZDABADI *et al.*, 2019;) ou surfactante (MORANDEIRA *et al.*, 2017), também foram relatados, mas os estudos ainda estão em estágio inicial.

SABs do tipo polímero/polímero são formados quando pares de polímeros solúveis em água são misturados acima de uma concentração crítica, induzindo a formação de duas fases. Desde o final da década de 1950, vários sistemas desse tipo foram caracterizados para diferentes fins (ALBERTSSON, 1958; ALBERTSSON, 1986; ASENJO E ANDREWS, 2011, CASTRO *et al.*, 2020) e até hoje, a formação de fases de sistemas com dois polímeros é compreendida de forma incompleta (SADEGHI E MAALI, 2016).

A combinação polímero/sal, o segundo tipo de SAB descoberto em meados da década de 1950 (ALBERTSSON, 1986), é formado pela dissolução de um polímero solúvel em água e sal inorgânico (ou orgânico) acima de concentrações críticas, promovendo uma fase inferior, rica em sal e outra superior, rica em polímero (PEREIRA E COUTINHO, 2020). Nas últimas décadas, os sistemas polímero/sal foram o tipo de SAB mais amplamente estudado, devido às suas inúmeras vantagens em relação à outros tipos, tais como baixa tensão interfacial, taxas de separação de fases rápidas e altas, e baixo custo, o que os torna práticos para o processamento a jusante (GHAFFARI *et al.*, 2019).

Além dos SABs amplamente investigados à base de polímeros, Gutowski e colaboradores (2003) relataram a possibilidade de criar sistemas bifásicos misturando líquidos iônicos (LIs) e sais inorgânicos (ou SABs do tipo sal/ sal) em soluções aquosas, levando a uma infinidade de combinações com vantagens notáveis, como baixa viscosidade, separação rápida de fases e polaridades ajustáveis (BELCHIOR *et al.*, 2020).

Recentemente, tem se investido em SABs com sais orgânicos como componentes formadores de fase, como por exemplo, sais de citrato, tartarato, acetato e formiato (GHAFFARI *et al.*, 2019; GÓMEZ e MACEDO *et al.*, 2019; MALPIED *et al.*, 2008; NEMATIKANDE e SHEKAARI, 2013; SILVÉRIO *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2010; ZAFARANI-MOATTAR E HAMZEHZADEH, 2005), como alternativas mais sustentáveis.

Além desses três tipos de SABs, vários outros sistemas têm sido formados através da mistura de uma ampla variedade de compostos, como por exemplo: sistemas aquosos micelares bifásicos (AMTPS), micelar e reverso, usando surfactantes (aniônicos, catiônicos, ou não iônicos); SABs baseados em LI com polímeros, carboidratos, aminoácidos e outros; baseados em copolímeros; composto por solventes eutéticos profundos e SABs compostos de

solventes orgânicos hidrofílicos, principalmente álcoois de cadeia curta. Embora interessantes, esses sistemas também são mais complexos (PEREIRA E COUTINHO, 2020).

O sistema de extração tradicional usando solventes orgânicos é amplamente utilizado industrialmente, porém as desvantagens relacionadas a estes solventes, tais como toxicidade, inflamabilidade e alto custo em aplicações industriais (YAZDABADI *et al.*, 2019), causam muito esforço para substituir esses sistemas pelos SABs (SANTHI *et al.*, 2020).

SABs podem ser utilizados como sistemas de extração líquido-líquido com vantagens sobre a extração convencional de processamento a jusante. Além disso, esses sistemas são técnicas benéficas para a separação e purificação de várias moléculas biológicas, tais como antioxidantes, ácidos nucleicos, alcalóides, proteínas, antibióticos e anticorpos. Sendo assim, tais sistemas podem ser um processo alternativo de pré-tratamento para baixos rendimentos em métodos caros, como cromatografia, precipitação e outros (MORADI e SHAHROUZI, 2020).

Dependendo do tipo de SAB, é possível obter uma variedade de cenários de processamento a jusante, por exemplo, obtendo extrações seletivas, concentrando solutos diluídos ou removendo quantidades significativas de contaminantes e compostos desnaturantes (PEREIRA E COUTINHO, 2020).

Uma propriedade importante associada aos SABs, e que lhes dá uma vantagem significativa quando comparados aos clássicos sistemas com solventes orgânicos, é possuírem regiões interfaciais com baixo valor de tensão interfacial (SOUZA *et al.*, 2018). Para aplicação em processos de separação de biomoléculas, esta característica possibilita a transferência das biopartículas pela interface com um risco mínimo de ocorrerem alterações estruturais nas biomoléculas particionadas, como por exemplo: proteínas, células e membranas. (BORGES, *et al.*, 2016; YAZDABADI *et al.*, 2019). Além disso, uma vez que ambas as fases são compostas de água, esses sistemas têm um efeito estabilizador na estrutura proteica, fornecendo um ambiente não desnaturador para materiais biológicos, evitando perda das atividades biológicas (SANTHI *et al.*, 2020; SHAHBAZMOHAMMADI *et al.*, 2019).

Apesar de todos os esforços acadêmicos enfatizando essas vantagens, sua aplicação ainda se limita predominantemente a pequenos processos laboratoriais e de escalas piloto, como confirmado no grande número de revisões de literatura focadas nos SABs (PEREIRA *et al.*, 2020).

2.1.1-APLICAÇÕES DOS SABs

Na última década, foram publicados, aproximadamente, 100 artigos baseados em aplicações de SABs em cada ano. Tais trabalhos focaram, principalmente, na separação ou purificação de enzimas, DNA, ácidos nucleicos, anticorpos monoclonais e antibióticos e extração de metais ((PEREIRA e COUTINHO, 2020).

Rosa *et al.* (2010) verificaram alguns estudos de caso de aumento de escala em SABs para a fabricação de produtos biofarmacêuticos e concluíram que ainda existem questões a serem abordadas para introduzir essas plataformas nos processos de produção dessa área em comparação com sistemas cromatográficos já estabelecidos. Tais questões envolvem a capacidade máxima, o design preditivo limitado e a sustentabilidade econômica e ambiental.

Os SABs têm sido amplamente utilizados como plataformas de *downstream* eficazes para a recuperação de purificação de produtos que variam de biocompostos a metais, apesar dos mecanismos de partição desses sistemas não serem totalmente compreendidos. Eles são usados principalmente para substituir os procedimentos tradicionais de extração líquido-líquido com solvente orgânico (ASENJO E ANDREWS, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2018; GRILLO *et al.*, 2016; IQBAL *et al.*, 2016).

Os sistemas aquosos de duas fases são amplamente utilizados em aplicações analíticas (FREIRE, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2018), como por exemplo na concentração de drogas residuais e poluentes em água e alimentos (DINIS *et al.*, 2018; SHIRI *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2011), aumentando os limites de detecção. A aptidão analítica dos SABs do tipo polímero/sal também foi estendida às tecnologias de celulares de livre marcação, sendo usada para diferenciar a linha celular promielocítica HL-60 através de uma análise de partição celular de alto rendimento (ZIMMERMANN *et al.*, 2016).

RUIZ-RUIZ *et al.* (2012) destacaram a possibilidade de usar SABs para a caracterização molecular de proteínas. Como a partição proteica é um fenômeno dependente da superfície, onde os resíduos expostos interagem com os agentes formadores de fase, ela pode ser usada para discriminar proteínas semelhantes com base em suas propriedades moleculares, como tamanho molecular ou hidrofobicidade relativa.

O uso do SAB como um processo de separação em larga escala ou como uma ferramenta de bioengenharia ainda está para se tornar uma “realidade” generalizada. Embora novos usos biotecnológicos emergentes possam ser realizados em pequena escala usando microdispositivos, o processamento a jusante de produtos biológicos em escala industrial

depende totalmente de uma expansão apropriada ou integração em plataformas de processamento contínuo (PEREIRA e COUTINHO, 2020).

2.1.2-FUNDAMENTOS SOBRE A FORMAÇÃO DOS SABs

Os métodos mais comuns de obtenção das curvas binodais são por titulação turbidimétrica ou ponto de névoa. A escolha de um método específico deve considerar o tipo e a natureza dos agentes formadores de fase (PEREIRA e COUTINHO, 2020). Embora esses métodos ainda sejam os mais aplicados, são tediosos e demorados e consomem grandes quantidades de reagentes (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

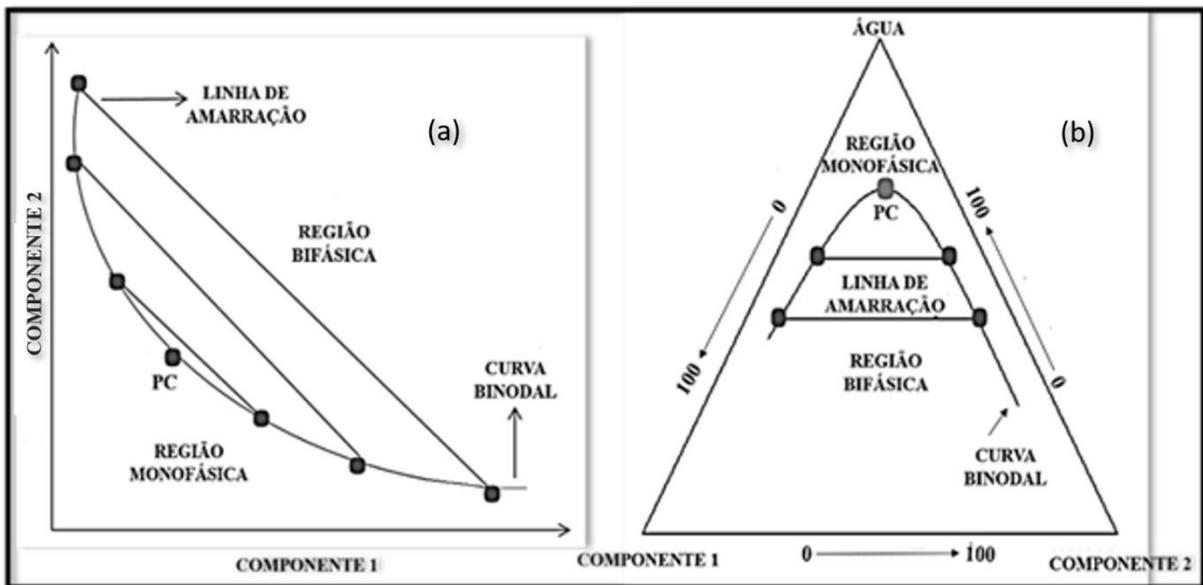
Uma das abordagens mais comuns usada para a descrição das curvas binodais é ajustá-las usando equações empíricas, particularmente a equação de três parâmetros (Eq. 3.1) de Merchuk *et al.* (1998). Esta equação, proposta inicialmente para descrever sistemas aquosos do tipo polímero/sal, foi aplicada com sucesso também à SABs com dois polímeros (MOODY *et al.*, 2005), com dois sais (SHAHRIARI *et al.*, 2012) e à base de líquido iônico e carboidrato (FREIRE *et al.*, 2011).

Em relação à determinação das linhas de amarração (LAs), o método gravimétrico, também proposto por Merchuk *et al.* (1998), utiliza os dados binodais ajustados pela Equação 3.1, junto com uma relação de balanço de massa. As composições das fases coexistentes (superior e inferior) são determinadas matematicamente pela solução de um sistema de quatro equações e quatro incógnitas (PEREIRA E COUTINHO, 2020).

Os dados das composições de equilíbrio obtidos através de experimentos em sistemas binários, ternários ou multicomponentes podem ser mostrados em forma de diagrama de fases retangulares ou triangulares (DA SILVA E LOH, 2006).

O ELL pode ser representado em coordenadas cartesianas ou diagramas triangulares. Neste último, a composição é indicada por um ponto em um triângulo equilátero e a vantagem de se utilizar este tipo de diagrama em relação aos retangulares, é que a concentração do terceiro componente pode ser lida diretamente em um dos lados do triângulo (DA SILVA E LOH, 2006; PEREIRA E COUTINHO, 2020). A Figura 2.1 exemplifica os dois tipos de diagramas.

Figura 2. 1: Diagramas de fases para sistemas aquosos bifásicos, expressos em coordenadas retangulares (a) e triangulares (b).



Fonte: adaptado de Da Silva *et al.* (2006)

Nestes diagramas (Figura 2.1) encontram-se inúmeras informações, todas relacionadas à minimização da energia de Gibbs do sistema. Por exemplo, pode-se obter em quais composições globais o sistema é monofásico ou bifásico, sendo estas duas regiões demarcadas por uma linha denominada curva binodal. Também são mostradas as linhas de amarração (“tie lines”), que são retas dentro da região bifásica ligando pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertença à região bifásica e que esteja sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, dentre outras), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas, como massa, volume, dentre outras. Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração.

Os pontos críticos (Pc), que podem também ser vistos nas Figuras 2.1(a) e 2.1(b), são pontos limites que representam uma linha de amarração de comprimento nulo conectando duas fases líquidas de mesma composição e densidade.

2.1.3 – EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM SABs

A extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos tem sido descrita como uma plataforma promissora para o particionamento e separação de proteínas (BELCHIOR *et al.*, 2020).

A partição de biomoléculas em SABs depende das propriedades físicas e químicas dos sistemas utilizados, tais como o ponto isoelétrico, a hidrofobicidade da superfície, a concentração e massa molar dos compostos, as interações intermoleculares, pH, carga eletroquímica e temperatura (JIMÉNEZ *et al.*, 2020; MORADI e SHAHROUZI 2020).

Em geral, a distribuição de proteínas entre as duas fases aquosas dos SABs é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição, K_i , definido como (IQBAL *et al.*, 2016):

$$K_i = \frac{C_T}{C_B} \quad (2.1)$$

em que C é a concentração da proteína nas diferentes fases (T = superior; B = inferior).

Albertsson (1986) propôs um modelo que correlaciona o coeficiente de partição de uma biomolécula específica, com base nas diferentes forças motrizes: dependentes do tamanho (os solutos são separados de acordo com seu tamanho e área de superfície); eletroquímico (os solutos são separados de acordo com a carga e o potencial elétrico das fases coexistentes); hidrofobicidade (os solutos são separados de acordo com interações hidrofóbicas entre moléculas e a hidrofobicidade relativa das fases); afinidade bioespecífica (um dos polímeros formadores de fase possui locais de ligação específicos para a molécula alvo); e dependente da conformação (a conformação do soluto é o fator chave para o particionamento) (GLYK *et al.*, 2017; PEREIRA E COUTINHO, 2020). Este modelo, inicialmente proposto para particionamento de proteínas, pode ser expresso pela Equação 2.2:

$$\ln(K) = \ln(K_0) + \ln(K_{size}) + \ln(K_{elec}) + \ln(K_{hfob}) + \ln(K_{biosp}) + \ln(K_{conf}) \quad (2.2)$$

em que os subscritos *size* (tamanho), *elec* (eletroquímica), *hfob* (hidrofóbicas), *biosp* (bioespecífica) e *conf* (conformacionais), referem-se às contribuições ao coeficiente de

partição (K), tanto das propriedades estruturais das proteínas quanto das condições ambientais do sistema. K_0 inclui todos os outros fatores.

Conforme discutido em alguns trabalhos da literatura (ALBERTSSON, 1986; ASENJO E ANDREWS, 2011; GRILO *et al.*, 2016), o K de uma biomolécula é o resultado de fatores relacionados à sua estrutura (como carga, hidrofobicidade e/ou propriedades da superfície) e às condições ambientais circundantes, como: tipo e concentração do sal; pH; tipo de polímero, massa molar e concentração dos componentes; a presença de derivados de polímeros; temperatura e aditivos de sal.

Assim, dependendo das características da biomolécula e das propriedades do SAB, cada mecanismo terá uma influência maior ou menor na partição. Como a maioria dos mecanismos de partição do SAB é bastante complexa e imprevisível, a maioria dos trabalhos experimentais otimizam a partição de acordo com as propriedades do produto, condições de operação, entre outros. De fato, os fatores que influenciam o comportamento da partição dos solutos no SAB são: a concentração e a massa molar do polímero, o tipo e a concentração de sal (ou líquido iônico), a hidrofobicidade relativa, o pH e as cargas, temperatura, densidade e viscosidade, tensão interfacial, tempo de sedimentação e tamanho e concentração do soluto (PEREIRA E COUTINHO, 2020).

2.2- LÍQUIDOS IÔNICOS (LIs)

Nos últimos anos, SABs baseados em líquidos iônicos (LIs) atraíram a atenção de muitos pesquisadores, principalmente devido às suas propriedades físicas e químicas, consideradas únicas (YAZDABADI *et al.*, 2019).

Sistemas aquosos bifásicos com LIs foram relatados pela primeira vez por Gutowski e colaboradores (2003), os quais disseram que alguns LIs hidrofílicos poderiam formar SABs na presença de sais inorgânicos. Desde então, muitos trabalhos relacionados a SABs com líquidos iônicos e sais e mais recentemente com PEG e líquidos iônicos têm sido publicados (BELCHIOR *et al.*, 2020; CAO *et al.*, 2008; CAPELA, *et al.*, 2017; DU *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2010a; HE *et al.*, 2005; IQBAL *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2005a; LI *et al.*, 2005b; LIU *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2014; PEI *et al.*, 2009; PEREIRA, *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015a; QUENTAL *et al.*, 2018; RODRIGUEZ, *et al.*, 2009; ZAFARANI-MOATTAR, *et al.*, 2004; ZAFARANI-MOATTAR e HAMZEZHARDEH, 2010; ZAFARANI-MOATTAR e HAMZEZHARDEH, 2011; ZAFARANI-MOATTAR e HASHEMI, 2012).

Líquidos iônicos (LIs) são sais constituídos, geralmente, por cátions orgânicos (por exemplo, imidazólio, piridínio, amônio, fosfônio) e ânions orgânicos (por exemplo, trifluorometilsulfonato, bis[(trifluorometanosulfonil]imida) ou inorgânicos (por exemplo, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, cloreto) com seus pontos de fusão, por definição geral, inferiores a 100 ° C. A baixa simetria e interações intermoleculares fracas são algumas das causas de baixos pontos de fusão (GONZALEZ-MARTIN, *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019; YAZDABADI *et al.*, 2019;).

Devido à natureza iônica, os LIs apresentam diversas vantagens físicas e químicas sobre os solventes orgânicos convencionais, ou seja, baixa pressão de vapor, não inflamabilidade, alta capacidade de solvatação, alta estabilidade química, alta seletividade e condução de eletricidade (GONZALEZ-MARTIN *et al.*, 2019; GUO *et al.*, 2020).

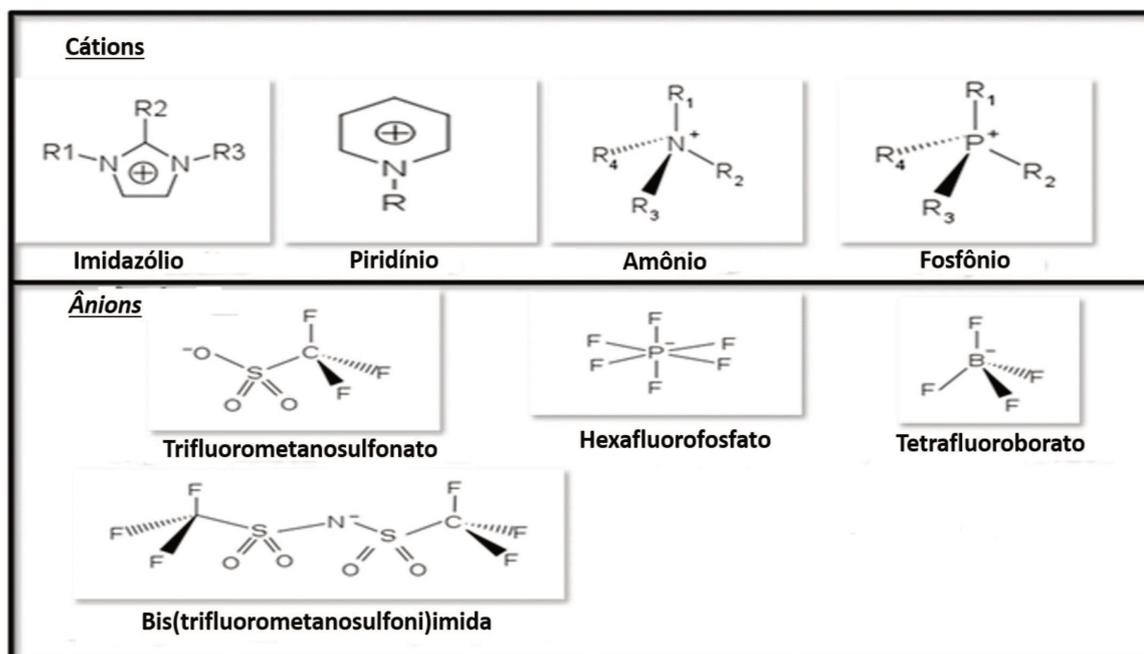
Os líquidos iônicos possuem alta versatilidade, tendo a possibilidade de serem sintetizados em diferentes estruturas químicas, graças às possíveis combinações múltiplas de cátions e ânions. Portanto, pode-se produzir compostos de aplicação específica com o objetivo de obter o melhor desempenho em determinada tarefa (MORANDEIRA *et al.*, 2017; GÓMEZ e MACEDO *et al.*, 2019).

A pressão de vapor negligenciável, perto de zero, desses sais e, as estabilidades química e térmica adequadas, havendo um grande intervalo de temperatura em que eles são estáveis, os leva a se tornarem um dos potenciais substitutos dos solventes orgânicos voláteis no processo de extração, sendo conhecidos como solventes de química verde (YAZDABADI *et al.*, 2019).

Quanto à aplicabilidade, LIs têm sido empregados em catálise, síntese orgânica, reações químicas, eletroquímica, separação cromatográfica, análise de espectrometria de massa, baterias e pilhas de combustível e na separação de biomoléculas. Além dessas aplicações, os líquidos iônicos também têm sido usados em extração líquido-líquido de íons metálicos e compostos orgânicos (LI *et al.*, 2010a; IQBAL *et al.*, 2016; PEREIRA e COUTINHO, 2020)

A Figura 2.2, mostra algumas estruturas mais comuns de cátions e ânions que formam os líquidos iônicos.

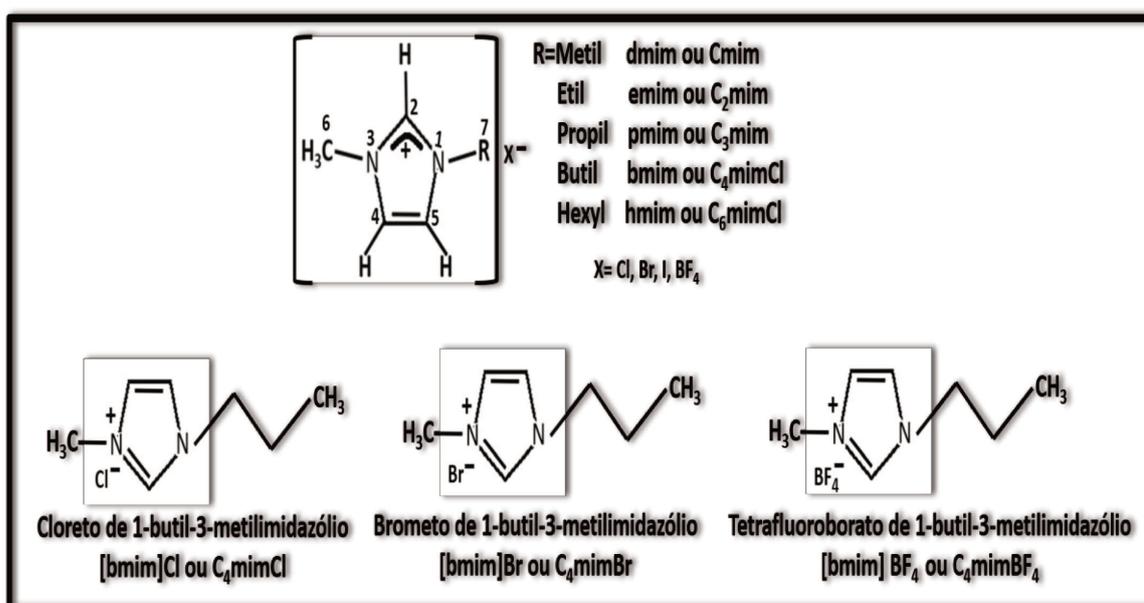
Figura 2. 2: Estruturas químicas de cátions e ânions mais comuns na formação dos LIs



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2010)

Exemplos de estruturas químicas e nomenclaturas de alguns líquidos iônicos imidazólio são mostradas na Figura 2.3, sendo que o tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio foi utilizado nos estudos deste trabalho.

Figura 2. 3: Estruturas químicas e nomenclaturas de alguns LIs do tipo imidazólio



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2010)

2.3- POLIETILENO GLICOIS (PEGs)

O polietilenoglicol, HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H, é um polímero sintético não iônico que junto com outros tipos de polímeros, constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes (MURREL e JENKINS, 1994).

O polietilenoglicol (PEG) é um dos mais estudados na literatura como componente de sistemas aquosos bifásicos. Este polímero apresenta alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, grande miscibilidade em água, baixo custo, baixa temperatura de fusão e é amplamente utilizado em processos industriais (GHAFARI et al., 2019; ROSÁRIO *et al.*, 2019).

A maioria dos polímeros sintéticos é composta por moléculas que contém centenas ou milhares de grupos de átomos interligados chamados de unidades. A macromolécula de PEG é formada por apenas um tipo de unidade repetida, sendo chamada de homopolímero. Quando esta é formada de mais de um tipo de unidade é chamada de copolímeros (MURREL e JENKINS, 1994). Além disso, são comercializados com diferentes massas molares, como por exemplo PEG 400, PEG 1500, PEG 4000, PEG 6000, PEG 8000 e outros. Neste trabalho foram utilizados polímeros de três massas molares diferentes: PEGs (1500, 4000 e 6000 g.mol⁻¹).

2.4 – PROTEÍNAS

As proteínas desempenham um papel crucial nos processos biológicos e são de fundamental importância em aplicações biotecnológicas, terapêuticas e de diagnóstico. Sua função e atividade biológica estão relacionadas à sua estrutura química e podem ser perturbadas por alterações na composição do meio, tais como pH e temperatura (PATEL *et al.*, 2014).

As biomoléculas escolhidas para esse estudo de partição foram a albumina de soro bovino (BSA) e a lisozima (LS). Tais biomoléculas possuem muitas características distintas, tais como o ponto isoelétrico e massas molares. Possuem alta solubilidade em água: lisozima, cerca de 10 mg/mL, e BSA, em torno de 40 mg/mL (HUBNER *et al.*, 2018; Watanabe, 2007).

2.4.1- ALBUMINA DE SORO BOVINO (BSA)

A albumina de soro bovino (BSA) tem despertado o interesse de muitos pesquisadores devido à sua grande abundância em proteínas do plasma sanguíneo, bem como suas amplas aplicações em muitos campos (YAN-MIN *et al.*, 2010).

As albuminas séricas são os principais constituintes proteicos solúveis nos fluidos corporais e têm muitas funções fisiológicas relevantes. Entre várias características valiosas, uma das mais importantes é serem portadores de uma diversidade de compostos no sistema circulatório (MANDEVILLE e TAJMIR-RIABI, 2010).

A BSA é uma proteína com algumas características comuns a outras albuminas séricas, como a ESA (albumina sérica equina), a LSA (albumina sérica de leporina) e a HSA (albumina sérica humana). Por isso, tem sido extensivamente estudada como proteína modelo em uma grande variedade de aplicações. É a proteína mais abundante do soro bovino (PEREIRA *et al.*, 2015b).

O ponto isoelétrico (PI) de uma molécula indica o pH no qual ela se encontra com a mesma quantidade de carga positiva e negativa. A BSA é carregada negativamente no pH 7,0. O PI da BSA está em torno de 4,70 - 5,60, dependendo da literatura (EMERSON, 1989; GOLDBERG, 1952; HUBNER *et al.*, 2018)

2.4.2-LISOZIMA

A clara de ovo, uma matéria-prima rica em proteínas de alto valor, contém 88% de água e 11% de proteínas, incluindo ovalbumina, ovotransferrina, lisozima e ovomucina (OMANA *et al.*, 2010). A lisozima constitui cerca de 3,5% da proteína total da clara de ovo, tem baixa massa molar (14,3 kDa) e um ponto isoelétrico alto (10,7) (IWASHITA *et al.*, 2017).

Dadas suas múltiplas funções (antivirais, antitumorais e imunomoduladoras), a lisozima é frequentemente utilizada como proteína modelo em análises de atividade enzimática e/ou proteínas para estudos de agregação e cristalização (MAOSOONGNERN *et al.*, 2017). Além disso, é uma enzima com propriedades bactericidas e são conservantes naturais na indústria de alimentos (BELCHIOR *et al.*, 2020).

A lisozima, apesar de estar presente em uma matéria-prima de baixo custo, ainda exige o desenvolvimento de uma relação custo-benefício nos processos de separação e fracionamento para obter proteínas com alto teor de pureza, estáveis e biologicamente ativas (BELCHIOR *et al.*, 2020).

2.5 – PUBLICAÇÕES SOBRE PARTIÇÕES EM SABs E ELL

Publicações sobre extração de biomoléculas em SABs com PEG e sal de interesse para este trabalho serão discutidas neste item.

Alves e colaboradores (2000), estudaram a partição da BSA e outras proteínas em SABs do tipo PEG/citrato, PEG/fosfato e PEG/maltodextrina (MD). As proteínas foram quantificadas através de um dos seguintes métodos: cromatografia líquida, Bradford e espectrofotometria a 280 nm. Os resultados mostraram que a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina concentraram-se, respectivamente, nas fases superior e inferior. A BSA em sistemas PEG/maltodextrina se identificou mais com a fase inferior, rica em MD. A insulina suína foi particionada para a fase rica em PEG com coeficientes de partição maiores que 10, os quais aumentaram com o incremento da massa molar do PEG, para sistemas com pH 7,0 e 9,5.

Capézio *et al.* (2005) e Boaglio *et al.* (2006) analisaram a partição de proteínas do soro de leite bovino (BSA, α -lactalbumina [α -LA] e β -lactoglobulina [β -LG]) e α -1 antitripsina [α 1-AT] em SABs formados por PEG (1000, 1500/1450 ou 3350). O primeiro trabalho, utilizou tampão fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$) e o segundo tampão citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7/\text{NaOH}$). A BSA se concentrou na fase rica em PEG em sistemas com tampão fosfato e no trabalho de Boaglio *et al.* (2006), a mesma proteína teve preferência pela fase inferior.

Costa *et al.* (2015) estudaram a partição da lactoferrina em SABs compostos de polietileno glicóis e tampão citrato de sódio. Dados de equilíbrio a 25°C foram determinados para cada sistema estudado usando PEGs com massas molares entre 1000 e 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, nos valores de pHs 5,5, 6,5 e 7,5. Foi observado que tanto o aumento da massa molar do polímero quanto do pH promoveu a expansão da região de duas fases, causando a migração da lactoferrina para a fase inferior, rica em sal. A porcentagem de recuperação da lactoferrina foi maior que 94% em todos os sistemas avaliados.

A investigação das partições da lisozima, BSA e α -amilase em SABs do tipo PEG/ (K_2HPO_4 ou $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) e PEG/ (Na_2SO_4) a 25°C em diferentes valores de pH foi realizada por Haghtalab *et al.* (2003). Foi estudado a influência do pH e da concentração de sal no particionamento protéico. A preferência de fase das biomoléculas dependeu do tipo de sistema. A BSA ficou concentrada na parte inferior dos SABs testados e a lisozima nos sistemas formados por PEG 4000/ tampão fosfato, pH 7,1, foi particionada para a fase inferior.

As partições de oito biomoléculas modelo, dentre elas a lisozima, foi estudada por Perez *et al.* (2013) em SABs formados por PEG (4000, 6000 ou 8000) e sais biodegradáveis (succinato de sódio, tartarato de sódio ou citrato de sódio) na temperatura de 22°C e pH 5,0. Pepsina e lisozima mostram um maior deslocamento para a fase rica em polímero ($K_p > 1$) na maioria dos sistemas testados, enquanto as demais particionaram ou para a fase inferior ($K_p < 1$) ou para as ambas as fases, dependendo do tipo de sistema. O aumento da massa molar (MM) do PEG, para um determinado sal, nem sempre induziu o deslocamento esperado da proteína para a fase inferior. Além disso, nem sempre o aumento da MM do PEG propiciou a diminuição no valor do K_p .

Perumalsamy e Murugesan (2007) investigaram o efeito dos componentes formadores de fase, pH e adições de sal neutro (NaCl) na partição da BSA em sistemas aquosos à base de PEG 2000 e citrato de sódio nas temperaturas de 25, 35 e 45°C. Os autores descobriram que o coeficiente de partição da BSA diminuiu com o aumento na concentração do PEG 2000 e temperatura. A afinidade da proteína com a fase inferior aumentou com o incremento do pH, o que pode ser devido ao aumento na proporção de íons citrato trivalente/divalente no sistema bifásico. Foi confirmado que a partição de BSA depende da hidrofobicidade relativa dos compostos, bem como de sua carga.

O comportamento da partição da BSA também foi investigado por Perumalsamy e Batcha (2011) em SABs com PEG (4000, 6000 ou 8000) / citrato de sódio. Foram investigadas as influências da massa molar do PEG, pH e temperatura. A fase inferior, rica em sal, foi a preferida pela BSA, fase favorável em sistemas com alta massa molar de PEG, devido ao aumento natural da hidrofobicidade do PEG. O valor do coeficiente de partição tende a diminuir com o aumento da concentração de PEG, devido à diminuição do volume livre disponível para a proteína se acomodar na fase rica em polímero. A afinidade da BSA para a fase rica em PEG aumenta com o incremento da concentração de citrato de sódio, devido ao aumento do efeito *salting-out* na fase inferior. O efeito *salting-out* refere-se à precipitação da biomolécula que ocorre pela diminuição da disponibilidade de água para sua solubilização em solução salinas mais concentradas. Os resultados indicaram também que o equilíbrio da partição proteica é deslocado para a fase rica em citrato à medida que o pH do sistema aumenta, portanto, o valor do coeficiente de partição muda dependendo do ponto isoelétrico e da carga da proteína. Além disso, observou-se que a concentração de BSA na fase inferior é maior em temperaturas mais altas.

O efeito de diferentes polímeros (polipropileno glicol (PPG 425) ou PEG 6000) e sais (sulfato de magnésio, $MgSO_4$; sulfato de amônio, $(NH_4)_2SO_4$; ou sulfato de sódio, Na_2SO_4)

no comportamento de partição de diferentes proteínas modelo (BSA, β -LG e zeína) foram estudadas em detalhes por Salabat *et al.* (2010). A BSA e β -LG são hidrofílicas e particionaram para a fase inferior dos SABs e a zeína (proteína do grão de milho) que é hidrofóbica teve preferência pela fase superior. Os resultados da recuperação mostram uma tendência no poder *salting-out* dos sais ($\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ou seja, o sal com maior efeito *salting-out* é responsável pelas maiores recuperações da zeína na fase superior e da BSA e β -LG na fase inferior.

A extração e re-extração da albumina de soro bovino (BSA) foram estudadas utilizando a técnica de equilíbrio líquido-líquido em SABs compostos por polietilenoglicol (PEG) e citrato de potássio. Os autores avaliaram os SABs quanto à massa molar do PEG (1000, 2000, 4000 ou 6000), concentração de citrato de potássio e o efeito do pH na partição. Verificou-se que, em SABs com PEG 1000, o pH teve efeitos significativos no particionamento da proteína. O rendimento de 99% da BSA foi obtido na fase superior com 19% (m/m) de PEG 1000, 20% (m/m) citrato de potássio e 0,75 mg/g de concentração proteica a pH 7,0 e 30°C. A BSA pôde ser re-extraída, com rendimento de 92%, para uma nova fase de citrato através da diminuição do pH do sistema. A extração posterior não só separa a BSA do polímero, mas também permite que o polímero seja reciclado. O rendimento global foi de até 91% (YAN-MIN, *et al.*, 2010).

Johansson *et al.* (1996) estudaram os efeitos dos íons na partição da lisozima e BSA em SABs com óxido de etileno e copolímeros de óxido de propileno. Estes autores concluíram que a partição das proteínas pode ser direcionada à fase superior de SABs, rica em PEG, pela adição de íons hidrofóbicos. A BSA, carregada negativamente, e a lisozima, com carga positiva, podem ser particionadas para a fase superior utilizando íons como trietilamônio e perclorato, respectivamente.

Peng *et al.* (1995) desenvolveram correlações para predição do coeficiente de partição da lisozima em sistemas contendo PEG e $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$. O desvio médio relativo do coeficiente de partição experimental e calculado foi inferior a 6%. Os fatores que afetam o coeficiente de partição proteica também foram discutidos.

Farruggia e colegas de trabalho (2004) avaliaram a influência cátions monovalentes de sais clorídricos, em diversas concentrações, na partição da BSA, tripsina, ovalbumina e lisozima. Os sistemas aquosos bifásicos utilizados foram compostos por PEG 1500 e fosfato de potássio em pH 7,0. Esses cátions, favoreceram a transferência das proteínas da fase inferior para a fase rica em PEG na seguinte ordem: $\text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{CS}^+$. Todos os cátions influenciaram no

decréscimo da superfície hidrofóbica das proteínas e este efeito foi mais significativo na presença de CS^+ .

O comportamento de partição da lisozima em SABs com PEGs de diferentes massas molares, variando os sais fosfato de sódio, citrato de sódio e sulfato de sódio foi avaliado por Su e Chiang (2006). Os sistemas com PEG e sulfato mostraram maior eficiência na extração da lisozima para a fase superior. Foi mostrado que quanto maior a massa molar do PEG, menor é a eficiência de extração e essa tendência é devido ao efeito do volume excluído.

Picó *et al.* (2007) realizaram uma investigação calorimétrica das interações proteína-polímero e suas relações com a partição de proteínas. As proteínas utilizadas neste estudo foram a lisozima e a ovoalbumina e foi observada alta afinidade dessas biomoléculas com os polímeros, a qual diminui com o aumento de suas massas molares.

Shibusawa e colaboradores (1998) determinaram os coeficientes de partição da ovalbumina, conalbumina e lisozima em sistemas aquosos bifásico composto por 16% (m/m) de PEG 1000 e 12,5% (m/m) de fosfato de potássio dibásico. As proteínas presentes na clara de ovo da galinha foram separadas por cromatografia em contracorrente em uma etapa usando uma centrífuga planetária de bobina de eixo transversal. Foi estudada a influência do pH nas partições e foi verificado, nos particionamentos relacionados à lisozima, que o K_p aumenta com o incremento do pH.

Ao verificar o trabalho de Sindhu *et al.* (2013), no qual foram avaliadas as partições da BSA em sistemas PEG/(sulfato de sódio, carbonato de sódio, hidrogenofosfato de potássio ou citrato de potássio) a 30°C, fica evidente que não existe a relação entre a preferência de fase com o tipo de sal (orgânico ou inorgânico). A BSA foi particionada para a fase superior na maioria dos SABs formados por PEG/ citrato de potássio e SABs com sais fosfato, sugerindo que a partição foi direcionada pela diferença de hidrofobicidade entre as fases, sendo a parte inferior formada em sua maior parte com estes dois sais são mais hidrofóbicas. Em sistemas com sulfato de sódio e carbonato de sódio, a BSA foi particionada para a fase inferior. A BSA é naturalmente hidrofílica e nestes SABs, a proteína vai preferir a fase com maior quantidade de água.

O particionamento da cefazolina foi investigado em SABs de PEG (6000 ou 8000) e três sais de sódio, incluindo citrato de sódio, tartarato de sódio e sulfato de sódio a 27°C. As curvas binodais foram correlacionadas com a equação de Merchuk e as linhas de amarração foram validadas pelas equações de Othmer-Tobias e Bancroft. Foi verificado que, à medida que a concentração de polímero aumenta, o coeficiente de partição sofre um incremento, mas em polímeros com massas molares maiores o K_p é reduzido. O melhor sal do estudo de partição

foi o citrato de sódio, o que está de acordo com a teoria dos volumes excluídos. O valor máximo de coeficiente de partição obtido foi 13,4, com uma recuperação de 90,5% na fase superior com o SAB formado por 16 % (m/m) de PEG 6000 e 14 % (m/m) de citrato de sódio (GHAFFARI *et al.*, 2020).

Com relação aos trabalhos da literatura sobre SABs relacionados aos estudados nesta tese, algumas publicações de importância para este trabalho foram comentadas neste item de revisão.

Malpiedi *et al.* (2008) obtiveram diagramas de fases a 25°C para SABs formados por PEGs de diferentes massas molares (600, 1000, 2000, 4000, 6000 e 8000 g.mol⁻¹) e tartarato de sódio. Outros autores, Zafarani-Moattar *et al.* (2008), relataram também, dados de ELL desse mesmo tipo de sistema, porém variando a temperatura (25, 35 e 45°C). A modelagem dos dados experimentais de ELL foi bem-sucedida, com o modelo NRTL.

Tubío *et al.* (2006) estudaram diagramas de fases de SABs compostos por PEG (600, 1000, 1450, 3350 e 8000 g.mol⁻¹) e citrato de sódio nas temperaturas de 22, 37 e 50 °C. O efeito do pH (5,2, 8,2, e 9,2) nesses sistemas foi estudado. O aumento da temperatura e do pH acarretou o aumento da região bifásica. Alves *et al.* (2008) também avaliaram experimentalmente SABs formados por PEG (600, 1500 ou 3000 g.mol⁻¹) e citrato de sódio a 25°C. Os dados experimentais foram descritos por uma expressão semi-empírica para a energia de Gibbs em excesso.

Dados de ELL para sistemas compostos por PEG e sal foram obtidos pelo método de ponto de névoa a 25°C. As linhas de amarração para os sistemas compostos por PEG (4000 e 6000 g.mol⁻¹)/citrato de potássio e PEG (4000, 6000 e 8000 g.mol⁻¹)/ tartarato de sódio e potássio foram determinadas por condutividade elétrica e liofilização (Wysoczanska e Macedo, 2016).

No trabalho de Zafarani-Moattar *et al.* (2004), determinou-se o ELL para o sistema contendo PEG 6000, citrato de sódio e água a 25, 35 e 45°C. Além disso, as equações do modelo UNIQUAC com parâmetros dependentes da temperatura e com ou sem termo eletrolítico e as do modelo virial foram usadas para correlacionar o comportamento de fases desse sistema. O melhor ajuste dos dados ELL foi obtido com o modelo virial. Chegou-se à conclusão que as regiões de duas fases, bem como as linhas de amarração, aumentam com a elevação da temperatura.

A literatura também disponibiliza dados de ELL de SABs formados por PEG 4000 e outros três sais (tartarato de potássio, tartarato de sódio e potássio ou oxalato de potássio) a 25°C (ZAFARANI-MOATTAR e TOLOUEI 2008). O efeito do tipo de sal na curva binodal

foi estudado, demonstrando que a habilidade de formação de fases dos sais (efeito “*salting-out*”), cresce na seguinte ordem, de acordo com a energia de Gibbs de hidratação seus íons ΔG_{hyd} : $C_2O_4^{2-}(\Delta G_{hyd} \cong -1453 kJ/mol) > NaC_4H_4O_6^{-1}(\Delta G_{hyd} \cong -1367 kJ/mol) > C_4H_4O_6^{-2}(\Delta G_{hyd} \cong -1010 kJ/mol)$. Além disso, os dados das binodais foram correlacionados satisfatoriamente com a equação de Merchuk e as linhas de amarração com as equações de Othmer-Tobias e Bancroft e pelo modelo NRTL.

Dados de ELL para PEG (1500 ou 3000)/ tampão citrato de sódio em diferentes pHs podem ser encontrados nos trabalhos de Nascimento *et al.* (2018) e Pirdashti *et al.* (2015). Ambos os trabalhos investigaram o efeito do pH na inclinação da linha de amarração (ILA), sendo que o primeiro não encontrou grandes variações nas ILAs e o segundo observou um aumento na inclinação ao variar os pHs entre 6,1 e 9,0.

2.6- EQUILÍBRIO-LÍQUIDO-LÍQUIDO

O equilíbrio de um sistema heterogêneo consiste na simultaneidade de três espécies de equilíbrio: térmico, determinado pela igualdade de temperatura (T) de todas as fases; mecânico, dado pela igualdade de pressão (P) nas diferentes fases; e químico, que consiste na igualdade de potencial químico (μ) de cada componente nas fases existentes. Em resumo, o resultado para um sistema fechado com π fases e N componentes pode ser escrito como:

$$T^1 = T^2 = \dots = T^\pi \quad (2.3)$$

$$P^1 = P^2 = \dots = P^\pi \quad (2.4)$$

$$\mu_1^1 = \mu_1^2 = \dots = \mu_1^\pi \quad (2.5)$$

$$\mu_2^1 = \mu_2^2 = \dots = \mu_2^\pi \quad (2.6)$$

$$\mu_N^1 = \mu_N^2 = \dots = \mu_N^\pi \quad (2.7)$$

Este conjunto de equações provê o critério básico para o equilíbrio de fases. Como o potencial químico não é uma quantidade mensurável, é desejável expressá-lo em termos de funções auxiliares, como por exemplo, a fugacidade, cujo desenvolvimento começa com a definição de potencial químico, dada por J.W. Gibbs em 1875 (PRAUSNITZ, *et al.*, 1986).

Muitos pares de espécies químicas, quando misturados em certa faixa de composições, dividem-se em duas fases líquidas, sendo que cada fase possui composições diferentes. Quando estas fases estiverem em equilíbrio termodinâmico, o fenômeno apresenta

um exemplo de equilíbrio líquido-líquido (ELL), que é importante em operações industriais, como a extração com solventes (SMITH *et al.*, 2007).

Então, sabendo que os critérios de equilíbrio termodinâmico são a uniformidade de T, P e da fugacidade \hat{f}_i de cada espécie química ao longo de ambas as fases para o ELL com N espécies, a Equação 2.8, na qual as fases líquidas são identificadas pelos sobrescritos α e β , pode ser escrita:

$$\hat{f}_i^\alpha = \hat{f}_i^\beta \quad (i=1, 2, \dots N) \quad (2.8)$$

Em termos de coeficientes de atividade (γ_i), a Equação 2.8 se torna:

$$x_i^\alpha \gamma_i^\alpha f_i^\alpha = x_i^\beta \gamma_i^\beta f_i^\beta \quad (2.9)$$

Se cada espécie pura puder existir como líquido à temperatura do sistema, $f_i^\alpha = f_i^\beta = f_i$, logo a Equação 2.9, pode ser reescrita, chegando-se à Equação 2.10, que junto com as restrições $\sum_i x_i^\alpha = 1$ e $\sum_i x_i^\beta = 1$, constituem o sistema básico de equações para o cálculo de equilíbrio líquido-líquido.

$$(x_i \gamma_i)^\alpha = (x_i \gamma_i)^\beta \quad (i=1, 2, \dots N) \quad (2.10)$$

2.7 – MODELAGEM TERMODINÂMICA

Com a finalidade de calcular os coeficientes de atividade da fase líquida, usualmente são empregados modelos derivados de expressões dadas para a energia de Gibbs em excesso, a qual é uma função de T, P e composição. Porém, para líquidos em pressões baixas e moderadas, a dependência em relação à pressão é normalmente desprezada. Esses modelos levam em consideração a energia de interação entre as moléculas, expressa por parâmetros binários.

2.7.1- MODELO NRTL (Non-Random, Two-Liquid)

A energia de Gibbs em excesso a baixa pressão, G_0^E é calculada utilizando qualquer modelo clássico apropriado para a fase líquida. Na literatura, utilizam-se os modelos clássicos:

UNIQUAC (*UNI*versal *QU*asi-*C*hemical) e NRTL (*Non-Random-Two-Liquid*), os quais estão ligados ao conceito de composição local. No interior de uma solução líquida, composições locais, diferentes da composição global da mistura, são supostamente responsáveis pelas orientações moleculares não-aleatórias e interações de curto alcance, que resultam de diferenças no tamanho molecular e nas forças intermoleculares. Neste trabalho será realizado a modelagem termodinâmica dos dados de ELL pelo modelo NRTL.

Segundo Cruz e Renon (1978), o modelo termodinâmico molecular NRTL (*Non-Random, Two-Liquid*) proposto por Renon e Prausnitz (1968), é um modelo que apresenta as seguintes vantagens:

- ✓ É capaz de correlacionar propriedades de equilíbrio de sistemas não-eletrolíticos fortemente não-ideais;
- ✓ O conceito de composição local permite uma redução do número de parâmetros ajustáveis;
- ✓ A generalização das equações no NRTL a sistemas multicomponentes requer somente parâmetros binários.
- ✓ As equações do modelo NRTL para o coeficiente de atividade em sistemas multicomponentes são as Equações 2.11 a 2.13:

$$\ln \gamma_i = \frac{\sum_j \tau_{ji} G_{ji} X_j}{\sum_k G_{ki} X_k} + \sum_j \frac{X_j G_{ij}}{\sum_k G_{kj} X_k} \left[\tau_{ij} - \frac{\sum_k X_k \tau_{kj} G_{ki}}{\sum_k G_{kj} X_k} \right] \quad (2.11)$$

$$\tau_{ij} = \frac{\Delta g_{ij}}{RT} = A_{ij} + \frac{B_{ij}}{T} \quad (\tau_{ij} \neq \tau_{ji}) \quad (2.12)$$

$$G_{ij} = \exp(-\alpha_{ij} \tau_{ij}) \quad (\alpha_{ij} \neq \alpha_{ji}) \quad (2.13)$$

Este modelo apresenta cinco parâmetros ajustáveis para cada par binário ($A_{ij}, A_{ji}, B_{ij}, B_{ji}, \alpha_{ij}$) Os quatro primeiros estão relacionados à energia de interação entre as moléculas do tipo i e j , enquanto o parâmetro α_{ij} está relacionado com a não- não aleatoriedade da mistura; em cada mistura não aleatória os componentes na mistura não se distribuem uniformemente, mas sim de maneira relativamente organizada, seguindo a teoria da composição local. O conceito de composição local relata que a composição do sistema nas vizinhanças de

uma molécula não é igual à composição da mistura; isto ocorre porque há diferença no tamanho e nas energias de interação da molécula (SMITH *et al.*, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo está descrito o material utilizado para o desenvolvimento desta tese, tais como as biomoléculas, os reagentes químicos e os equipamentos necessários para realização da parte experimental. Além disso, as metodologias empregadas para os ensaios envolvendo a obtenção dos diagramas de fases e extração líquido-líquido de proteínas também estão apresentados.

3.1- MATERIAL

3.1.1- REAGENTES QUÍMICOS

Para a realização dos experimentos de equilíbrio líquido-líquido (ELL) desta tese de doutorado, foram utilizados: cinco sais orgânicos (citrato de sódio, tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, acetato de sódio e citrato de potássio), três sais inorgânicos (tiosulfato de sódio penta-hidratado, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico), um líquido iônico (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio), polietilenoglicol (PEG) de diferentes massas molares (1500, 4000 e 6000 g.mol⁻¹) e água destilada. As biomoléculas utilizadas nos experimentos de extração líquido-líquido foram a albumina de soro bovino (BSA) e a lisozima (LS).

Nas Tabela 3.1 e 3.2 estão listados, respectivamente, os compostos químicos e as proteínas utilizadas para a confecção desta tese, bem como algumas de suas características.

Tabela 3. 1: Características dos compostos químicos utilizados nesta tese de doutorado

<i>Composto Químico</i>	<i>Fórmula Molecular</i>	<i>Massa molar (g/mol)</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Fabricante</i>
Poliétileno Glicol 1500	HO(C ₂ H ₄ O) _n H	-	99,9	Oxiteno
Poliétileno Glicol 4000	HO(C ₂ H ₄ O) _n H	-	99,9	Oxiteno
Poliétileno Glicol 6000	HO(C ₂ H ₄ O) _n H	-	99,9	Oxiteno
Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio	C ₈ H ₁₅ BF ₄ N ₂	226,02	-	Merck
Acetato de sódio	NaC ₂ H ₃ O ₂	82,03	98,0	Merck
Tartarato de sódio	Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆	230,08	99,0	Merck
Tartarato de sódio e potássio.4H ₂ O	KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O	282,22	99,8	Synth
Citrato de sódio	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	294,1	99,0	Merck
Citrato de potássio	K ₃ C ₆ H ₅ O ₇	306,39	99,7	Synth
Tiosulfato de sódio penta-hidratado	Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	248,18	99,8	Merck
Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	174,18	99,0	Synth
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	136,09	99,0	Synth
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	192,13	99,8	Merck

Fonte: Do autor.

Tabela 3. 2: Características das proteínas utilizados neste trabalho

Características	Lisozima	BSA	Referências
Massa molar (kDa)	14,3	67	Sigma Aldrich
Ponto isoelétrico	10,7	4,8	Iwashita <i>et al.</i> (2017)/ Hubner <i>et al.</i> (2018)
Solubilidade em água (mg/ml)	10	40	Hubner <i>et al.</i> (2018)/Watanabe (2007)
Temperatura de desnaturação (°C)	> 100	> 60	Watanabe (2007)
Pureza /Fabricante	95	96	Sigma Aldrich

Fonte: Do autor.

3.1.2- EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS

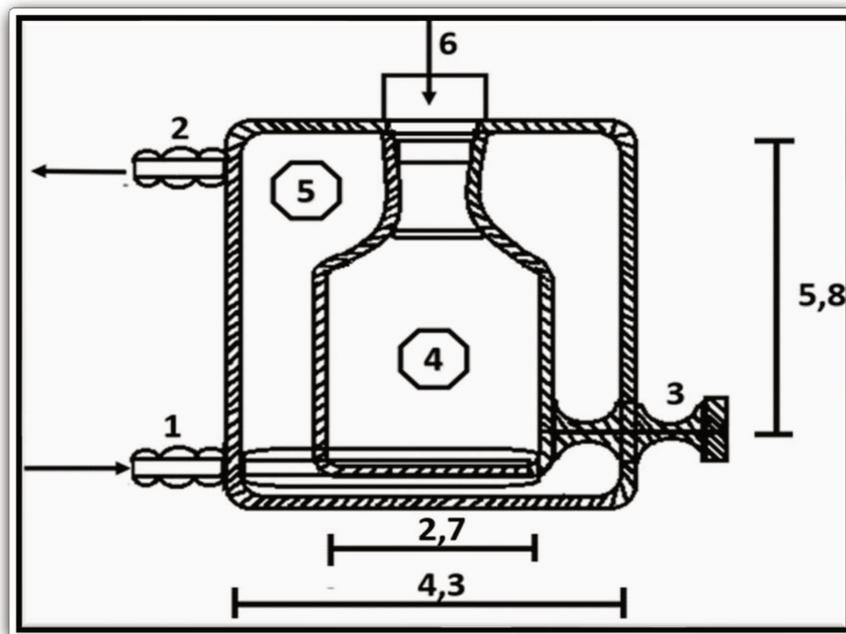
Os equipamentos e utensílios utilizados para a determinação experimental do equilíbrio líquido-líquido dos sistemas de validação foram os mesmos dos sistemas ternários envolvendo líquido iônico/sal e PEG/sal. Estes equipamentos são listados a seguir.

- ✓ Tubos de vidro com tampa ($\approx 9\text{ ml}$) para o equilíbrio de fases e partição de biomoléculas;
- ✓ Tubos de centrífuga de vidros graduados para partição de biomoléculas e medida do volume das fases;
- ✓ Célula de equilíbrio para obtenção das curvas binodais (Figura 3.1);

- ✓ Seringas de plástico acopladas a agulha de metal ou mangueira fina de silicone para coleta das fases;
- ✓ Banho termostático, da marca *Tecnal* TE-184, usado para manter condições isotérmicas no estado de equilíbrio termodinâmico. A precisão da temperatura é de $\pm 0,05^\circ\text{C}$;
- ✓ Balança analítica com precisão de 1×10^{-4} g, com medição de até 200 g;
- ✓ Agitadores magnéticos da marca *Fisatom*, modelo 752;
- ✓ Agitador de tubos (vórtex) da marca *Heidolph*;
- ✓ Espectrofotômetro da marca *AquaMate* 8000 UV-Vis;
- ✓ pHmetro da marca *Quimis*, modelo Q 400A.

A Figura 3.1 traz o esquema da célula de ELL e tubo de vidro utilizados nos experimentos de obtenção dos diagramas de fases e partição das biomoléculas.

Figura 3. 1: Esquema da vista lateral da célula de equilíbrio (medidas em cm): 1) Entrada de água; 2) Saída de água; 3) Coletor de amostra; 4) Área de armazenamento da amostra; 5) Área de circulação de água; 6) Septo de vedação.



Fonte: Do autor.

3.2- SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS DESTE TRABALHO

Os SABs estudados foram do tipo PEG/sal e LI/sal, variando a massa molar do PEG e os sais utilizados, em diferentes valores de pH e temperaturas. Para uma melhor organização dos resultados e discussão, optou-se por agrupá-los em 5 tipos de sistemas, conforme descrito abaixo:

- ✓ Sistemas do tipo 1: PEG (1500, 4000 e 6000) + tampão citrato de sódio (pHs 5, 6 e 7) + água a 30°C;
- ✓ Sistemas do tipo 2: PEG (1500, 4000 e 6000) + tampão fosfato de potássio (pHs 6, 7 e 8) + água a 30°C;
- ✓ Sistemas do tipo 3: PEG (1500, 4000 e 6000) + tiosulfato de sódio penta hidratado+ água nas temperaturas de 20, 30 e 40°C;
- ✓ Sistemas do tipo 4: PEG (1500, 4000 e 6000) + sal + água a 30°C; sais: tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, citrato de potássio e fosfato dipotássico.
- ✓ Sistemas do tipo 5: [bmim]BF₄ + sais orgânicos (acetato de sódio, citrato de sódio e tartarato de sódio) + água nas temperaturas de 20, 30 e 40°C;

As partições das proteínas albumina de soro bovino e da lisozima foram realizadas a 30 °C nos sistemas PEG (1500, 4000 ou 6000) + sal (tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, tampão fosfato de potássio em pH 7,0) + água. Nos SABs do tipo PEG/citrato de potássio, foi estudada somente a partição da lisozima.

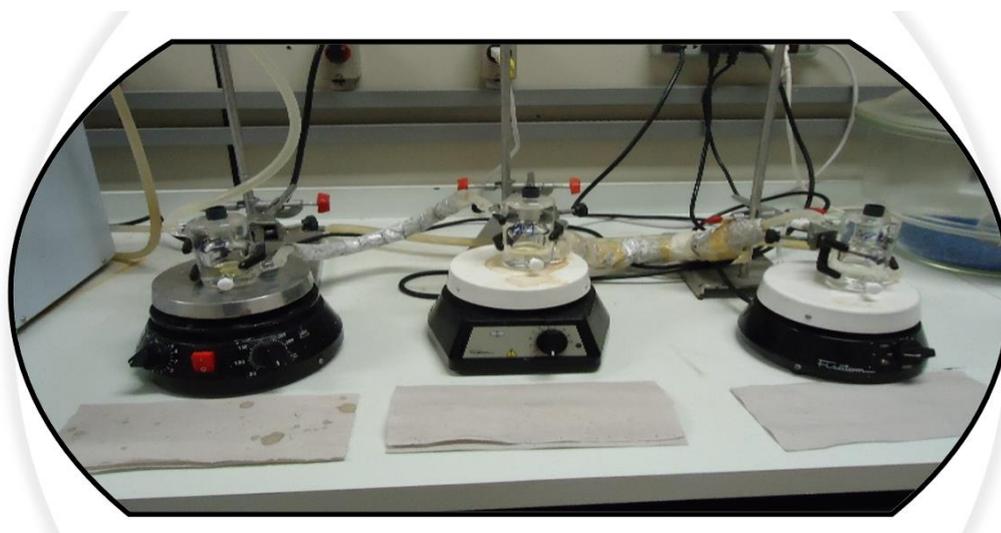
3.3 – DIAGRAMA DE FASES

3.3.1 – CURVAS DE SOLUBILIDADE

As curvas de solubilidade (ou curvas binodais) foram obtidas a partir de soluções aquosas de sal (orgânico ou inorgânico) e líquido iônico (LI) ou PEG de concentração mássica conhecida. As curvas binodais foram obtidas por turbidimetria, nas temperaturas de análise de cada sistema, segundo metodologia descrita por Albertsson (1986). A solução de líquido iônico ou PEG, de massa conhecida, foi titulada com a solução de sal (ou vice-versa), gota a gota, até o aparecimento da névoa ou turbidez (início da região bifásica). Neste momento anotou-se a composição do sistema, que identificou um ponto da curva binodal. A esse sistema foi adicionado uma determinada quantidade de água destilada até que a solução se tornasse límpida

(região monofásica). Em seguida, repetiu-se a titulação até a detecção da nova turbidez, o que levou à obtenção de um novo ponto da binodal. O procedimento citado, o qual foi mantido sob agitação e temperatura constantes, foi repetido até que fossem obtidos pontos suficientes para identificar a região bifásica e modelar a curva binodal de forma adequada. A composição do sistema ternário foi determinada pela quantificação das massas de todos os componentes, com precisão de 4 casas decimais, usando balança analítica. A Figura 3.2 mostra a seção experimental montada para obtenção das curvas binodais.

Figura 3. 2: Seção experimental para obtenção das curvas binodais.



Fonte: Do autor

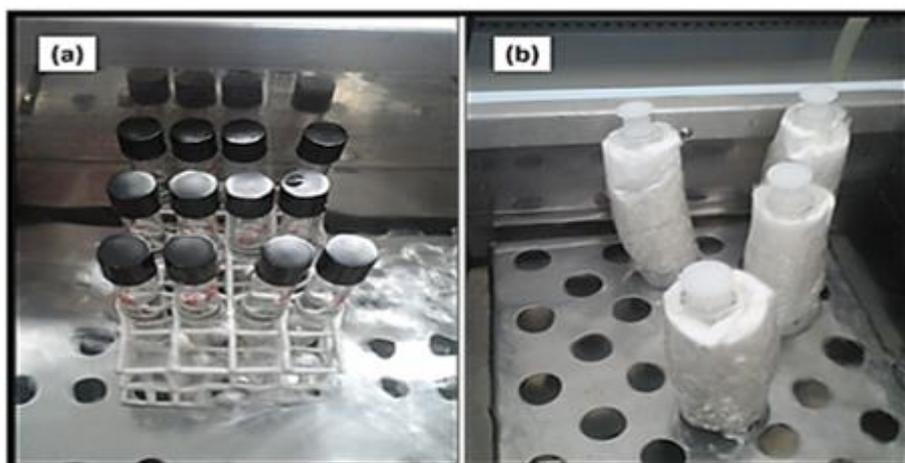
3.3.2 –LINHAS DE AMARRAÇÃO: EXPERIMENTO E ANÁLISE

Uma vez obtidos os dados de solubilidade, foram conduzidos os experimentos para se obterem as linhas de amarração (LAs). Para isto, misturas ternárias, pertencentes à região de duas fases, foram preparadas em tubos de vidros (≈ 9 mL), os quais eram previamente pesados. Essa solução ternária era, então, vigorosamente agitada por 10 minutos a 2500 rpm em um vórtex. Em seguida, as soluções foram centrifugadas por 20 min e deixadas em banho termostático de acordo com a temperatura de trabalho (20, 30 ou 40°C), por no mínimo 15 horas (Figura 3.3 (a)), garantindo a condição de equilíbrio.

Após o tempo de repouso, observou-se a formação das duas fases lípidas com interface bem definida e, então, elas foram cuidadosamente separadas e pesadas. Com o auxílio de uma seringa retirou-se primeiro uma parte da fase superior deixando aproximadamente 5

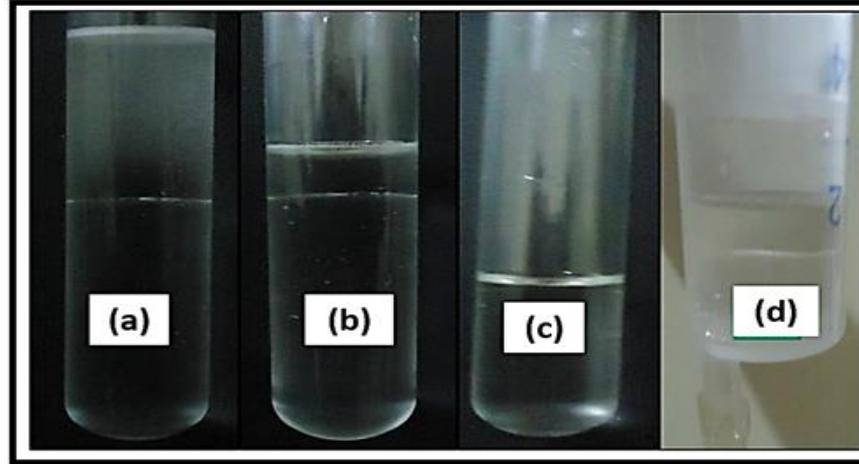
mm dessa fase na região logo acima da interface. Pesou-se essa porção da fase superior. Logo em seguida, o sistema foi deixado no banho por mais 30 min e depois recolheu-se a fase de cima restante e mais os, 5 mm (aproximadamente) da fase inferior abaixo da interface. A seringa contendo as duas fases (Figura 3.3 (b)) foi mantida em repouso no banho termostático (~ 30 min), dentro de um tubo de ensaio, na temperatura de análise para separação e pesagem das quantidades das fases próximas ao menisco. As etapas de pesagem das fases foram realizadas cuidadosamente para obter os resultados com o mínimo de perturbação do ELL. Por último, pesou-se o tubo com a fase inferior restante. A Figura 3.4, ilustra a coleta das fases para pesagem.

Figura 3. 3: Obtenção das linhas de amarração: (a) Tubos de vidro em repouso no banho termostático; (b) Fases próximas ao menisco de separação das fases na seringa em repouso no banho termostático com tubos de ensaio revestidos com isolante de algodão.



Fonte: Do autor.

Figura 3. 4: Esquema de coleta das fases: (a) Equilíbrio líquido-líquido; (b) Coleta de parte da fase superior; (c) Material coletado próximo ao menisco; (d) Fases superior e inferior, coletadas na etapa (c), em repouso na seringa.



Fonte: Do autor.

As LAs foram determinadas pelo método gravimétrico, originalmente proposto por Merchuk *et al.* (1998). Inicialmente, os pontos obtidos experimentalmente para as curvas binodais foram ajustadas pela Equação 3.1. que foi reescrita para as fases superior (Equação 3.3) e inferior (Equação 3.4).

$$w_1 = A \exp(B(w_2)^{0,5} - C(w_2)^3) \quad (3.1)$$

em que w_1 , refere-se à fração mássica do líquido iônico ou do PEG, dependendo do tipo de sistema, e w_2 é a fração mássica do sal. Os parâmetros A, B e C são constantes obtidas por regressão não-linear.

Os ajustes foram feitos no *software* Statistica 7.0, sendo obtidos os intervalos de confiança de cada parâmetro a 95 % para o cálculo da propagação de erros. A qualidade do ajuste foi avaliada tanto em termos do coeficiente de determinação (R^2) como também da incerteza padrão (sd), calculada pela Equação 3.2.

$$sd = \left(\left(\sum_{i=1}^n (100w_i^{cal} - 100w_i^{exp}) \right) / n \right)^{0,5} \quad (3.2)$$

em que n é o número de dados da curva binodal, w_i é a fração mássica do componente i , e os sobrescritos *cal* e *exp* referem-se a valores calculados e experimentais, respectivamente.

Em seguida, as LAs foram quantificadas aplicando-se a regra da alavanca para a relação entre a composição da fase superior e a composição global do sistema. Para a determinação das composições das linhas de amarração, o sistema de quatro equações (Equações 3.3 - 3.6) e quatro incógnitas (w_1^I , w_2^I , w_1^{II} e w_2^{II}) foi resolvido.

$$w_1^I = A \exp(B(w_2^I)^{0,5} - C(w_2^I)^3) \quad (3.3)$$

$$w_1^{II} = A \exp(B(w_2^{II})^{0,5} - C(w_2^{II})^3) \quad (3.4)$$

$$w_1^I = \frac{w_1^M}{\alpha} - \frac{1-\alpha}{\alpha} w_1^{II} \quad (3.5)$$

$$w_2^I = \frac{w_2^M}{\alpha} - \frac{1-\alpha}{\alpha} w_2^{II} \quad (3.6)$$

em que os sobrescritos, “I”, “II” e M, referem-se à fase superior, fase inferior e mistura, respectivamente. O termo α é a razão entre a massa da fase superior (g) e a massa total da mistura (g).

É importante ressaltar que as incertezas, $u(w_i)$, (para i igual a 1, PEG, ou 2, sal) das frações mássicas das fases inferior e superior foram obtidas para todos os sistemas PEG/sal e as equações utilizadas neste cálculo podem ser vistas no Apêndice E.

O comprimento (CLA) e inclinação (ILA) das linhas de amarração foram calculados pelas Equações 3.7 e 3.8.

$$CLA = \sqrt{(w_1^I - w_1^{II})^2 + (w_2^I - w_2^{II})^2} \quad (3.7)$$

$$ILA = \frac{w_1^I - w_1^{II}}{w_2^I - w_2^{II}} \quad (3.8)$$

em que w_1^I , w_1^{II} , w_2^I e w_2^{II} representam as composições de equilíbrio, em fração mássica, do líquido iônico ou PEG (1) e do sal (2), na fase superior (I) e inferior (II).

Os dados experimentais das linhas de amarração tiveram sua qualidade verificada pelos testes de Othmer-Tobias (1942), Equação 3.9, e de Bancroft, Equação 3.10, (González-Tello *et al.*, 1996).

$$\frac{1-w_1^I}{w_1^I} = k_1 \left(\frac{1-w_2^{II}}{w_2^{II}} \right)^n \quad (3.9)$$

$$\frac{w_3^{II}}{w_2^{II}} = k_2 \left(\frac{w_3^I}{w_1^I} \right)^r \quad (3.10)$$

Nas Equações 3.9 e 3.10, k_1 , n , k_2 e r são parâmetros de ajuste e $w_1^I, w_2^I, w_3^I, w_1^{II}, w_2^{II}, w_3^{II}$ são as frações mássicas do LI ou PEG (1), sal (2) e água (3) nas fases superior (I) e inferior (II).

3.4 – PARTIÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS

3.4.1 – PREPARO DOS SABS PARA PARTIÇÃO

Os experimentos de partição foram realizados em duplicata utilizando tubos de vidro (≈ 9 mL) ou tubos de centrífuga graduados. Os componentes das fases, junto com a biomolécula a ser particionada, pesavam aproximadamente 5 g. Os sistemas sem proteína, a princípio ternários, eram preparados nas quantidades idênticas aos SABS que deram origem às linhas de amarração de cada diagrama de fase obtido. Porém, no lugar da água era adicionada uma solução proteica (0,5 a 1 g/dm³), de concentração conhecida. Em seguida, os tubos eram agitados em um vórtex por 10 min a 2500 rpm, centrifugados por 20 min e mantidos em repouso por pelo menos 20 horas em banho termostático a 30 °C. Posteriormente, as fases foram coletadas e guardadas sob refrigeração para posterior análise da concentração proteica em espectrofotômetro a 280nm. Água destilada foi utilizada como branco e para diluição das amostras.

3.4.2 – MEDIDA DO pH DAS FASES

Para medir o pH de cada fase dos SABS a 30°C, nos quais foram realizados a partição, preparou-se o sistema ternário nas mesmas concentrações mássicas de cada linha de amarração e com massa total com cerca de 10g. O sistema foi agitado e mantido em repouso por no mínimo 15 horas em banho termostático. Após esse procedimento, recolheu-se as fases para medição do pH.

3.4.3 – EQUAÇÕES PARA A ANÁLISE DAS PARTIÇÕES

3.4.3.1-Coeficiente de partição

Para a análise da partição das biomoléculas, o coeficiente de partição (K_i) foi definido pela medida de concentração da proteína total (K_p), o qual está expresso nas Equação 3.11.

$$K_p = \frac{C_T}{C_B} \quad (3.11)$$

em que, C_T e C_B são, respectivamente, a concentração de proteína total (mg.ml^{-1}) nas fases superior (T) e inferior (B).

3.4.3.2- Eficiência de extração

A eficiência de extração das proteínas (BSA ou lisozima) nas fases inferior ($\% \varepsilon_B$) e superior ($\% \varepsilon_T$), foram calculadas pelas Equações 3.12 e 3.13, respectivamente. Sendo que, esta última deve ser utilizada para os casos em que a biomolécula foi recuperada em sua maior parte na fase superior e a primeira para quando a proteína foi particionada para fase inferior.

$$\% \varepsilon_B = \frac{[BIO]_{sal} * w_{sal}}{[BIO]_{PEG} * w_{PEG} + [BIO]_{sal} * w_{sal}} * 100 \quad (3.12)$$

$$\% \varepsilon_T = \frac{[BIO]_{PEG} * w_{PEG}}{[BIO]_{sal} * w_{sal} + [BIO]_{PEG} * w_{PEG}} * 100 \quad (3.13)$$

em que, $[BIO]$ representa a concentração total da biomolécula em uma determinada fase em mg. mL^{-1} , superior (rica em PEG) ou inferior (rica em sal). As frações mássicas do sal e do PEG em cada fase são identificadas, respectivamente, por w_{sal} e w_{PEG} .

3.4.4 – MODELAGEM DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados de ELL experimentais deste trabalho foram correlacionados pelo modelo termodinâmico NRTL (*Non-Random Two-liquid*). Os parâmetros de interação do modelo termodinâmico foram estimados utilizando o programa TML_LLE 2.0 (STRAGEVITCH e D'AVILA, 1997), implementado em linguagem Fortran. O procedimento é baseado no método

Simplex Modificado, proposto por NELDER e MEAD (1965) e consiste na minimização da função objetivo F (Equação 3.14), baseada na composição molar das fases. O desvio gerado ($rmsd$) entre dados calculados e experimentais pode ser calculado pela Equação 3.15.

$$F = \sum_k^D \sum_j^M \sum_i^{N-1} \left\{ (x_{ijk}^{I,exp} - x_{ijk}^{I,calc})^2 + (x_{ijk}^{II,exp} - x_{ijk}^{II,calc})^2 \right\} \quad (3.14)$$

$$rmsd = 100 \sqrt{\frac{\sum_n^M \sum_i^{N-1} \sum_n^N \left\{ (x_{exp}^I - x_{calc}^I)^2 + (x_{exp}^{II} - x_{calc}^{II})^2 \right\}}{2MN}} \quad (3.15)$$

em que, D é o número de conjunto de dados, N e M são o número de componentes e linhas de amarração, respectivamente, os sobrescritos I e II são as fases em equilíbrio, e os sobrescritos ‘ exp ’ e ‘ $calc$ ’ referem-se aos valores experimentais e calculados, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão mostrados os resultados referentes à validação do método de obtenção dos dados de equilíbrio líquido-líquido (ELL) (item 4.1), as análises dos diagramas de fases obtidos neste trabalho (item 4.2), a modelagem termodinâmica (item 4.3) e as partições das proteínas (BSA e lisozima) (item 4.4).

4.1- VALIDAÇÃO DA TÉCNICA EXPERIMENTAL

4.1.1- TURBIDIMETRIA E METODOLOGIA DE MERCHUK *et al.* (1998)

Com o objetivo de validar a técnica experimental, escolheu-se reproduzir 2 diagramas de fases: sistema PEG 4000 + tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) + água (H_2O) a 25°C e sistema PEG 4000+ citrato de sódio (pH 5,0) + água 25°C . A comparação do primeiro sistema foi feita com os dados experimentais do trabalho de Zafarani-Moattar e Toluei (2008), tendo sido comparadas a curva binodal e duas linhas de amarração. Vale mencionar que os autores determinaram a concentração de sal nas fases por fotometria de chama e a concentração de PEG de forma indireta a partir do índice de refração. Já para o segundo sistema, apenas a curva binodal foi comparada aos dados experimentais da dissertação de Torres (2013).

Para obter os pontos da binodal do primeiro sistema, utilizou-se soluções, previamente preparadas, de PEG 4000 na concentração de 50 % (m/m) e de sal a 30 % (m/m). A metodologia detalhada está descrita no item 3.3 desta tese. As Tabelas 4.1 e 4.2 mostram os dados experimentais obtidos neste trabalho junto com os dados da literatura.

Tabela 4. 1: Dados das curvas binodais dos sistemas formados por PEG 4000 (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 25°C.

Zafarani-Moattar e Toluei (2008)				Este trabalho			
$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$
27,08	6,38	15,85	9,91	43,65	3,36	17,8	9,25
26,63	6,48	13,59	10,96	40,84	3,71	15,32	10,22
26,16	6,62	11,18	12,06	37,45	4,33	13,43	11,00
25,67	6,78	8,87	13,15	35,11	4,72	11,16	11,97
24,84	7,01	6,81	14,11	31,84	5,49	8,83	13,01
24,05	7,21	5,06	14,95	29,25	5,88	6,45	14,12
22,71	7,64	3,69	15,91	26,76	6,53	4,84	14,93
20,94	8,17	2,69	16,43	24,00	7,21		
19,01	8,79			20,55	8,30		

Fonte: Do autor.

Tabela 4. 2: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por PEG 4000 (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 25°C.

LAs	Referência	ALIMENTAÇÃO		FASE SUPERIOR		FASE INFERIOR	
		$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$
1	Zafarani-Moattar (2008)	12,33	12,97	22,8	7,6	1,33	18,33
2		15,63	14,01	32,7	5,5	0,49	22,51
1	Este trabalho	12,31	12,92	22,21	7,3	1,28	18,22
2		15,58	14,10	32,34	5,21	0,43	22,22

Fonte: Do autor

A Tabela 4.3 traz os parâmetros de Merchuk *et al.* (1998) (Eq. 3.1), obtidos a partir da curva binodal experimental. O coeficiente de determinação obtido foi de 0,9994 e a incerteza padrão (*sd*) foi de 0,0018, o que qualifica o ajuste como bem sucedido. Essa etapa foi necessária para obter as composições das linhas de amarração.

Tabela 4. 3: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para os sistemas formados por PEG 4000 (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 25°C

Parâmetros		(I.C. 95%) ^b	R ²	Sd ^a
A	1,2404	(1,1556, 1,3258)	0,9994	0,0018
B	-5,666	(-5,9967, -5,3353)		
C	280,3812	(245,7708, 314,9916)		

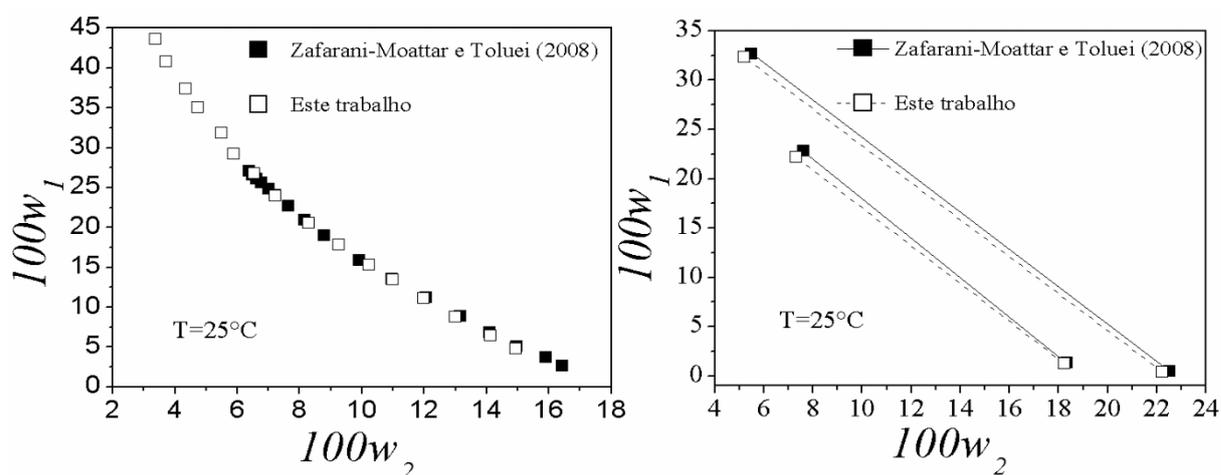
Fonte: Do autor;

^a *sd* representa a incerteza padrão (Eq. 3.2); ^b intervalo de confiança de 95%.

A Figura 4.1 mostra a comparação das curvas binodais e das linhas de amarração obtidas neste trabalho com os dados publicados por Zafarani-Moattar e Toluei (2008) para o

mesmo sistema. Como pode ser observado nesta figura, os métodos experimentais foram validados de maneira bastante satisfatória.

Figura 4. 1: Validação do diagrama de fases do sistema formado por PEG 4000 (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água a 25 °C



Fonte: Do autor

Para o segundo sistema (tampão citrato), a comparação da curva binodal obtida nesse trabalho com os dados da literatura está colocada no Apêndice A, na Tabela A1 e na Figura A1. Verifica-se uma sobreposição dados, o que evidencia o treinamento adequado para a visualização do ponto de névoa e da técnica da turbidimetria, também em sistema tampão.

4.2- EXPERIMENTOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO

4.2.1- SISTEMA DO TIPO 1: PEG + TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO + ÁGUA

Neste item, são apresentados o equilíbrio líquido-líquido (ELL) de SABs compostos por PEG de massas molares médias iguais a 1500, 4000 e 6000 g.mol⁻¹ e tampão citrato de sódio (pH 5,0, 6,0 e 7,0) a 30°C.

Dados do trabalho de Nascimento *et al.* (2018) envolvendo SABs com PEG 1500 e o mesmo sal deste trabalho foram comparados com os resultados obtidos nesta tese. As comparações podem ser vistas no Apêndice A.

4.2.1.1 – Análises envolvendo as curvas binodais

Inicialmente, foram obtidas as curvas binodais, as quais partiram de soluções de PEG (50% m/m) e tampão citrato de sódio (35 % m/m), conforme metodologia descrita no Capítulo 3. Os dados experimentais estão mostrados na Tabela B1 do Apêndice B e representados nas Figuras 4.2 e 4.3.

Os parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) são mostrados na Tabela C1 do Apêndice C, junto com os valores dos coeficientes de determinação ($R^2 \geq 0,9952$) e das incertezas padrões ($sd \leq 0,0056$) encontrados, além dos intervalos de confiança dos parâmetros ajustados à 95% de confiança.

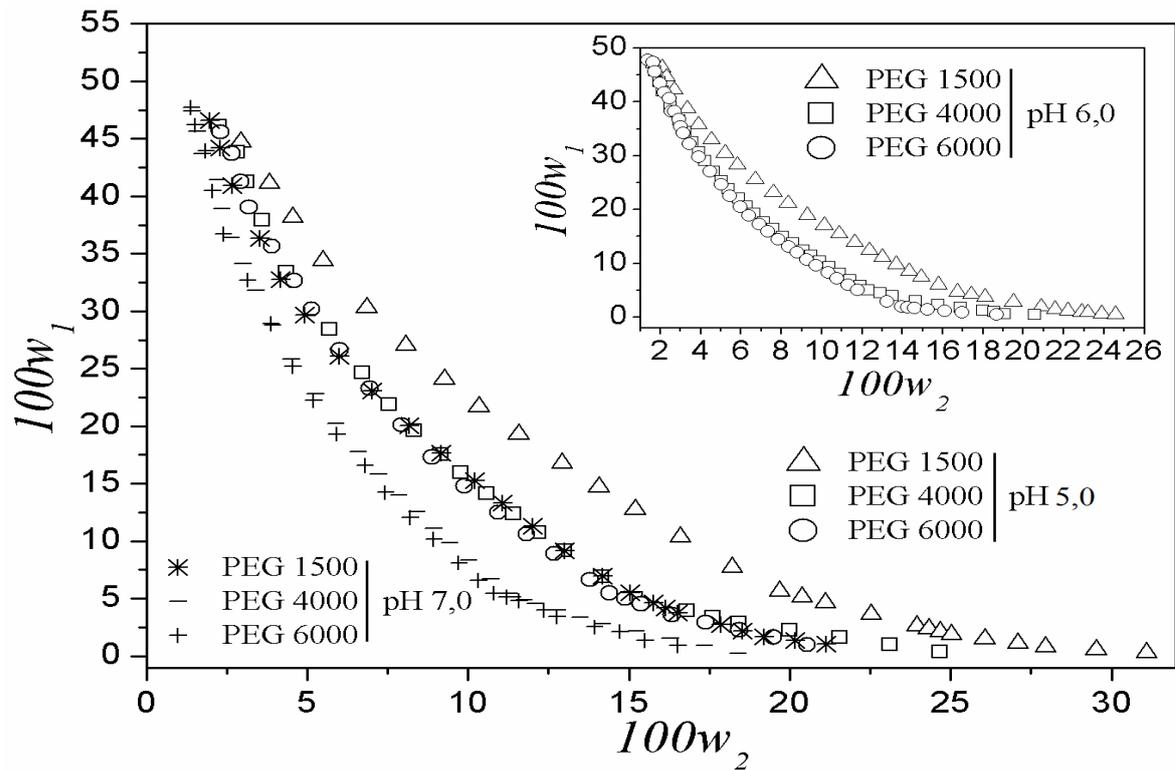
Considerando as regiões de menores concentrações de PEG nas Figuras 4.2 e 4.3, as quais mostram, respectivamente, o efeito da massa molar do PEG e o efeito do pH, observa-se que tanto o aumento da massa molar do PEG, quanto do pH do sistema, proporcionam regiões bifásicas maiores. Entretanto, a expansão dessa região foi pouco expressiva, quando se aumentou o pH de 6,0 para 7,0 e a massa molar do PEG de 4000 para 6000 g/mol⁻¹. Já em regiões ricas em PEG, para estes mesmos valores de pH e massas molares, as curvas se sobrepõem.

O efeito da massa molar do PEG, já está bem definido na literatura (ASENJO e ANDREWS, 2011; JAYAPAL *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; PIRDASHTI *et al.*, 2019; TUBÍO *et al.*, 2006), sendo que, quanto maior a massa molar do polímero, menor é a concentração de sal necessária para a formação das duas fases. Isso acontece devido ao aumento da incompatibilidade entre os componentes do sistema, uma vez que o PEG adquire um caráter mais hidrofóbico à medida que seu peso molecular aumenta.

De acordo com Ananthapadmanabhan e Goddard (1987), ânions com valência maior são melhores agentes *salting-out* do que ânions de valência menor. O ânion citrato é considerado trivalente e o processo de adicionar uma solução de ácido cítrico a uma solução de citrato de sódio faz com que aumente a quantidade de íons H⁺ do meio, reduzindo o pH e obtendo um novo tipo de ânion, o bivalente. Os íons trivalentes são mais facilmente solvatados pelas moléculas de água, sendo assim mais eficientes na promoção da exclusão do polímero. Portanto, maiores valores de pH necessitam de uma menor concentração de tampão para a formação de duas fases e, conseqüentemente, uma maior região bifásica é observada, conforme pode ser visto na Figura 4.4. Essa mesma tendência foi observada por Pirdashti *et al.* (2019) ao investigar o efeito de sais formiatos em curvas binodais formadas com PEGs de diferentes massas molares. Outros autores também encontraram resultados coerentes com os deste

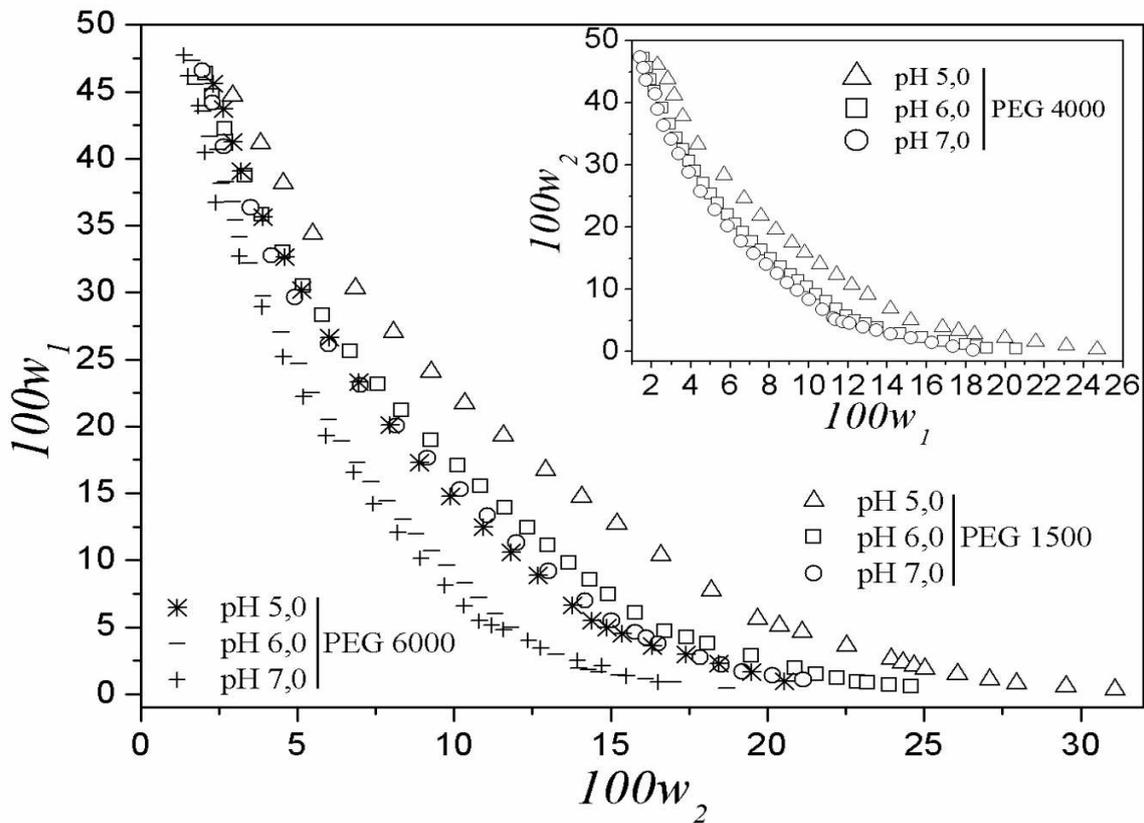
trabalho em suas pesquisas (HAMZEHZADEH E ZAFARANI-MOATTAR *et al.*, 2015; PORTO *et al.*, 2007; ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI, 2001).

Figura 4. 2: Influência da massa molar do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C em diferentes valores de pH.



Fonte: Do autor

Figura 4.3: Influência do pH nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor

4.2.1.2 - Correlações e linhas de amarração

Os dados de ELL e os valores de comprimento (CLA), inclinação (ILA) e α , referentes às composições das linhas de amarração, para os sistemas deste item são mostrados na Tabelas 4.4 e 4.5. Além disso, as incertezas, $u(100w_i)$, obtidas por propagação de erros também podem ser vistas na Tabela 4.4. As misturas ternárias iniciais foram escolhidas de tal forma que os volumes das fases no equilíbrio fossem aproximadamente iguais em quantidade, o que fica evidente pelo termo α (razão entre a massa da fase superior e a massa total no ELL) desta tabela. Para a maioria dos sistemas, a concentração de PEG na fase inferior é muito pequena, sendo que, em alguns casos, esse componente está quase excluído, mostrando assim a alta capacidade dos íons citrato em se hidratar preferencialmente e promover quase totalmente a exclusão do PEG da fase inferior. Tal resultado, também foi observado por Oliveira *et al.* (2008).

Além disso, Nascimento *et al.*, (2018) encontraram valores de ILA (inclinação da linha de amarração) semelhantes aos deste trabalho em SABs envolvendo PEG 1500/ citrato de

sódio, conforme pode ser visto no Apêndice A. Em Silveira *et al.* (2012), os quais estudaram SABs envolvendo PEG (4000 ou 8000) e citrato de sódio, os valores de ILA (inclinação da linha de amarração) e CLA (comprimento da linha de amarração) encontrados são semelhantes aos deste trabalho. Silvério *et al.* (2012) observaram também que houve variação na ILA quando se variou a massa molar do PEG de 1500 para 8000g.mol⁻¹.

Tabela 4. 4: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C

LA	ALIMENTAÇÃO		FASE SUPERIOR				FASE INFERIOR			
	100w ₁	100w ₂	100w ₁	u(100w ₁) ^a	100w ₂	u(100w ₂) ^a	100w ₁	u(100w ₁) ^a	100w ₂	u(100w ₂) ^a
<i>pH 5,0</i>										
<i>PEG 1500</i>										
1	15,47	16,38	29,76	0,16	7,10	0,39	1,62	0,16	25,38	0,38
2	19,00	16,71	37,31	0,05	4,69	0,27	0,56	0,05	28,80	0,27
3	21,06	18,49	41,81	0,01	3,58	0,23	0,09	0,01	33,39	0,24
4	24,02	19,01	45,87	0,00	2,96	0,13	0,01	0,00	36,68	0,14
<i>PEG 4000</i>										
1	15,98	13,13	30,10	0,09	5,25	0,37	0,68	0,10	21,67	0,40
2	20,46	14,83	38,48	0,00	3,50	0,28	0,03	0,01	27,67	0,32
3	20,62	16,64	41,92	0,00	2,95	0,23	0,01	0,00	29,90	0,22
4	22,99	16,68	45,68	0,00	2,43	0,26	0,00	0,00	31,25	0,28
<i>PEG 6000</i>										
1	15,08	11,39	24,12	0,16	6,73	0,27	1,73	0,23	18,28	0,40
2	17,01	13,20	31,82	0,02	4,72	0,19	0,23	0,02	22,80	0,22
3	18,97	14,96	38,24	0,00	3,43	0,16	0,03	0,00	26,28	0,15
4	20,96	15,76	43,00	0,00	2,70	0,12	0,00	0,00	28,34	0,11
<i>pH 6,0</i>										
<i>PEG 1500</i>										
1	17,96	12,73	31,96	0,05	4,85	0,16	1,03	0,07	22,26	0,20
2	20,30	12,60	35,34	0,03	4,02	0,14	0,81	0,04	23,50	0,17
3	20,63	14,11	39,45	0,01	3,16	0,12	0,22	0,01	25,97	0,13
4	21,20	16,33	43,47	0,00	2,79	0,12	0,03	0,00	28,90	0,11

Continuação da Tabela 4.4...

<i>PEG 4000</i>										
1	17,02	9,66	29,00	0,03	3,96	0,07	1,19	0,09	17,02	0,09
2	19,00	11,85	37,63	0,00	2,71	0,06	0,08	0,06	21,13	0,06
3	17,03	16,67	46,33	0,00	1,73	0,06	0,00	0,06	25,02	0,06
4	21,00	15,82	48,92	0,00	1,54	0,06	0,00	0,03	26,60	0,03
<i>PEG 6000</i>										
1	14,49	9,61	23,24	0,08	5,27	0,25	0,86	0,12	16,52	0,36
2	17,05	11,78	32,73	0,00	3,42	0,19	0,03	0,01	20,85	0,21
3	18,96	13,62	39,51	0,01	2,41	0,16	0,00	0,00	23,96	0,14
4	20,77	15,61	47,01	0,00	1,34	0,01	0,00	0,01	26,82	0,01
<i>pH 7,0</i>										
<i>PEG 1500</i>										
1	18,01	10,50	30,45	0,27	4,77	0,31	2,05	0,27	18,01	0,32
2	18,95	11,64	34,60	0,14	3,87	0,25	1,33	0,16	20,39	0,29
3	22,07	12,37	41,79	0,06	2,58	0,16	0,47	0,07	23,08	0,17
4	22,98	15,22	49,95	0,02	1,57	0,13	0,08	0,02	26,81	0,12
<i>PEG 4000</i>										
1	16,96	9,66	30,75	0,04	3,57	0,17	0,46	0,05	16,95	0,21
2	18,95	11,42	39,65	0,01	2,23	0,12	0,07	0,01	19,82	0,11
3	20,01	12,31	43,67	0,02	1,68	0,20	0,02	0,02	21,01	0,20
4	20,96	13,19	48,53	0,01	1,34	0,11	0,01	0,00	22,20	0,09
<i>PEG 6000</i>										
1	16,96	9,72	31,45	0,04	3,34	0,21	0,30	0,04	17,06	0,24
2	21,92	9,12	36,48	0,01	2,58	0,17	0,08	0,01	18,93	0,26
3	19,01	11,44	39,20	0,00	2,23	0,16	0,03	0,00	20,10	0,15
4	20,98	13,16	44,55	0,00	1,67	0,13	0,00	0,00	23,38	0,12

Fonte: Do autor

^a Incertezas ($u(100w_i) < 0,5$ para $i = 1$ ou 2 em todos os sistemas);

Tabela 4. 5: Dados para análise das linhas de amarração (LAs) da Tabela 4. 4 para os sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C

<i>LA</i>	<i>PEG</i>	<i>CLA</i> ^a			<i>CLA</i> ^a			<i>CLA</i> ^a		
		<i>ILA</i> ^b	α^c	<i>CLA</i> ^a	<i>ILA</i> ^b	α^c	<i>CLA</i> ^a	<i>ILA</i> ^b	α^c	
		pH 5,0			pH 6,0			pH 7,0		
1	1500	33,55	-1,54	0,49	35,49	-1,78	0,55	31,33	-2,15	0,52
2		43,96	-1,52	0,50	39,65	-1,77	0,55	37,14	-2,01	0,53
3		51,27	-1,4	0,50	45,38	-1,72	0,52	46,13	-2,02	0,47
4		56,92	-1,36	0,51	50,68	-1,66	0,49	55,9	-1,98	0,46
1	4000	33,69	-1,79	0,53	30,73	-2,13	0,54	33,12	-2,26	0,54
2		45,42	-1,59	0,52	41,82	-2,04	0,37	43,31	-2,25	0,48
3		49,84	-1,56	0,49	51,85	-1,99	0,50	47,74	-2,26	0,43
4		54,01	-1,58	0,51	54,96	-1,95	0,44	52,82	-2,33	0,51
1	6000	25,19	-1,94	0,60	25,05	-1,99	0,61	34,04	-2,27	0,6
2		36,4	-1,75	0,53	37,05	-1,88	0,52	39,91	-2,23	0,53
3		44,52	-1,67	0,50	45,01	-1,83	0,48	43,06	-2,19	0,48
4		50,06	-1,68	0,51	53,46	-1,84	0,41	49,56	-2,05	0,47

Fonte: Do autor.

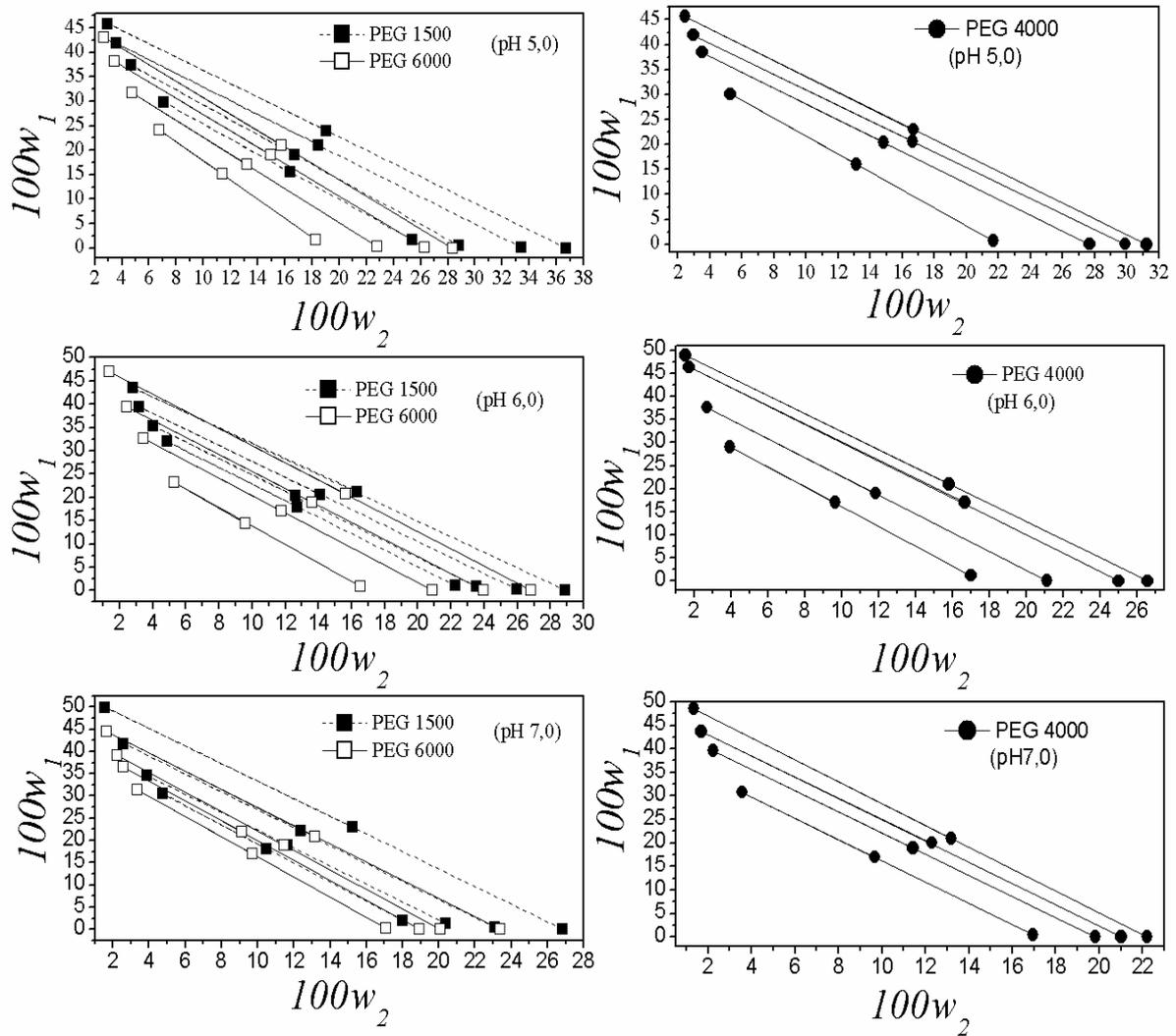
^a *CLA* (comprimento da LA, Eq. 3.7) ^b *ILA* (inclinação da LA, Eq. 3.8); ^c $\left(\alpha = \frac{\text{massa da fase superior}}{\text{massa de alimentação}}\right)$

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram, respectivamente, o efeito do PEG e do pH nos valores de ILA de todos os SABs do tipo PEG/tampão citrato. É importante mencionar que não foram observadas mudanças significativas nesses valores quando se variou a massa molar do PEG, como visto na Figura 4.4. No entanto, quando as ILAs dos pHs 5,0 e 7,0 são comparadas na Figura 4.5 e Tabela 4.5, observa-se que elas aumentam com o acréscimo do pH. Pirdashti e colaboradores (2015), também observaram um aumento nas ILAs ao estudarem SABs do tipo PEG 3000/ citrato de sódio nos pHs 6,1, 7,5 e 9,0.

Tubío *et al.* (2006) estudaram a influência tanto do pH quanto da massa molar do PEG em sistemas compostos por PEG e citrato de sódio, e não observaram diferenças importantes nos valores de ILA quando os valores de pH ou massa molar foram variados. Nascimento *et al.* (2018) também não encontrou grandes variações nas ILAs em seus experimentos.

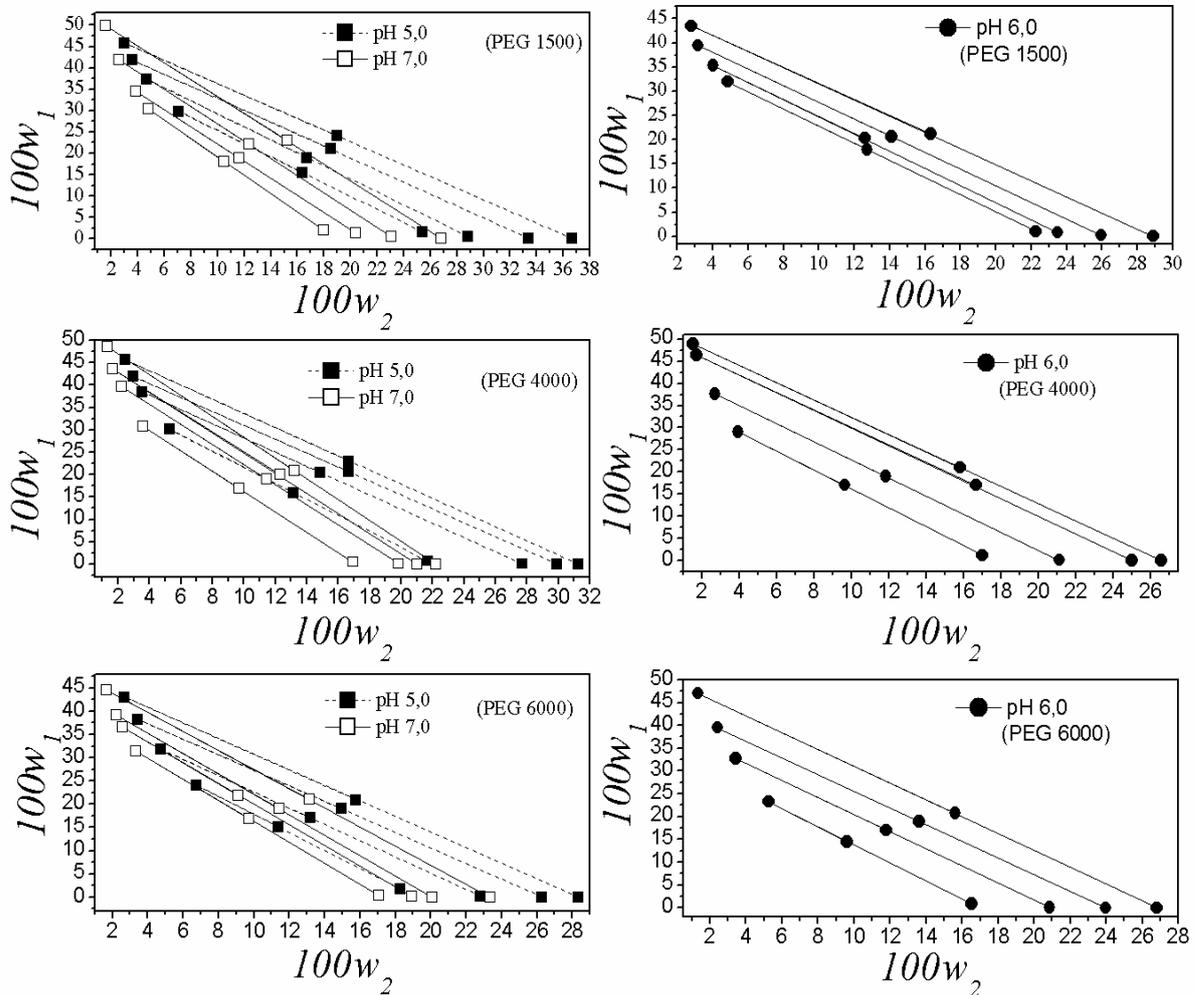
A influência do pH, da temperatura e do tipo de sal para sistemas compostos por UCON 50 HB-2000 + fosfato de potássio ou citrato de sódio foi estudada por Nascimento *et al.* (2011). Diferenças significativas nos valores de ILA e CLA foram observadas quando se compararam experimentos nas temperaturas de 4 e 25°C, mas quando se aumentou o pH de 7,0 para 8,0 apenas uma pequena mudança foi observada.

Figura 4. 4: Diagramas de fases para os sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C e análise da influência do PEG na inclinação das linhas de amarração.



Fonte: Do autor

Figura 4. 5: Diagramas de fases para os sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C e análise da influência do pH na inclinação das linhas de amarração.



Fonte: Do autor

A qualidade dos dados de equilíbrio obtidos foi avaliada pelos testes de Othmer-Tobias (1942) e Bancroft (González-Tello *et al.*, 1996), os quais apresentaram coeficientes de determinação maiores que 0,9838 na maioria dos dados da Tabela 4.6.

Tabela 4. 6: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C

pH	<i>Othmer-Tobias (Eq.3.9)</i>			<i>Bancroft (Eq. 3.10)</i>		
	k_1	n	R_1^2	k_2	r	R_2^2
PEG 1500						
5,0	0,5462	1,3292	0,9654	1,6475	0,7651	0,9630
6,0	0,3527	1,4196	0,9817	2,1560	0,7081	0,9838
7,0	0,2077	1,5919	0,9916	2,7622	0,6123	0,9924
PEG 4000						
5,0	0,4664	1,2530	0,9905	1,9123	0,8126	0,9896
6,0	0,2247	1,5089	0,9994	2,7539	0,6638	0,9996
7,0	0,0725	2,1648	0,9972	3,4116	0,4646	0,9964
PEG 6000						
5,0	0,3525	1,4647	0,9978	2,1214	0,6841	0,9992
6,0	0,2247	1,5089	0,9994	2,7539	0,6638	0,9996
7,0	0,2082	1,4746	0,9855	2,9479	0,6969	0,9844

Fonte: Do autor

4.2.2- SISTEMA DO TIPO 2: PEG + TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO + ÁGUA

Os diagramas de fases para os sistemas do tipo PEG (1500, 4000 e 6000 g.mol⁻¹) + tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄/K₂HPO₄) + água a 30°C e nos valores de pHs 6,0, 7,0 e 8,0 foram avaliados experimentalmente.

4.2.2.1-Análises envolvendo a curva binodal

A Tabela B2 do apêndice B apresenta as concentrações mássicas do PEG e do sal que fazem parte das curvas binodais dos SABs do tipo PEG/ (KH₂PO₄/K₂HPO₄). Para obter tais curvas, soluções aquosas de PEG foram preparadas na concentração de 50% (m/m), enquanto as soluções de tampão fosfato de potássio 30 % (m/m) com pHs 6,0, 7,0 e 8,0 foram preparadas adicionando-se quantidades apropriadas da solução de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) na solução de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), ambas com concentração mássica de 30 %. Tal procedimento foi realizado com o auxílio de um pHmetro.

A equação de Merchuk foi ajustada satisfatoriamente ($R^2 \geq 0,9970$ e $sd \leq 0,0063$) às curvas binodais obtidas e os resultados podem ser vistos na Tabela C2 do Apêndice C.

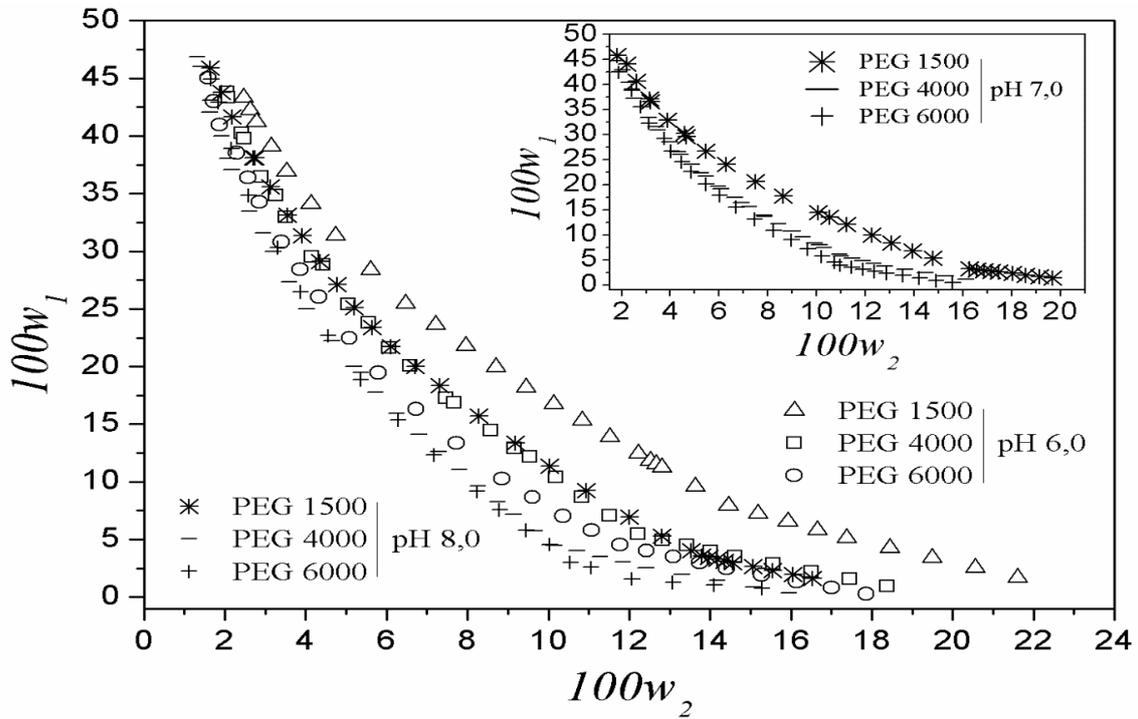
A influência da massa molar do PEG (Figura 4.6) e do pH (Figura 4.7) nas curvas binodais é semelhante ao efeito observado nos sistemas envolvendo tampão citrato.

Quanto menor a massa molar do polímero, maiores concentrações dos componentes das fases são necessárias para alcançar a região bifásica, o que está em conformidade com os trabalhos de (Albertsson,1986; PIRDASHTI *et al.*, 2019). É importante ressaltar que esta análise é feita em regiões de menores concentrações de PEG, pois em altas concentrações deste componente, as curvas se sobrepõem ou são mais próximas.

Com relação ao efeito do pH (Figura 4.7), observou-se que quanto maior o pH, maior é a região de duas fases. No entanto, percebe-se que esse comportamento é menos evidente para as curvas com pH 7 e 8. Hamzehzadeh e Zafarani-Moattar (2015) estudaram a influência do pH em SABs com polímero e citrato de sódio a 25°C e encontraram este mesmo efeito entre o pH 3 e 6. Observaram também que entre os valores de pH 6 e 7, o efeito era menos pronunciado. Outros autores também confirmaram este efeito (AHMADI *et al.*, 2018; PIRDASHTI *et al.*, 2015).

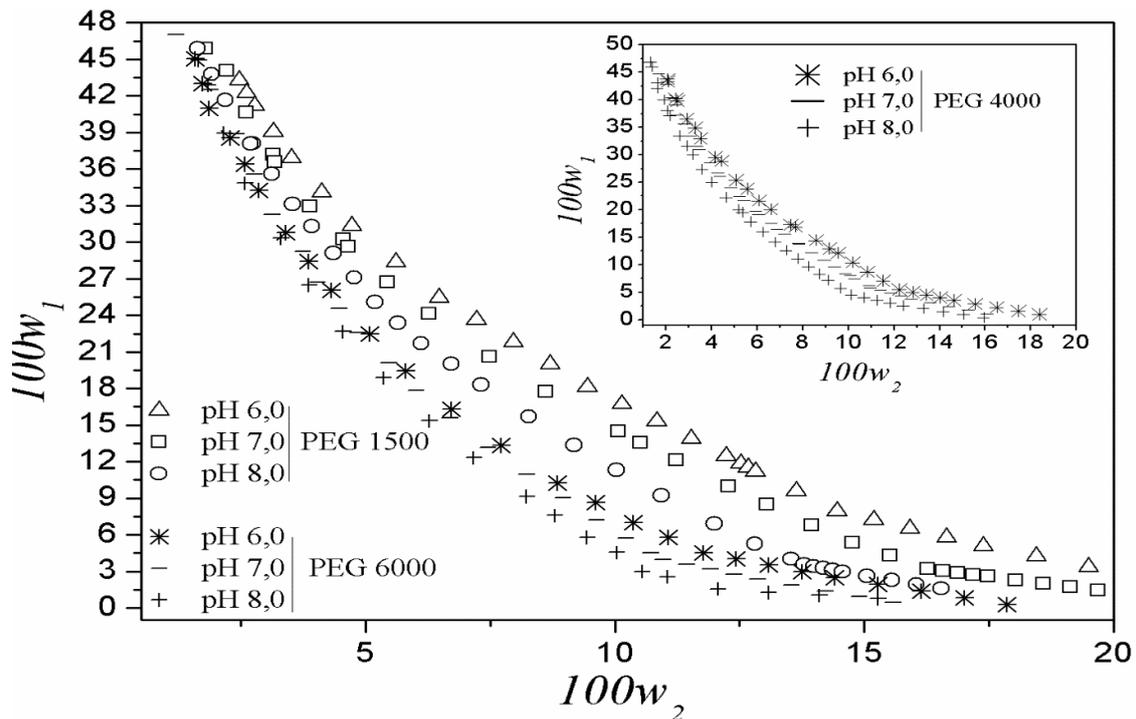
Videira e Aires-Barros (1994) estudaram SABs do tipo PEG/fosfato e verificaram que a redução do pH de 8,0 para 7,0 aumentou a concentração do polímero e sais necessários para a formação de fases, ou seja, diminuiu a região bifásica. Esse efeito pode ser explicado pelo aumento da proporção de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ com a diminuição do pH. O ânion monovalente apresenta baixo efeito “*salting-out*”, sendo necessária uma maior concentração de sal e/ou polímero para obter um sistema com duas fases.

Figura 4. 6: Influência do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.

Figura 4. 7: Influência do pH nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.

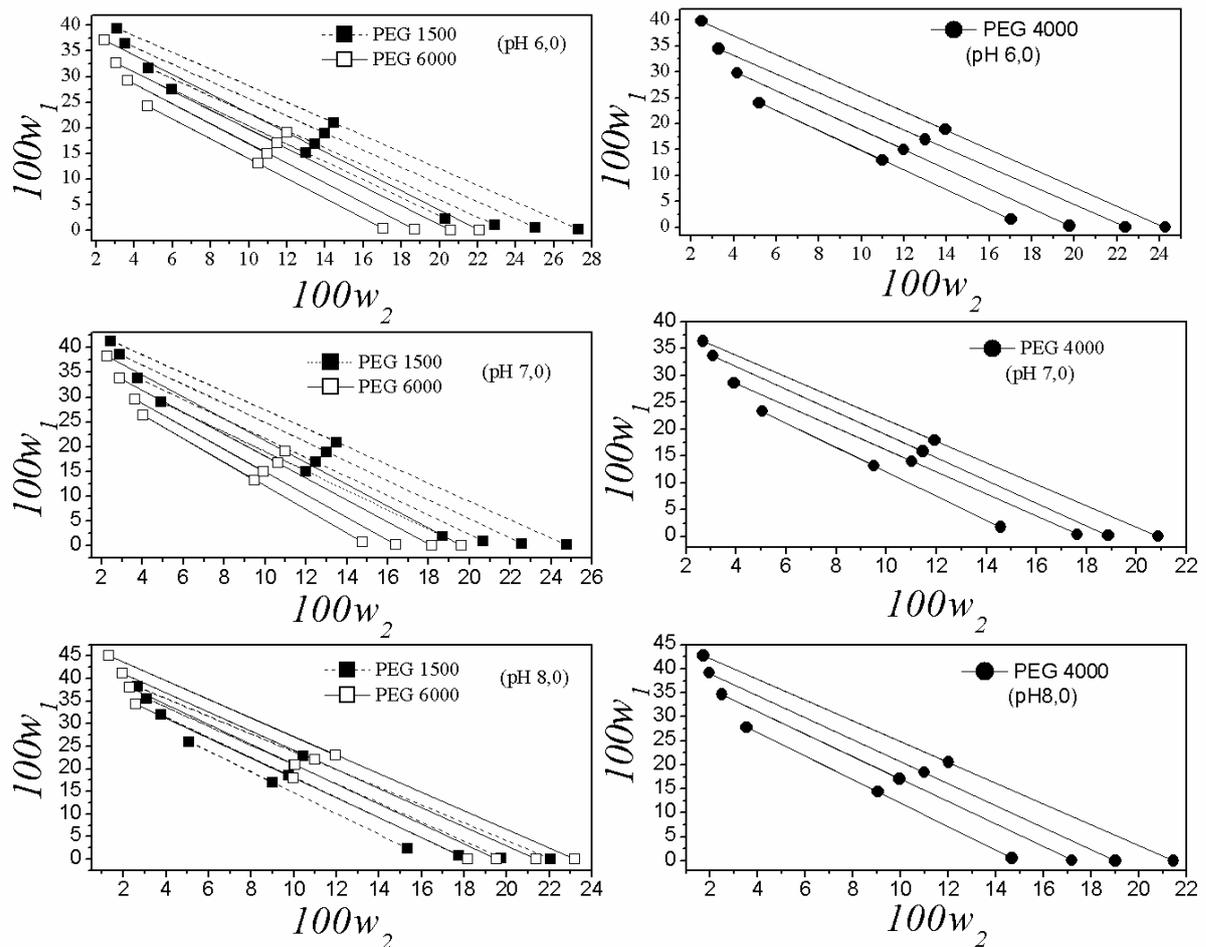


Fonte: Do autor.

4.2.2.2 - Correlações e linhas de amarração

Os dados de ELL e os valores de CLA, ILA, α e as incertezas, $u(100w_i)$, obtidas por propagação de erros, são dadas nas Tabelas 4.7 e 4.8 e os diagramas de fases são apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9. Nestas figuras, é possível ver a influência do PEG e do pH na inclinação das linhas de amarração (ILAs). Como foi observado nos sistemas PEG/ tampão citrato deste trabalho, também não ocorreu grande variação nas ILAs quando se mudou a massa molar do PEG (Figura 4.8), porém é observado um aumento na inclinação quando o pH passa de 6,0 para 8,0 (Figura 4.9).

Figura 4. 8: Influência do PEG na inclinação das linhas de amarração dos diagramas de fases dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.

Tabela 4. 7: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C

LA	ALIMENTAÇÃO		FASE SUPERIOR				FASE INFERIOR			
	100w ₁	100w ₂	100w ₁	u(100w ₁) ^a	100w ₂	u(100w ₂) ^a	100w ₁	u(100w ₁) ^a	100w ₂	u(100w ₂) ^a
<i>pH 6,0</i>										
<i>PEG 1500</i>										
1	15,11	12,99	27,44	0,16	5,95	0,27	2,27	0,16	20,32	0,28
2	16,93	13,47	31,64	0,06	4,76	0,20	1,03	0,06	22,89	0,21
3	18,95	13,99	36,50	0,02	3,52	0,14	0,56	0,02	25,01	0,14
4	21,00	14,45	39,44	0,01	3,07	0,13	0,18	0,01	27,31	0,15
<i>PEG 4000</i>										
1	12,93	10,98	24,00	0,10	5,21	0,22	1,56	0,09	17,02	0,21
2	14,99	11,99	29,77	0,03	4,16	0,19	0,30	0,03	19,76	0,19
3	16,97	12,99	34,39	0,01	3,30	0,16	0,06	0,01	22,40	0,15
4	18,87	13,94	39,75	0,00	2,50	0,13	0,01	0,00	24,26	0,12
<i>PEG 4000</i>										
1	13,05	10,49	24,22	0,04	4,70	0,18	0,39	0,04	17,04	0,20
2	15,03	10,99	29,20	0,01	3,67	0,15	0,13	0,01	18,69	0,16
3	17,02	11,49	32,73	0,00	3,06	0,13	0,03	0,00	20,61	0,14
4	19,02	12,03	37,13	0,00	2,42	0,12	0,01	0,00	22,10	0,12
<i>pH 7,0</i>										
<i>PEG 1500</i>										
1	15,06	12,02	29,03	0,18	4,90	0,32	1,93	0,17	18,70	0,30
2	16,91	12,48	33,87	0,07	3,77	0,23	0,95	0,07	20,68	0,22
3	19,01	13,00	38,65	0,03	2,88	0,18	0,44	0,03	22,56	0,17
4	20,96	13,49	41,34	0,01	2,46	0,16	0,15	0,01	24,76	0,16

Continuação da Tabela 4.7...

<i>PEG 4000</i>										
1	13,21	9,51	23,30	0,13	5,05	0,19	1,79	0,12	14,57	0,18
2	14,02	11,02	28,62	0,03	3,92	0,15	0,40	0,03	17,63	0,14
3	15,86	11,47	33,64	0,01	3,07	0,10	0,19	0,01	18,87	0,09
4	17,90	11,94	36,41	0,00	2,68	0,12	0,05	0,00	20,87	0,11
<i>PEG 6000</i>										
1	13,30	9,50	26,35	0,08	4,02	0,26	0,74	0,07	14,75	0,22
2	15,00	9,94	29,58	0,03	3,61	0,25	0,14	0,03	16,39	0,26
3	16,75	10,61	33,88	0,01	2,88	0,23	0,03	0,01	18,16	0,22
4	19,06	11,00	38,36	0,00	2,25	0,20	0,01	0,00	19,63	0,20
<i>pH 8,0</i>										
<i>PEG 1500</i>										
1	17,00	8,99	26,01	0,85	5,09	0,70	2,36	0,87	15,33	0,72
2	18,57	9,76	31,93	0,25	3,75	0,33	0,85	0,29	17,74	0,38
3	20,85	10,03	35,58	0,14	3,08	0,29	0,30	0,15	19,72	0,31
4	22,85	10,46	38,20	0,07	2,66	0,29	0,07	0,07	22,04	0,26
<i>PEG 4000</i>										
1	14,36	9,04	27,82	0,04	3,54	0,13	0,57	0,04	14,68	0,14
2	17,09	9,97	34,68	0,01	2,50	0,10	0,09	0,01	17,19	0,10
3	18,42	11,00	39,15	0,00	1,97	0,09	0,02	0,00	19,01	0,08
4	20,51	12,01	42,72	0,00	1,73	0,09	0,00	0,00	21,45	0,09
<i>PEG 6000</i>										
1	17,95	9,96	34,26	0,01	2,57	0,11	0,04	0,00	18,15	0,12
2	20,92	10,06	38,14	0,02	2,27	0,13	0,01	0,02	19,51	0,15
3	22,08	10,99	41,26	0,01	1,96	0,11	0,00	0,01	21,38	0,13
4	23,06	11,98	45,00	0,05	1,32	0,07	0,00	0,00	23,18	0,07

Fonte: Do autor;

^a Incertezas ($u(100w_i)$) <0,9 para $i=1$ ou 2 em todos os sistemas)

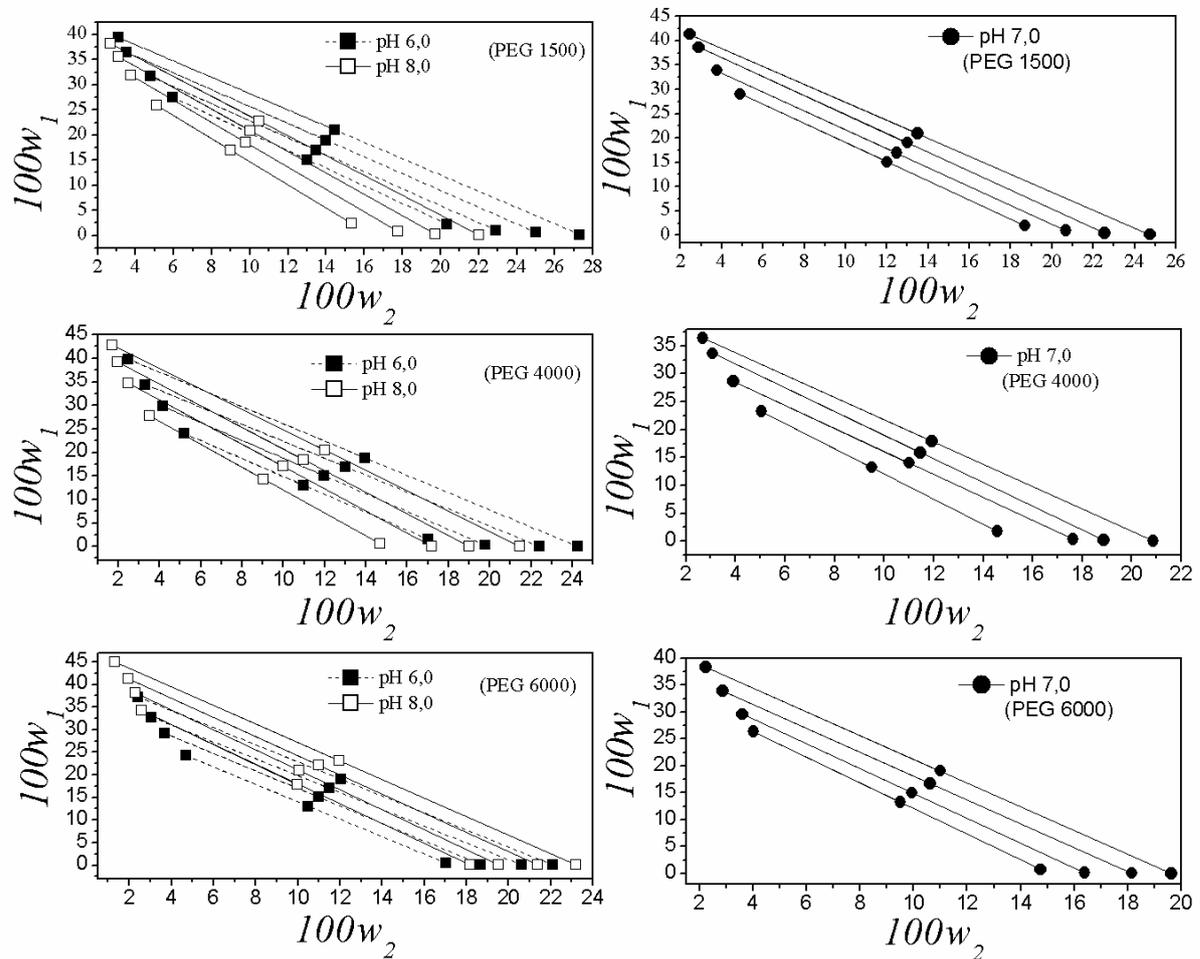
Tabela 4. 8: Dados para análise das linhas de amarração (LAs) da Tabela 4.7 para os sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C

LA	PEG	pH 6,0			pH 7,0			pH 8,0		
		CLA ^b	ILA ^c	α^d	CLA ^b	ILA ^c	α^d	CLA ^b	ILA ^c	α^d
1	1500	28,98	-1,75	0,52	30,42	-1,96	0,61	25,77	-2,31	0,45
2		35,58	-1,69	0,51	37,00	-1,95	0,50	34,08	-2,22	0,47
3		41,88	-1,67	0,55	42,98	-1,94	0,50	39,01	-2,12	0,62
4		46,14	-1,62	0,55	46,83	-1,85	0,48	42,77	-1,97	0,57
1	4000	25,36	-1,90	0,21	23,53	-2,26	0,35	29,45	-2,45	0,51
2		33,34	-1,89	0,21	31,38	-2,06	0,27	37,57	-2,35	0,47
3		39,29	-1,80	0,78	36,99	-2,12	0,53	42,69	-2,30	0,51
4		45,30	-1,83	0,74	40,65	-2,00	0,48	47,05	-2,17	0,49
1	6000	26,84	-1,93	0,43	27,77	-2,39	0,49	37,60	-2,20	0,55
2		32,72	-1,94	0,37	32,08	-2,30	0,44	41,85	-2,21	0,52
3		37,11	-1,86	0,53	37,14	-2,22	0,48	45,60	-2,12	0,51
4		42,01	-1,89	0,51	42,11	-2,21	0,50	50,03	-2,06	0,50

Fonte: Do autor;

^b CLA (comprimento da LA, Eq. 3.7) ^c ILA (inclinação da LA, Eq. 3.8); ^d $\left(\alpha = \frac{\text{massa da fase superior}}{\text{massa de alimentação}}\right)$

Figura 4. 9: Influência do pH na inclinação das linhas de amarração dos diagramas de fases dos sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C



Fonte: Do autor.

A Tabela 4.9 mostra a avaliação da qualidade dos dados de ELL, obtidos experimentalmente, através dos testes de Othmer-Tobias (1942) e Bancroft (González-Tello *et al.*, 1996). Os parâmetros dessas equações, bem como os coeficientes de determinação ($R^2 > 0,974$), estão apresentados na Tabela 4.9. Os resultados destes testes mostraram que os dados experimentais são adequados.

Tabela 4. 9: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C

pH	<i>Othmer-Tobias (Eq. 3.9)</i>			<i>Bancroft (Eq. 3.10)</i>		
	k_1	n	R_1^2	k_2	r	R_2^2
PEG 1500						
6,0	0,364	1,453	0,993	2,083	0,679	0,993
7,0	0,226	1,614	0,985	2,585	0,612	0,980
8,0	0,281	1,346	0,981	2,682	0,725	0,974
PEG 4000						
6,0	0,258	1,584	0,996	2,444	0,621	0,995
7,0	0,241	1,482	0,978	2,751	0,648	0,977
8,0	0,178	1,516	0,989	3,172	0,673	0,987
PEG 6000						
6,0	0,163	1,859	0,990	2,694	0,551	0,989
7,0	0,186	1,550	0,991	3,056	0,639	0,994
8,0	0,215	1,443	0,990	2,945	0,710	0,989

Fonte: Do autor.

4.2.3 – SISTEMA DO TIPO 3: PEG + TIOSSULFATO DE SÓDIO + ÁGUA

Os sistemas aquosos bifásicos estudados neste item são compostos por PEG de diferentes massas molares (1500, 4000 e 6000 g.mol⁻¹) e o sal inorgânico tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C.

4.2.3.1- Análises envolvendo a curva binodal

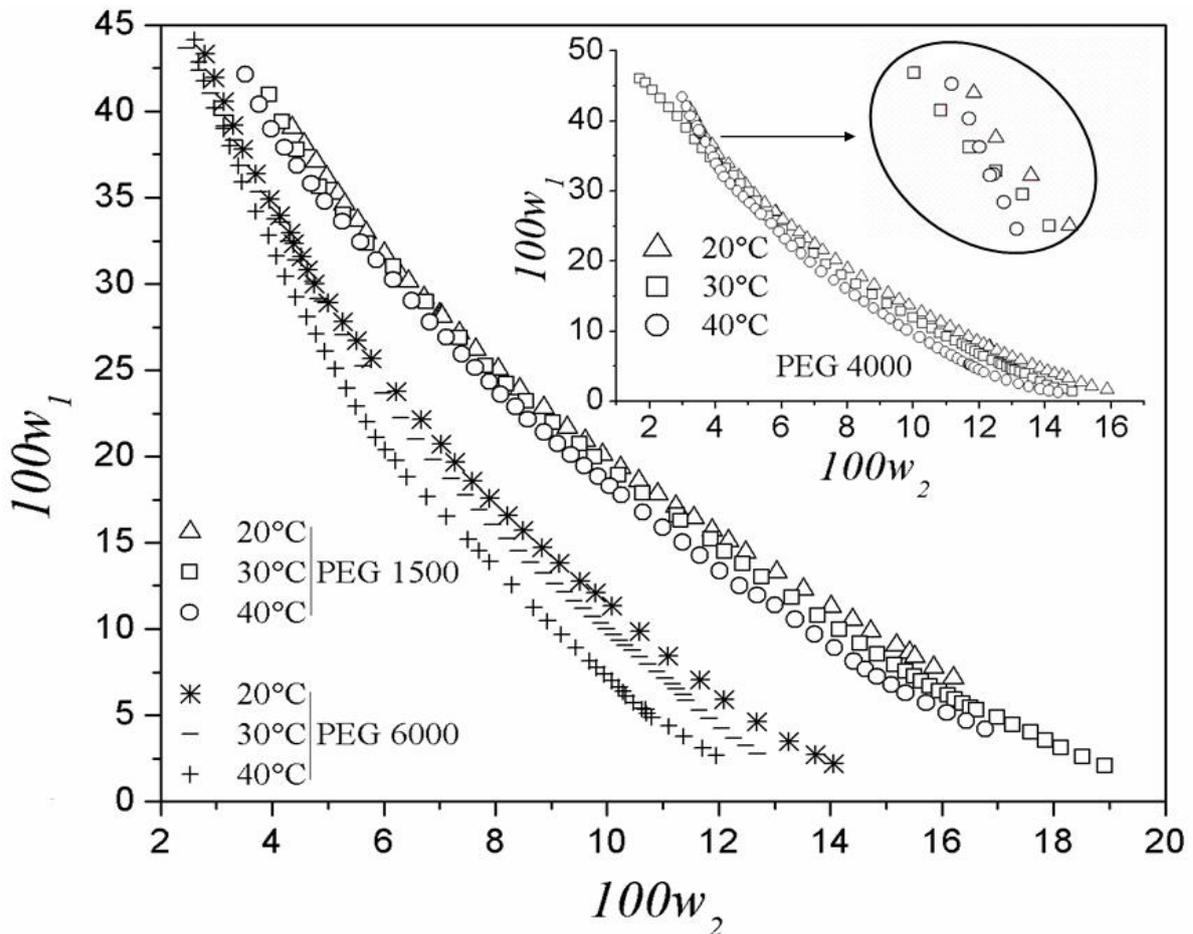
Dados de equilíbrio para SABs formados por PEG e sulfato de sódio estão disponíveis na literatura (ANANTHAPADMANABHAN e GODDARD, 1987; FERREIRA e TEIXEIRA, 2011; GHAFARI *et al.*, 2020; SALABAT, 2001; SNYDER *et al.*, 1992). No entanto, não foram encontradas referências de estudos de SABs envolvendo PEG e tiosulfato de sódio.

A Tabela B3 do apêndice B, traz os dados das curvas binodais nas três temperaturas estudadas. Esses dados podem ser visualizados nas Figuras 4.10 e 4.11, nas quais estão representadas as regiões monofásicas (abaixo da curva) e bifásicas (acima da curva). Os dados das curvas binodais foram obtidos a partir de soluções aquosas de PEG a 50 % (m/m) e de sal a ≈ 27% (m/m).

Utilizando os dados da Tabela B3, foram encontrados os parâmetros A, B e C da equação de Merchuk (Eq 3.1), os quais estão apresentados na Tabela C3 do Apêndice C, na qual se observam coeficientes de determinação maiores que 0,9988 e incertezas padrões inferiores a 0,0049, indicando que a equação representa bem os dados obtidos experimentalmente.

O efeito da temperatura é mostrado na Figura 4.10 para os PEGs 1500, 4000 e 6000. É observado que, especialmente nas regiões de baixa concentração de PEG, quanto maior a temperatura mais fácil é o aparecimento da região de duas fases. Esta relação está associada à natureza endotérmica do processo de separação de fases e já era esperado, corroborando com outros trabalhos publicados (OLIVEIRA *et al.*, 2018; REGUPATHI *et al.*, 2009). Porém, verifica-se que este efeito é bem sutil para os PEGs 1500 e 4000, o qual, estatisticamente, não é significativo e tal resultado está em conformidade com o trabalho de Martins e colaboradores (2008). Em altas concentrações de polímero, esta relação não é bem definida e isto também foi observado em trabalhos de outros autores (ZAFARANI-MOATTAR *et al.*, 2008; ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI, 2001). Nessas regiões, a intensidade de interações entre as moléculas de PEG é responsável pela separação das fases, e é esperado que a diminuição da temperatura cause a formação de duas fases devido ao aumento na repulsão entre as moléculas de PEG. Já em regiões ricas em sal, o comportamento das curvas binodais sob uma variação de temperatura depende, principalmente, do tipo de sal utilizado. O comportamento desses sistemas nesta outra região, pode ser devido às diferentes propriedades de solvência dos íons do sal em diferentes temperaturas (ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI, 2001).

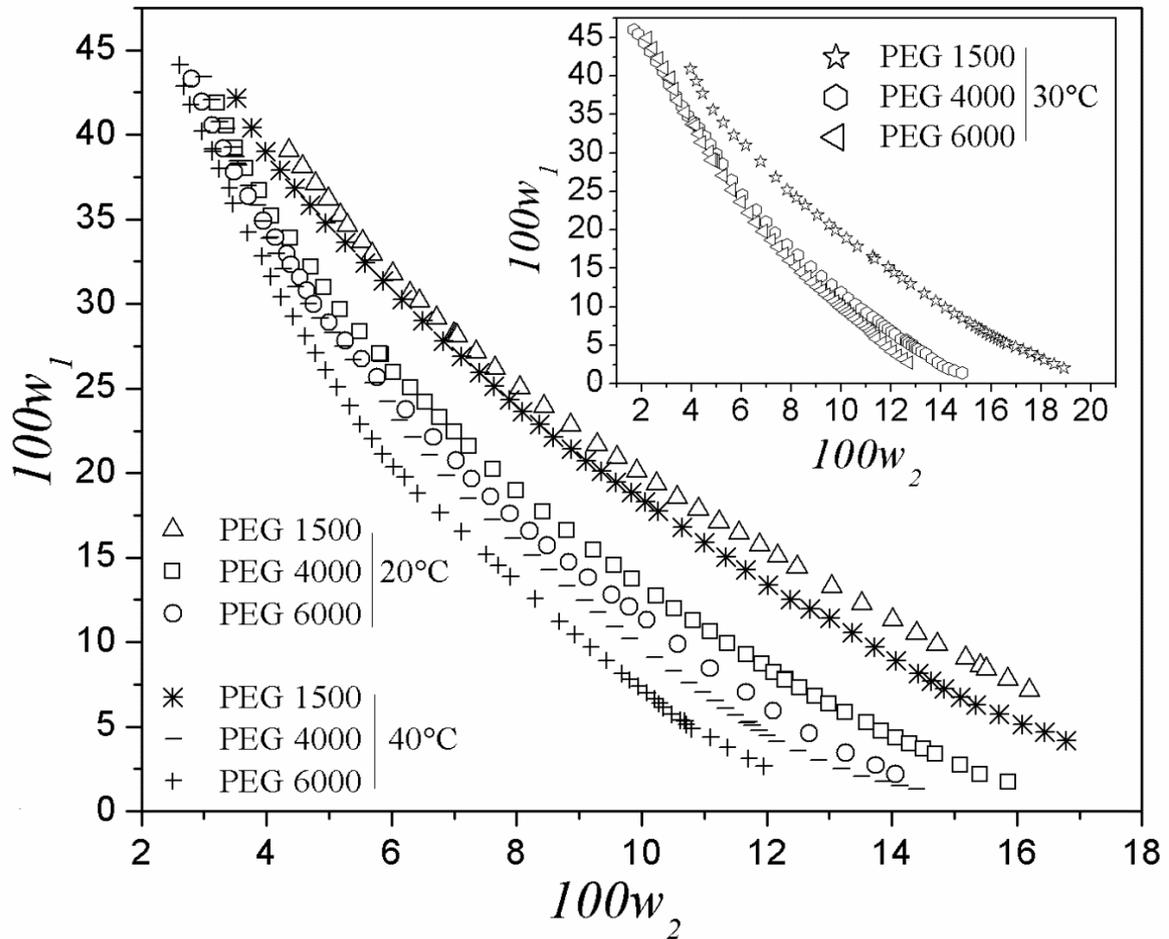
Figura 4. 10: Efeito da temperatura nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes massas molares de PEG



Fonte: Do autor.

Na Figura 4.11 observa-se que o aumento da massa molar do PEG influencia as curvas de solubilidade ampliando a região bifásica. Zafarani-Moattar e Sadeghi (2001) estudaram o efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais para o sistema PEG + NaH_2PO_4 + 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 em outros trabalhos (GRABER *et al.*, 2001; MURARI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2001; TUBÍO *et al.*, 2006; VOROS *et al.*, 1993). Portanto, esse efeito já era esperado e ocorre devido à redução da solubilidade em água de PEGs com massas molares maiores (GRABER *et al.*, 2001). Observou-se também, em regiões ricas em PEG, que essa relação foi menos pronunciada ou até invertida entre os PEGs 4000 e 6000, concordando com resultados de Zhang *et al.* (2013), para os PEGs 1000 e 2000.

Figura 4. 11: Efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tiossulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.



Fonte: Do autor.

4.2.3.2 - Correlações e linhas de amarração

A Tabela 4.10 traz os dados das linhas de amarração para os sistemas com tiossulfato de sódio em três temperaturas (20, 30 e 40 °C) e as incertezas, $u(100w_i)$, obtidas por propagação de erros. Já na Tabela 4.11, estão apresentados os valores de CLA, ILA, α . Pôde ser verificado que, o acréscimo de sal na mistura ternária inicial, aumenta o valor do CLA, conforme pode ser visto na Figura 4.12.

Tabela 4. 10: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) para os sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas

<i>LA</i>	<i>Alimentação</i>		<i>Fase superior</i>					<i>Fase inferior</i>				
	<i>100 w₁</i>	<i>100 w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>u(100w₁)^a</i>	<i>100 w₂</i>	<i>u(100w₂)^a</i>	<i>pH</i>	<i>100w₁</i>	<i>u(100w₁)^a</i>	<i>100 w₂</i>	<i>u(100w₂)^a</i>	<i>pH</i>
PEG 1500												
<i>T=20°C</i>												
1,0	17,96	12,08	27,70	0,17	7,22	0,42	-	4,25	0,20	18,92	0,48	-
2,0	18,01	13,38	32,38	0,11	5,87	0,37	-	2,05	0,12	21,72	0,41	-
3,0	17,99	14,65	37,65	0,06	4,61	0,30	-	1,32	0,05	23,16	0,26	-
4,0	17,97	15,95	42,46	0,03	3,67	0,24	-	0,83	0,02	24,55	0,17	-
<i>T=30°C</i>												
1,0	17,97	12,07	31,07	0,50	6,19	0,89	6,14	2,96	0,58	18,82	0,94	6,12
2,0	18,04	13,42	36,43	0,18	4,77	0,63	6,07	1,25	0,16	21,32	0,58	6,02
3,0	18,02	14,68	40,05	0,08	3,94	0,53	6,10	0,58	0,06	23,18	0,42	6,05
4,0	18,01	15,91	44,47	0,04	3,07	0,46	6,04	0,32	0,03	24,49	0,31	6,09
<i>T=40°C</i>												
1,0	17,98	12,78	37,43	0,08	4,36	0,31	-	1,74	0,10	19,80	0,37	-
2,0	17,51	14,27	42,11	0,05	3,41	0,28	-	0,86	0,06	21,61	0,31	-
3,0	18,02	15,26	45,26	0,03	2,86	0,24	-	0,41	0,02	23,27	0,21	-
4,0	17,94	16,53	48,48	0,01	2,38	0,21	-	0,20	0,01	24,74	0,15	-
PEG 4000												
<i>T=20°C</i>												
1,0	18,00	9,50	25,17	0,12	6,31	0,38	-	1,82	0,27	16,72	0,86	-
2,0	17,99	10,91	30,76	0,05	5,02	0,32	-	0,70	0,07	18,89	0,44	-
3,0	17,95	11,53	33,79	0,03	4,42	0,28	-	0,54	0,03	19,41	0,28	-
4,0	17,97	14,04	40,44	0,01	3,31	0,23	-	0,09	0,01	22,58	0,19	-

Continuação da Tabela 4.10...

<i>T=30°C</i>												
1,0	18,07	10,25	31,35	0,05	4,60	0,33	6,21	0,43	0,07	17,75	0,44	6,16
2,0	18,06	11,50	35,84	0,02	3,62	0,30	6,02	0,13	0,02	19,45	0,30	6,07
3,0	17,95	12,73	39,41	0,01	2,92	0,27	6,08	0,04	0,01	20,91	0,23	6,11
4,0	18,02	14,03	42,18	0,00	2,45	0,25	6,05	0,01	0,00	22,67	0,18	6,02
<i>T=40°C</i>												
1,0	18,01	12,78	37,43	0,06	4,36	0,40	-	1,74	0,07	19,80	0,45	-
2,0	18,06	14,27	42,11	0,02	3,41	0,34	-	0,86	0,02	21,61	0,30	-
3,0	18,07	15,26	45,26	0,01	2,86	0,30	-	0,41	0,01	23,27	0,23	-
4,0	18,04	16,53	48,48	0,00	2,38	0,28	-	0,20	0,00	24,74	0,19	-
PEG 6000												
<i>T=20°C</i>												
1,0	18,01	8,93	25,56	0,14	5,82	0,44	-	1,57	0,31	15,71	0,96	-
2,0	18,08	10,19	31,57	0,07	4,57	0,38	-	0,70	0,09	17,36	0,49	-
3,0	18,01	11,48	36,24	0,03	3,75	0,33	-	0,27	0,03	19,01	0,33	-
4,0	17,63	12,48	38,86	0,01	3,34	0,31	-	0,14	0,01	20,02	0,26	-
<i>T=30°C</i>												
1,0	18,09	10,15	33,80	0,04	4,01	0,30	6,18	0,36	0,05	17,09	0,34	6,13
2,0	18,07	11,51	37,18	0,01	3,43	0,27	6,12	0,08	0,01	19,12	0,26	6,09
3,0	18,06	12,76	41,04	0,00	2,85	0,25	6,09	0,02	0,00	20,54	0,20	6,12
4,0	17,96	14,02	43,50	0,00	3,05	0,28	6,08	0,02	0,00	22,83	0,22	6,09
<i>T=40°C</i>												
1,0	18,04	10,18	33,58	0,03	4,19	0,27	-	0,48	0,04	16,93	0,30	-
2,0	18,05	11,45	38,25	0,01	3,52	0,23	-	0,18	0,01	18,42	0,19	-
3,0	17,99	12,39	41,39	0,00	3,13	0,19	-	0,09	0,00	19,49	0,13	-
4,0	18,05	13,37	43,56	0,00	2,88	0,17	-	0,03	0,00	20,77	0,10	-

Do autor; ^a Incertezas ($u(100w_i) < 0,97$ para $i = 1$ ou 2 em todos os sistemas);

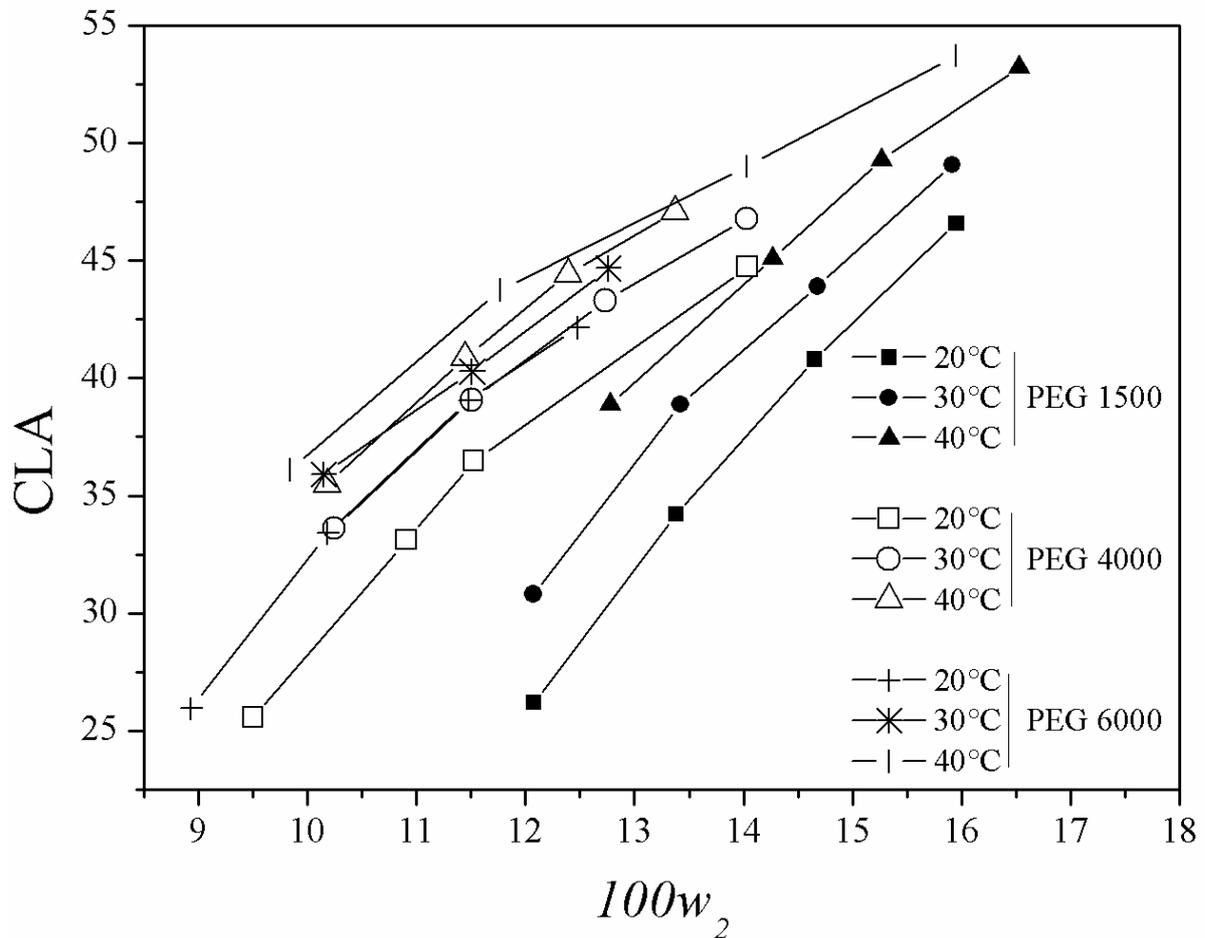
Tabela 4. 11: Dados para análise das linhas de amarração (LAs) da Tabela 4.10 para os sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.

LA	T / °C	PEG 1500			PEG 4000			PEG 6000		
		CLA ^b	ILA ^c	α ^d	CLA ^b	ILA ^c	α ^d	CLA ^b	ILA ^c	α ^d
1	20,0	26,20	-1,29	0,53	25,56	-1,40	0,69	25,95	-1,51	0,69
2		34,22	-1,25	0,53	33,10	-1,34	0,58	33,42	-1,52	0,56
3		40,80	-1,26	0,46	36,47	-1,35	0,50	39,07	-1,48	0,49
4		46,57	-1,37	0,41	44,72	-1,27	0,44	42,15	-1,46	0,45
1	30,0	30,82	-1,42	0,53	33,61	-1,50	0,57	35,91	-1,63	0,53
2		38,88	-1,36	0,48	39,06	-1,44	0,50	40,28	-1,51	0,48
3		43,90	-1,31	0,44	43,29	-1,39	0,45	44,67	-1,48	0,44
4		49,07	-1,31	0,40	46,77	-1,33	0,43	44,66	-1,44	0,44
1	40,0	38,89	-1,48	0,46	38,89	-1,62	0,53	35,47	-1,71	0,53
2		45,09	-1,44	0,40	45,09	-1,55	0,47	40,88	-1,63	0,44
3		49,28	-1,40	0,39	49,28	-1,52	0,43	44,42	-1,47	0,40
4		53,21	-1,37	0,37	53,21	-1,46	0,41	47,07	-1,41	0,37

Fonte: Do autor;

^b CLA (comprimento da LA, Eq. 3.7) ^c ILA (inclinação da LA, Eq. 3.8); ^d $\left(\alpha = \frac{\text{massa da fase superior}}{\text{massa de alimentação}}\right)$

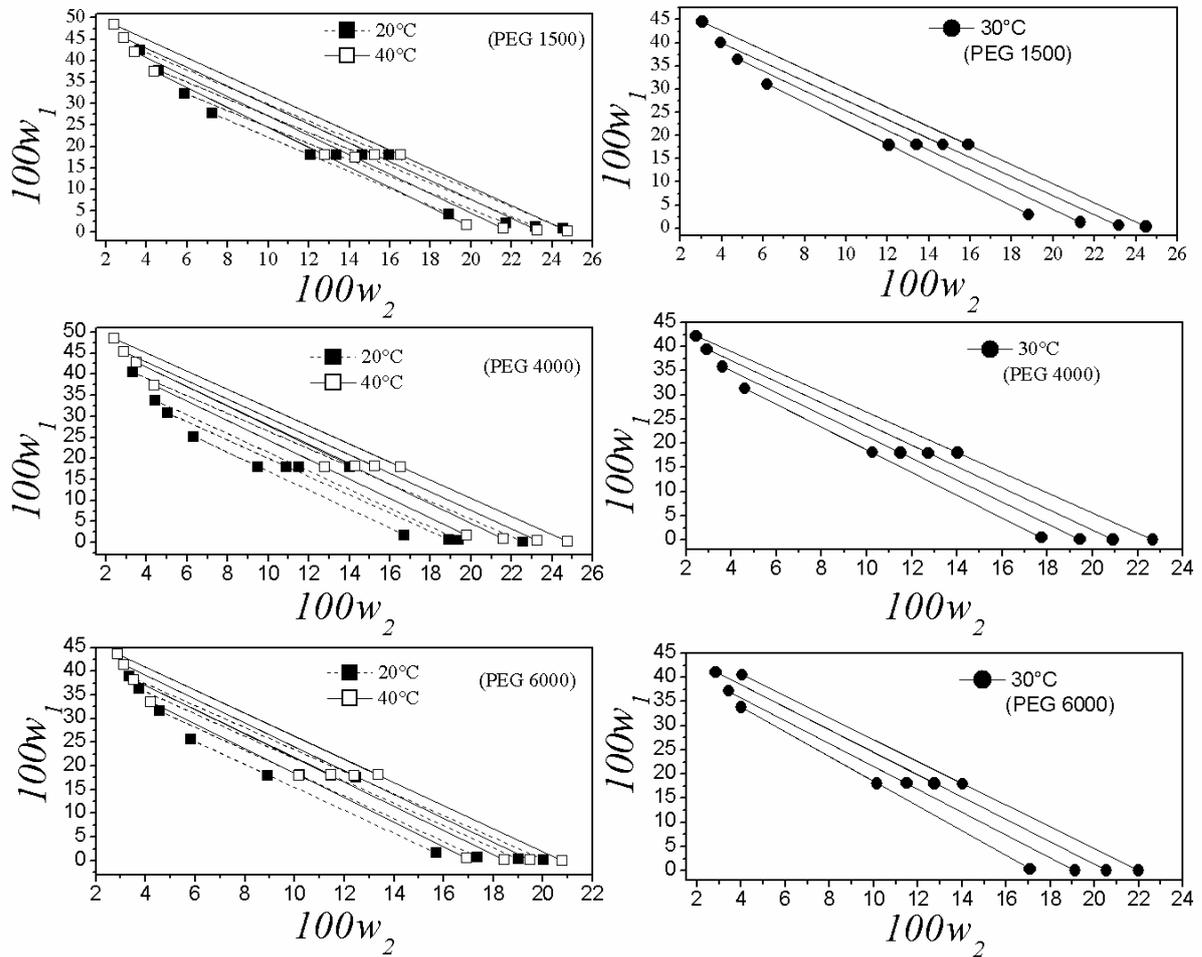
Figura 4. 12: Análise do comprimento da linha de amarração (CLA) em função da composição global de sal ($100w_2$) para os sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas e massas molares de PEG



Fonte: Do autor.

A Figura 4.13 mostra os diagramas de fases obtidos nas diferentes temperaturas para as três combinações de sistemas do tipo PEG/tiosulfato. Fica evidente, nos SABs formados com PEG 1500, que o aumento da temperatura torna as inclinações das LAs maiores. Esse comportamento também foi observado em outros trabalhos (DA SILVA *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2011).

Figura 4. 13: Diagramas de fases e influência da temperatura na inclinação das LAs dos sistemas formados por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) a 20, 30 e 40°C.



Fonte: Do autor.

Por último, verificou-se a qualidade dos dados de ELL aplicando os testes de Othmer-Tobias (1942) e Bancroft (González-Tello *et al.*, 1996), os quais apresentaram coeficientes de determinação maiores que 0,9801 para todos os sistemas investigados, sendo, portanto, de qualidade adequada. Os resultados são mostrados na Tabela 4.12.

Tabela 4. 12: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por PEG (1) + tiossulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.

T(°C)	<i>Othmer-Tobias (Eq. 3.9)</i>			<i>Bancroft (Eq. 3.10)</i>		
	k_1	n	R_1^2	k_2	R	R_2^2
PEG 1500						
20	0,6256	1,7454	0,9828	1,3976	0,5596	0,9881
30	0,6785	1,3658	0,9928	1,424	0,7313	0,9933
40	0,5808	1,3242	0,9972	1,5926	0,7679	0,9959
PEG 4000						
20	0,5007	1,7924	0,9826	1,5126	0,6025	0,9777
30	0,5926	1,3626	0,9896	1,5235	0,7913	0,9879
40	0,4749	1,4115	0,992	1,7581	0,7541	0,9901
PEG 6000						
20	0,3075	2,0665	0,9822	1,8253	0,5079	0,9801
30	0,6121	1,1676	0,9899	1,6191	0,8863	0,9904
40	0,5712	1,1407	0,9773	1,7318	0,9072	0,9762

Fonte: Do autor.

4.2.4- SISTEMAS DO TIPO 4: PEG + SAL + ÁGUA A 30°C

Os sistemas aquosos bifásicos a 30°C estudados neste item, são compostos por polietileno glicol (PEG) de diferentes massas molares (1500, 4000 e 6000 g/mol⁻¹) e quatro sais, que são: tartarato de sódio (Na₂C₄H₄O₆), tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆), fosfato dipotássico (K₂HPO₄) e citrato de potássio (K₃C₆H₅O₇).

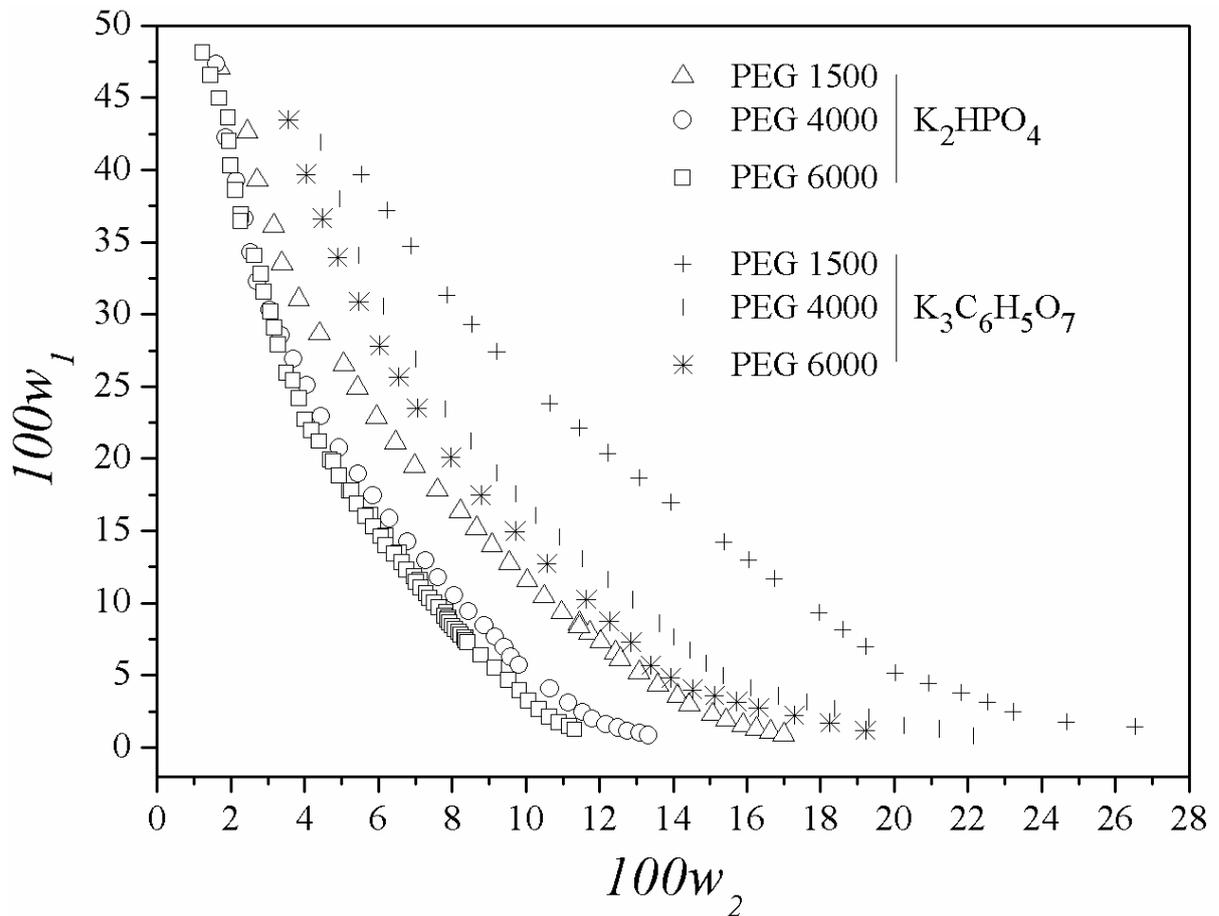
4.2.4.1-Análises envolvendo a curva binodal

Os dados binodais dos SABs a 30° C estão na Tabela B4 do Apêndice B. Para obtê-los, partiu-se de soluções de PEG a 50% (m/m) e soluções de sal, cujas concentrações mássicas aproximadas foram de: 26, 30, 35 e 30% (m/m) para o tartarato de sódio, citrato de potássio, fosfato dipotássico e tartarato de sódio e potássio, respectivamente. A equação de Merchuk foi ajustada com sucesso aos dados das curvas binodais e os resultados da regressão não linear podem ser vistos na Tabela C4 do Apêndice C, na qual se observa coeficientes de determinação maiores que 0,9966 e *sd* menores que 0,0073.

Nas Figuras 4.14 e 4.15 estão apresentadas, respectivamente, as curvas binodais para os sistemas formados por PEG/ (fosfato dipotássico (K₂HPO₄) ou citrato de potássio (K₃C₆H₅O₇)) e PEG/ (tartarato de sódio (Na₂C₄H₄O₆) ou tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆)). Em regiões de menores concentrações de PEG, o aumento da massa molar do

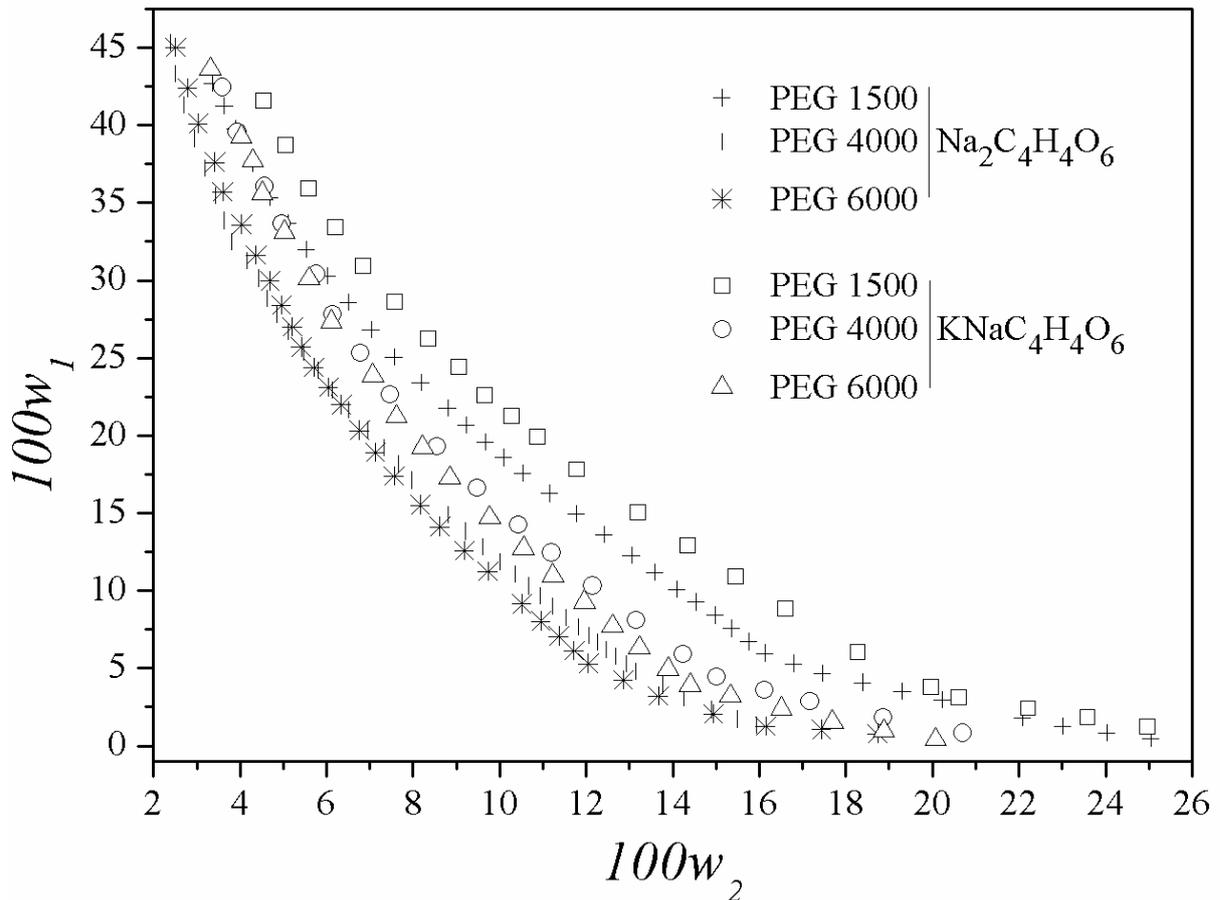
polímero contribui favoravelmente para a formação do ELL, como já foi visto e discutido em sistemas anteriores deste trabalho. Em concentrações maiores de PEG, as curvas relacionadas aos PEGs 4000 e 6000 se sobrepõem no caso dos sistemas com tartarato de sódio e potássio e fosfato dipotássico. Além disso, os SABs com tartarato de sódio, apresentam uma inversão de posição, considerando também apenas as curvas binodais com PEG 4000 e 6000. Zhang *et al.*, (2013) também observaram uma inversão, em sistemas deste tipo, quando estudaram a influência da massa molar do PEG nas curvas binodais.

Figura 4. 14: Influência da massa molar do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + fosfato dipotássico (K_2HPO_4) ou citrato de potássio ($K_3C_6H_5O_7$) (2) + água (3) a 30°C



Fonte: Do autor.

Figura 4. 15: Influência da massa molar do PEG nas curvas binodais dos sistemas formados por PEG (1) + tartarato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ou tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) (2) + água (3) a 30°C



Fonte: Do autor.

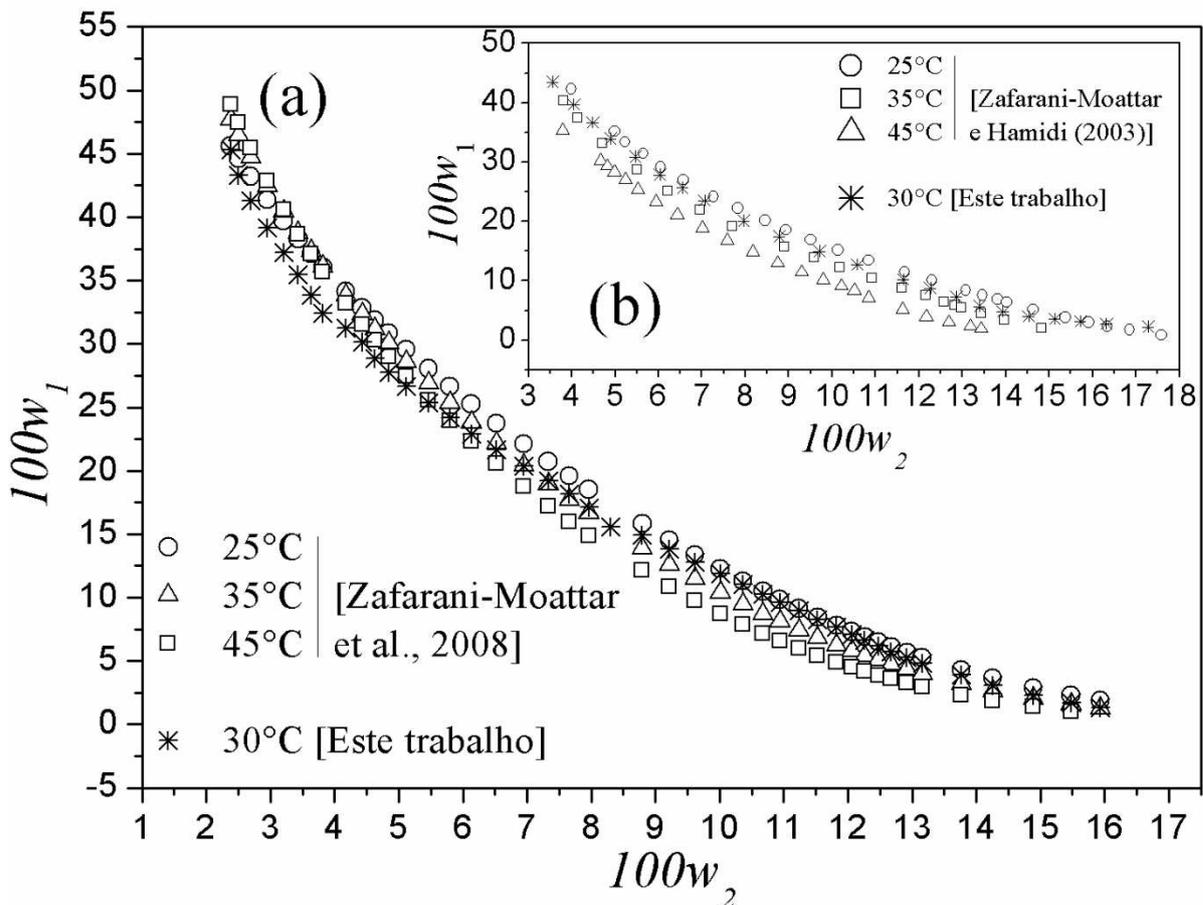
Silvério *et al.* (2012) avaliaram não só a influência da massa molar dos PEGs (1500 e 8000), mas também a influência dos ânions dos sais utilizados (citrato de sódio, citrato de potássio, formiato de sódio e formiato de potássio) em SABs a 23°C , a qual também foi avaliada neste trabalho em item específico (vide item 4.2.6). Eles observaram a formação de maiores regiões bifásicas para os sistemas com PEG 8000.

Dados de equilíbrio líquido-líquido para SABs formados por polietileno glicol 4000 e tartarato de sódio a $25,35$ e 45°C e PEGs de diferentes massas moleculares (600, 1000, 2000, 4000, 6000 e 8000) com este mesmo sal a 25°C estão disponíveis em trabalhos da literatura (MALPIED *et al.*, 2008; ZAFARANI-MOATTAR *et al.*, 2008).

Zafarani-Moattar e Hamidi (2003) também publicaram dados de ELL em diferentes temperaturas, porém para SABs do tipo PEG/ citrato de potássio. Esses dados e os resultados

do trabalho de Zafarani-Moattar *et al.* (2008) foram comparados com os experimentos realizados neste trabalho na Figura 4.16.

Figura 4. 16: Comparação das curvas binodais deste trabalho a 30°C com dados da literatura em diferentes temperaturas para sistemas formados por: (a) PEG 4000 (1) + tartarato de sódio (2) + água (3); (b) PEG 6000 (1) + citrato de potássio (2) + água (3).



Fonte: Do autor.

Pôde ser observado que os dados deste trabalho estão de acordo com o esperado em relação ao efeito da temperatura na Figura 4.16 (b) e em regiões de baixa concentração de PEG, na Figura 4.16 (a). A região rica em PEG desta última figura, mostra uma mistura das curvas ou até mesmo uma possível inversão das curvas, ou seja, as curvas de temperaturas maiores passam a apresentar uma região bifásica menor. Essa situação já foi relatada neste trabalho para o sistema PEG 4000/tiosulfato de sódio (vide item 4.2.3).

SABs formados por PEG (4000, 6000 ou 8000) e tartarato de sódio e potássio a 25°C foram estudados por Wysoczanska e Macedo (2016) e Zafarani-Moattar e Tolouei (2008).

Este último trabalho, traz os dados de ELL para o PEG 4000 + $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ + água a 25°C , os quais foram reproduzidos com sucesso na parte de validação da técnica (item 4.1).

4.2.4.2 - Correlações e linhas de amarração

A Tabela 4.13 traz as frações mássicas das linhas de amarração e os resultados dos cálculos (propagação de erros) de incertezas das frações mássicas, $u(100w_i)$, para os SABs do tipo PEG/sal a 30°C . Já na Tabela 4.14, estão apresentados os valores de CLA, ILA, α e pH das fases. Misturas ternárias de massa total inicial igual a $\approx 10\text{g}$, foram utilizadas para obter os dados de ELL e para se medir o valor do pH em cada fase. Os experimentos relacionados à obtenção das LAs, foram feitos com massa total de mistura inicial igual a $\approx 5\text{g}$.

As Figuras 4.17 e 4.18 mostram os diagramas de fases obtidos para cada sistema. Não foram encontradas grandes variações nas ILAs ao se variar a massa molar do PEG, como pode ser visto na Figura 4.17 e nos SABs com tartarato de sódio da Figura 4.18, referentes, respectivamente, aos SABs formados por PEG/citrato de potássio, PEG/fosfato dipotássico e PEG/tartarato de sódio. No entanto, nos sistemas com tartarato de sódio e potássio, as ILAs aumentaram com a variação da massa molar do PEG de 1500 para $6000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, conforme pode ser visto na Figura 4.18.

Malpied *et al.* (2008) e Zafarani-Moattar *et al.* (2008) encontraram valores de inclinação em concordância com os deste trabalho e não observaram grandes variações nas ILAs quando se variou a massa molar do PEG.

Tabela 4. 13: Dados experimentais das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.

LA	PEG	ALIMENTAÇÃO		FASE SUPERIOR					FASE INFERIOR				
		$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$u(100w_1)^a$	$100w_2$	$u(100w_2)^a$	pH	$100w_1$	$u(100w_1)^a$	$100w_2$	$u(100w_2)^a$	pH
<i>PEG-citrato de potássio</i>													
1	1500	17,97	15,06	30,39	1,13	8,12	1,69	8,49	3,12	1,29	23,23	1,93	8,33
2		19,01	16,07	35,43	0,46	6,54	1,30	8,56	1,30	0,49	26,10	1,37	8,35
3		20,06	17,04	40,11	0,20	5,32	1,09	8,75	0,60	0,20	28,40	1,06	8,35
4		21,23	18,16	43,18	0,08	4,55	1,06	8,79	0,20	0,08	31,20	1,11	8,39
1	4000	16,79	13,60	32,47	0,15	5,86	0,49	8,52	0,98	0,15	21,39	0,49	8,29
2		17,87	14,07	34,75	0,09	5,45	0,44	8,56	0,55	0,09	22,91	0,44	8,34
3		17,77	15,14	37,29	0,05	5,03	0,41	8,59	0,33	0,05	24,17	0,41	8,29
4		19,45	15,45	40,50	0,03	4,63	0,41	8,64	0,15	0,03	25,30	0,41	8,30
1	6000	14,95	11,84	25,34	0,21	6,55	0,54	8,48	1,07	0,27	18,70	0,69	8,20
2		16,97	12,70	30,11	0,06	5,63	0,46	8,52	0,27	0,07	21,67	0,58	8,21
3		19,09	13,72	36,33	0,02	4,53	0,41	8,70	0,08	0,02	23,86	0,45	8,24
4		20,99	14,64	41,44	0,01	3,79	0,37	8,73	0,02	0,01	25,77	0,38	8,37
<i>PEG-fosfato dipotássico</i>													
1	1500	14,47	10,50	26,99	0,26	4,96	0,37	9,09	2,02	0,25	16,00	0,36	9,23
2		18,00	11,02	33,53	0,05	3,58	0,24	9,19	0,43	0,05	19,43	0,26	9,26
3		18,94	12,47	40,06	0,02	2,54	0,20	9,21	0,15	0,01	21,32	0,18	9,25
1	4000	14,02	8,99	26,78	0,12	3,76	0,32	9,38	0,80	0,13	14,41	0,33	9,22
2		17,53	9,49	34,01	0,03	2,70	0,24	9,51	0,20	0,03	16,63	0,25	9,30
3		19,00	10,99	40,04	0,01	2,04	0,20	9,55	0,03	0,01	19,05	0,18	9,29
4		20,97	11,96	42,95	0,05	1,78	0,18	9,51	0,01	0,02	21,67	0,17	9,29
1	6000	14,01	9,02	28,74	0,04	3,26	0,17	9,40	0,39	0,04	14,31	0,16	9,30
2		17,52	9,54	34,18	0,01	2,57	0,14	9,39	0,05	0,01	16,86	0,15	9,38
3		19,01	10,99	38,65	0,01	2,11	0,13	9,45	0,01	0,00	19,58	0,12	9,46
4		21,00	12,02	43,76	0,03	1,68	0,11	9,47	0,00	0,00	21,57	0,10	9,53

Continuação da Tabela 4.13...

<i>PEG-tartarato de sódio</i>													
1		20,01	13,39	36,09	0,06	4,62	0,29	6,99	0,67	0,08	23,94	0,34	7,03
2	1500	21,43	14,35	40,46	0,02	3,72	0,24	7,15	0,26	0,03	26,16	0,27	7,09
3		23,96	15,85	46,10	0,00	2,78	0,20	7,18	0,04	0,01	29,80	0,22	7,13
4		26,03	17,06	52,25	0,00	1,99	0,16	7,27	0,01	0,02	32,01	0,16	7,21
1		13,48	11,41	25,53	0,10	5,48	0,23	6,95	1,18	0,10	17,47	0,23	7,03
2	4000	15,89	12,16	31,70	0,03	4,16	0,18	6,88	0,36	0,03	20,01	0,18	6,98
3		18,48	13,07	38,17	0,01	3,09	0,15	7,04	0,09	0,01	22,38	0,15	6,99
4		21,01	13,89	41,75	0,00	2,62	0,13	7,07	0,01	0,00	25,31	0,13	7,15
1		13,51	11,38	27,68	0,06	5,08	0,18	6,94	0,76	0,06	17,05	0,17	7,04
2	6000	16,01	12,24	32,33	0,01	4,22	0,15	6,89	0,13	0,01	20,04	0,15	6,97
3		18,46	13,06	38,50	0,02	3,27	0,13	7,04	0,03	0,02	22,06	0,12	6,99
4		21,01	13,91	42,39	0,01	2,78	0,12	7,08	0,01	0,01	24,84	0,12	7,03
<i>PEG-tartarato de sódio e potássio</i>													
1		17,02	14,97	30,93	0,39	7,01	0,92	7,45	1,68	0,43	23,76	1,02	7,57
2	1500	18,00	16,03	35,31	0,17	5,82	0,76	7,50	0,79	0,17	26,18	0,76	7,66
3		18,99	16,94	38,33	0,08	5,11	0,68	7,57	0,36	0,08	28,33	0,65	7,58
4		20,65	17,47	41,43	0,04	4,46	0,61	7,47	0,16	0,04	30,30	0,61	7,62
1		13,80	12,79	25,01	0,20	6,93	0,46	8,06	1,27	0,20	19,33	0,46	7,88
2	4000	16,02	13,99	33,30	0,06	5,06	0,36	7,74	0,41	0,06	22,06	0,36	7,98
3		18,03	14,95	38,51	0,02	4,15	0,31	7,88	0,12	0,02	24,40	0,31	7,95
4		19,93	15,94	42,10	0,01	3,80	0,33	7,97	0,02	0,01	26,78	0,33	7,86
1		12,46	11,99	24,14	0,46	6,97	0,55	7,56	2,49	0,49	16,18	0,59	7,58
2	6000	15,14	12,59	30,32	0,11	5,57	0,38	7,62	0,66	0,10	19,29	0,36	7,57
3		17,00	12,97	34,34	0,05	4,81	0,36	7,76	0,25	0,06	20,76	0,36	7,92
4		18,12	13,25	37,00	0,03	4,33	0,32	7,74	0,18	0,03	21,72	0,31	7,77

Fonte: Do autor.

^a Incertezas ($u(100w_i) < 1,93$, para $i= 1$ ou 2 em todos os sistemas).

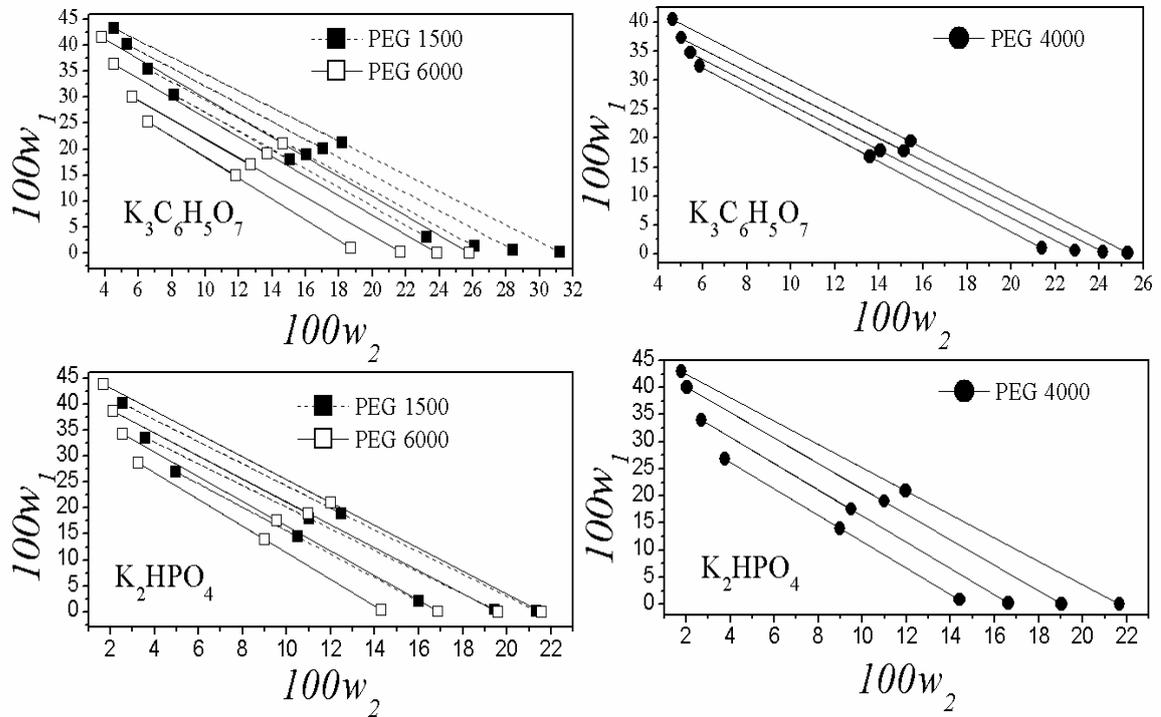
Tabela 4. 14: Dados para análise das linhas de amarração (LAs) da Tabela 4.13 para os sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.

LA	PEG	PEG-K3C5H6O7			PEG-K2HPO4			PEG-Na2C4H4O6			PEG-KNaC4H4O6		
		CLA ^b	ILA ^c	α^d									
1	1500	31,18	-1,80	0,61	27,31	-2,26	0,49	40,35	-1,83	0,47	33,71	-1,74	0,65
2		39,34	-1,75	0,57	36,70	-2,09	0,52	46,04	-1,79	0,51	40,07	-1,70	0,61
3		45,76	-1,71	0,57	44,10	-2,13	0,47	53,40	-1,71	0,46	44,50	-1,63	0,43
4		50,57	-1,61	0,49				60,25	-1,74	0,53	48,69	-1,60	0,52
1	4000	35,11	-2,03	0,50	28,08	-2,44	0,51	27,14	-2,03	0,51	26,78	-1,91	0,58
2		38,39	-1,96	0,47	36,57	-2,43	0,51	35,12	-1,98	0,50	37,03	-1,94	0,54
3		41,62	-1,93	0,51	43,48	-2,35	0,47	42,68	-1,97	0,48	43,41	-1,89	0,60
4		45,33	-1,95	0,49	47,33	-2,16	0,49	47,51	-1,84	0,50	47,95	-1,83	0,54
1	6000	27,14	-2,05	0,47	30,43	-2,57	0,48	29,45	-2,25	0,47	23,52	-2,35	0,52
2		33,88	-1,86	0,41	37,01	-2,39	0,51	35,88	-2,03	0,49	32,68	-2,16	0,49
3		41,09	-1,88	0,56	42,41	-2,21	0,49	42,81	-2,05	0,48	37,63	-2,14	0,66
4		46,89	-1,88	0,56	48,07	-2,20	0,48	47,78	-1,92	0,50	40,72	-2,12	0,61

Fonte: Do autor;

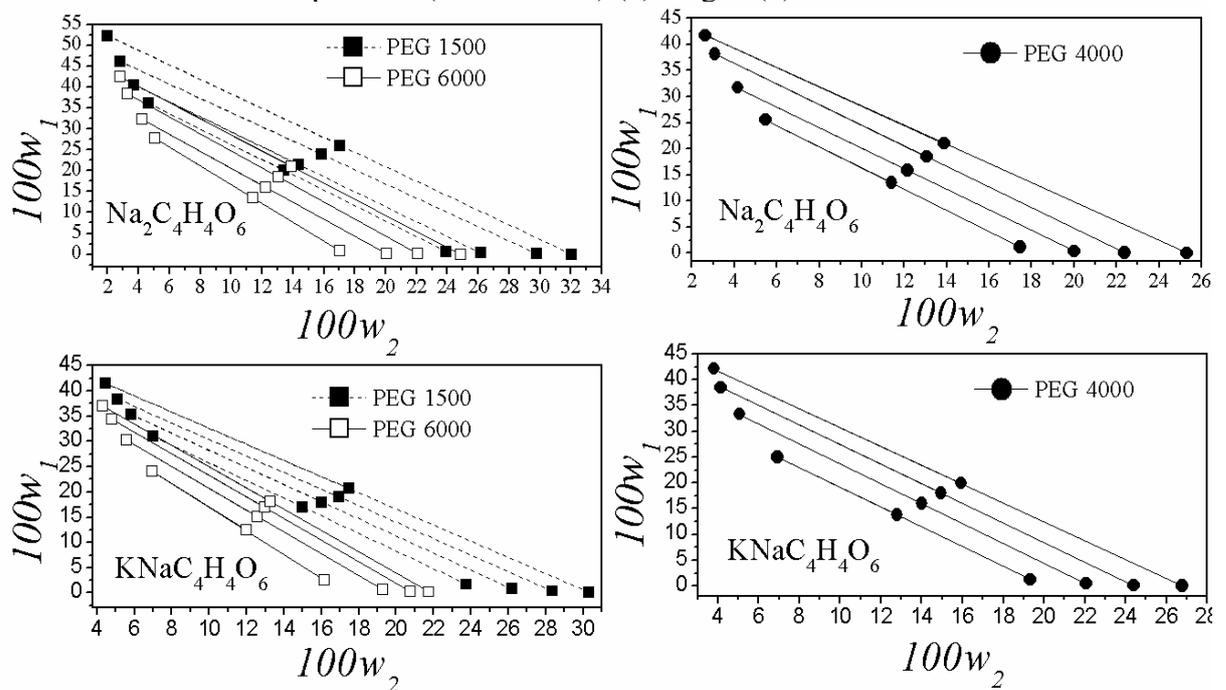
^b CLA (comprimento da LA, Eq. 3.7) ^c ILA (inclinação da LA, Eq. 3.8); ^d $\left(\alpha = \frac{\text{massa da fase superior}}{\text{massa de alimentação}}\right)$

Figura 4. 17: Diagramas de fases e influência da massa molar do PEG na inclinação das LAS dos sistemas formados por PEG (1) + citrato de potássio ($K_3C_6H_5O_7$) ou fosfato dipotássico (K_2HPO_4) (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.

Figura 4. 18: Diagramas de fases e influência da massa molar do PEG na inclinação das LAS dos sistemas formados por PEG (1) + tartarato de sódio ($Na_2C_4H_4O_6$) ou tartarato de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6$) (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.

Por fim, a qualidade dos dados de equilíbrio obtidos foi verificada pelos testes de Othmer-Tobias (1942) e Bancroft (González-Tello *et al.*, 1996) e conforme pode ser verificado na Tabela 4.15, os coeficientes de determinação (R^2) foram maiores que 0,967 em todos os casos, comprovando que os experimentos de ELL especificados neste item estão adequados.

Tabela 4. 15: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.

<i>PEG</i>	<i>Othmer-Tobias (Eq. 3.9)</i>			<i>Bancroft (Eq.3.10)</i>		
	k_1	n	R_1^2	k_2	r	R_2^2
<i>PEG-tartarato de sódio</i>						
1500	0,299	1,541	0,990	2,267	0,656	0,988
4000	0,209	1,692	0,987	2,585	0,599	0,981
6000	0,283	1,410	0,981	2,557	0,703	0,982
<i>PEG-tartarato de sódio e potássio</i>						
1500	0,447	1,375	0,997	1,901	0,726	0,996
4000	0,172	1,987	0,982	2,492	0,51	0,977
6000	0,216	1,632	0,994	2,730	0,578	0,996
<i>PEG-citrato de potássio</i>						
1500	0,001	4,293	1,000	2,670	0,255	0,993
4000	0,290	1,522	0,979	2,408	0,623	0,979
6000	0,245	1,703	0,981	2,422	0,563	0,984
<i>PEG-fosfato dipotássico</i>						
1500	0,205	1,561	0,979	2,905	0,604	0,979
4000	0,157	1,592	0,973	3,255	0,635	0,967
6000	0,258	1,264	0,995	2,994	0,799	0,995

Fonte: Do autor.

4.2.5 –SISTEMA DO TIPO 5: [bmim]BF₄ + SAIS ORGÂNICOS +ÁGUA

Nesta seção serão mostrados os resultados referentes ao estudo dos sistemas aquosos bifásicos formados pelo líquido iônico tetrafluoroborato de 1- butil 3 - metilimidazólio, o [bmim]BF₄, e três sais orgânicos, que são: citrato de sódio, tartarato de sódio e acetato de sódio em diferentes temperaturas.

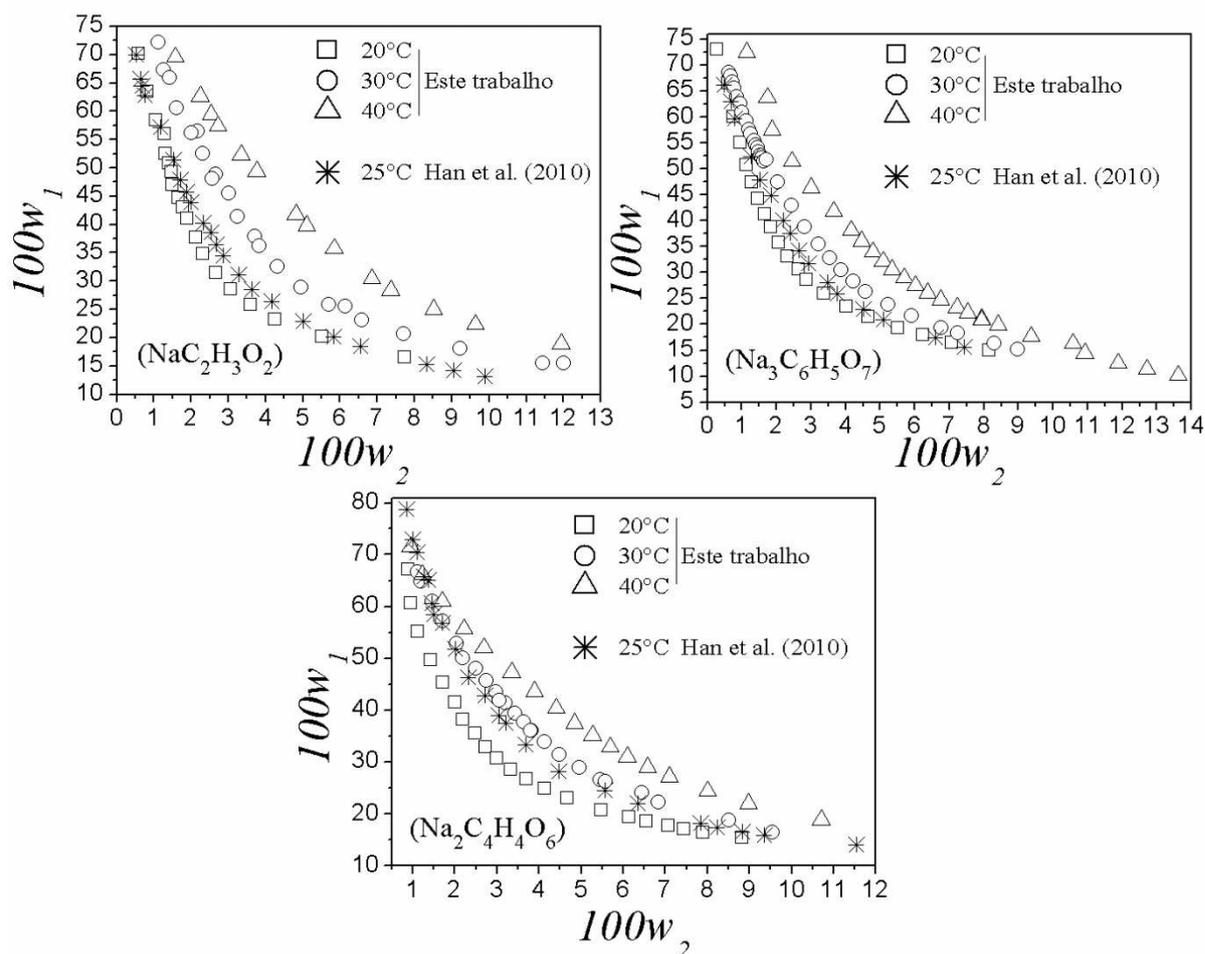
4.2.5.1-Análises envolvendo a curva binodal

Freire *et al.* (2010) estudaram a hidrólise de líquidos iônicos baseados em hexafluorofosfato e tetrafluoroborato em várias temperaturas e valores de pHs. Os resultados obtidos, por medida de pH, espectroscopia RMN e espectrometria de massa com ionização por *electrospray*, deixaram claro que o [bmim]BF₄ sofre hidrólise em todas as condições testadas, inclusive à temperatura ambiente. Os experimentos de ELL deste trabalho foram idealizados com base em artigos de SABs já publicados na literatura (HAN *et al.*, 2010a; HAN *et al.*, 2010b; WANG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; ALVARENGA *et al.*, 2013), antes mesmo de ser verificado o trabalho de investigação de hidrólise do LI [bmim]BF₄ de Freire *et al.* (2010). Apesar disto, optou-se por apresentar e discutir os resultados deste trabalho, com essa ressalva inicial.

A Tabela B5 do Apêndice B mostra os dados das curvas binodais a 20, 30 e 40 °C para os SABs do tipo LI/sal estudados neste trabalho. A equação de Merchuk foi ajustada aos dados das curvas binodais, cujos parâmetros (Tabela C5, Apêndice C), junto com os valores de R² e de *sd*, os quais foram maiores que 0,9906 e menores que 0,0072, respectivamente, para todas as nove curvas ajustadas, que a equação representa bem os dados experimentais.

As curvas binodais estão representadas graficamente na Figura 4.19, junto com dados da literatura (HAN *et al.*, 2010a) a 25 °C. Como esperado, o efeito do aumento da temperatura foi na diminuição do tamanho da região bifásica. Ressalta-se a concordância entre os dados desse trabalho com os dados de Han *et al.* (2010a) a 25 °C.

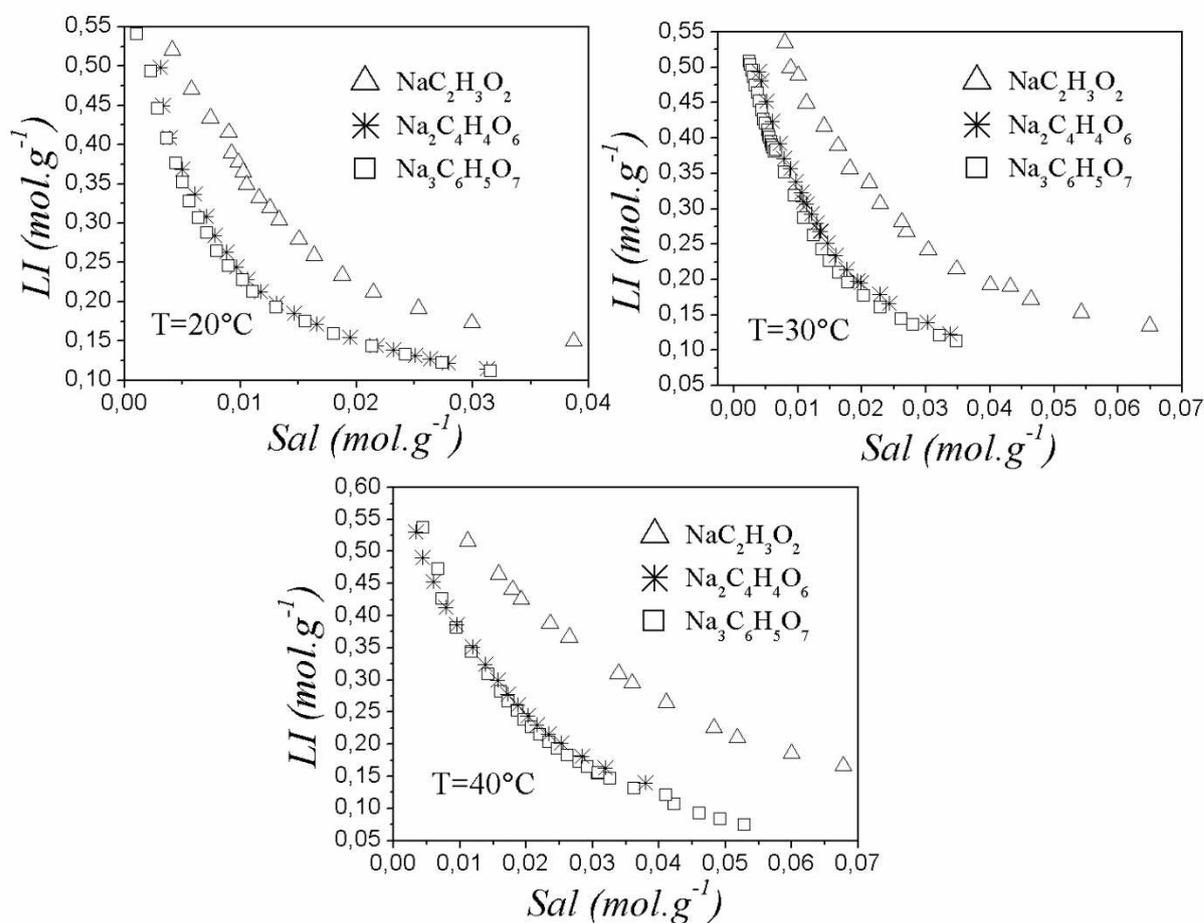
Figura 4. 19: Comparação com a literatura (HAN *et al.*, 2010) e efeito da temperatura nas curvas binodais dos SABs formados por [bmim]BF₄ (1) + acetato de sódio (NaC₂H₃O₂), citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) ou tartarato de sódio (Na₂C₄H₄O₆) (2) + água (3).



Fonte: Do autor.

Na Figura 4.20 estão apresentadas as curvas binodais com os componentes das fases expressos em mol.g⁻¹ para os diferentes sais em cada uma das temperaturas estudadas. Considerando que os três sais possuem em comum o mesmo cátion, porém com diferentes ânions, pôde-se analisar o efeito *salting-out* dos mesmos, o qual cresce na seguinte ordem: (Citrato) C₆H₅O₇³⁻ > (Tartarato) C₄H₄O₆²⁻ > (Acetato) C₂H₃O₂⁻, evidenciando que ânions com maior valência são melhores formadores de fases que aqueles com menor valência.

Figura 4. 20: Efeito do tipo de sal nas curvas binodais dos sistemas formados por [bmim]BF₄ (1) + acetato de sódio (NaC₂H₃O₂), citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) ou tartarato de sódio (Na₂C₄H₄O₆) (2) + água (3) em diferentes temperaturas.



Fonte: Do autor.

4.2.5.2-Correlações e linhas de amarração

A Tabela 4.16 traz os dados das linhas de amarração e os valores de CLA, ILA e α para os sistemas estudados nas três temperaturas (20, 30 e 40 °C). Para cada temperatura, foram obtidas três ou quatro linhas de amarração. Esses dados estão representados na Figura 4.21.

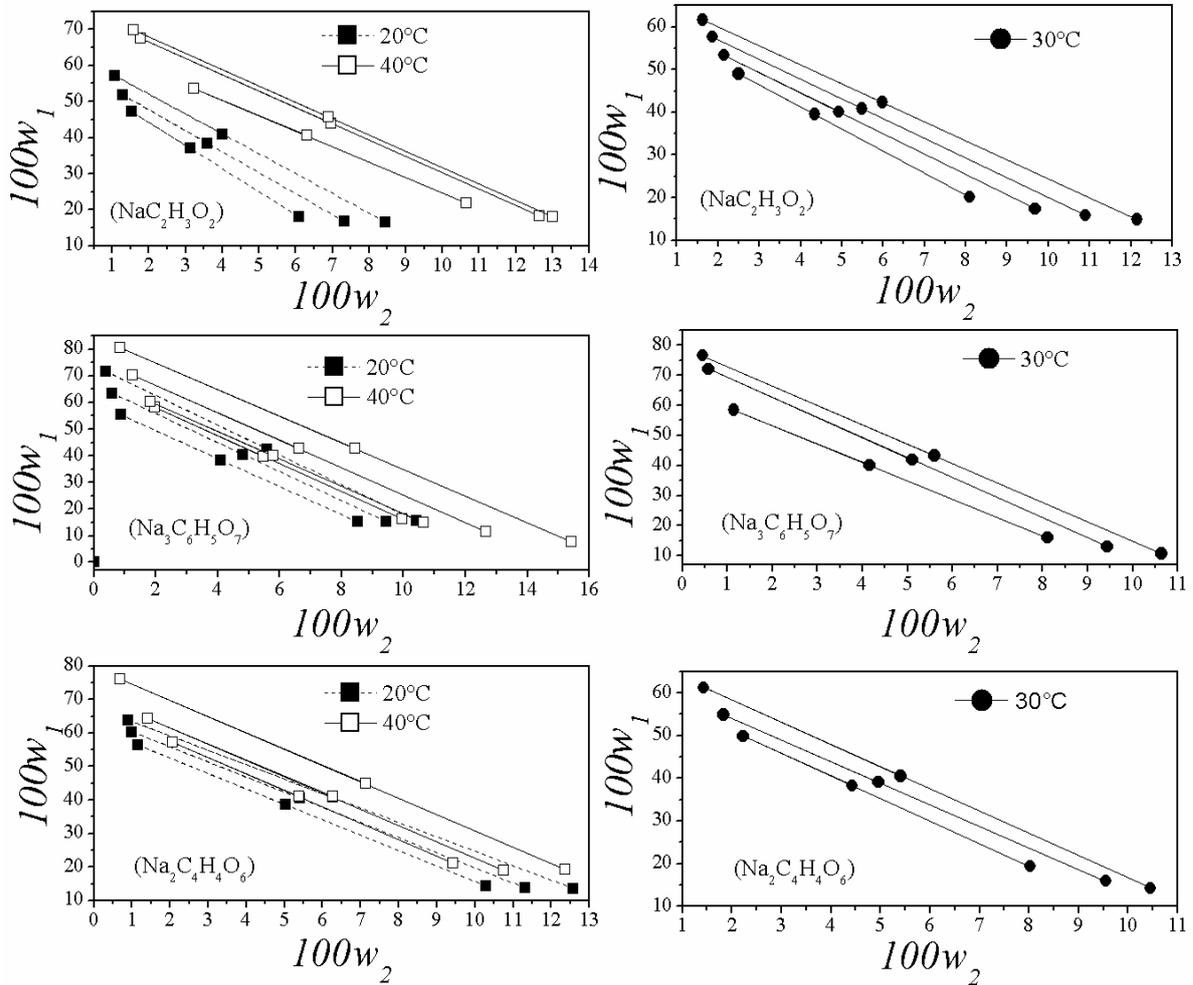
Tabela 4. 16: Dados das linhas de amarração (LAs) dos sistemas formados por [bmim]BF₄ (1) + sal (2) + água (3) em diferentes temperaturas.

LA	T / °C	ALIMENTAÇÃO		FASE SUPERIOR		FASE INFERIOR		CLA ^a	ILA ^b	α^c
		100w ₁	100w ₂	100w ₁	100w ₂	100w ₁	100w ₂			
<i>Acetato de sódio</i>										
1	20	37,04	3,12	47,24	1,52	18,12	6,08	29,47	-6,38	0,49
2		38,39	3,60	51,79	1,29	16,75	7,33	35,57	-5,79	0,50
3		41,01	4,00	57,17	1,06	16,66	8,43	41,17	-5,49	0,50
1	30	39,49	4,34	48,97	2,50	20,10	8,10	29,41	-5,16	0,49
2		40,08	4,93	53,38	2,15	17,33	9,68	36,82	-4,79	0,50
3		40,87	5,49	57,63	1,87	15,87	10,90	42,72	-4,63	0,50
4		42,28	5,98	61,62	1,63	14,82	12,15	47,97	-4,45	0,51
1	40	40,77	6,30	53,49	3,22	22,00	10,66	32,35	-4,23	0,49
2		44,02	6,97	67,55	1,76	18,42	12,63	50,32	-4,52	0,50
3		45,75	6,90	69,77	1,58	18,20	13,00	52,82	-4,51	0,50
<i>Citrato de sódio</i>										
1	20	38,36	4,10	55,40	0,86	15,20	8,51	40,93	-5,26	0,53
2		40,40	4,81	63,48	0,59	15,38	9,43	48,91	-5,44	0,52
3		42,59	5,59	71,62	0,38	15,66	10,42	56,85	-5,58	0,49
1	30	40,11	4,16	58,54	1,14	16,01	8,11	43,11	-6,10	0,53
2		41,84	5,11	72,07	0,58	12,98	9,44	59,75	-6,66	0,52
3		43,26	5,60	76,58	0,45	10,68	10,64	66,69	-6,47	0,49
1	40	39,88	5,46	58,15	1,96	16,28	9,97	42,63	-5,23	0,53
2		39,90	5,80	60,48	1,81	14,91	10,64	46,42	-5,16	0,52
3		42,72	6,61	70,39	1,26	11,48	12,65	60,01	-5,17	0,49
4		42,78	8,44	80,62	0,85	7,88	15,43	74,19	-4,99	0,51
<i>Tartarato de sódio</i>										
1	20	38,52	5,02	56,37	1,15	14,27	10,29	43,09	-4,61	0,60
2		40,50	5,40	60,34	1,00	13,79	11,31	47,68	-4,51	0,53
3		40,75	6,26	63,88	0,89	13,54	12,58	51,68	-4,30	0,50
1	30	38,26	4,43	49,86	2,23	19,32	8,02	31,08	-5,27	0,60
2		39,09	4,96	54,84	1,83	15,89	9,55	39,71	-5,05	0,53
3		40,52	5,41	61,26	1,43	14,24	10,45	47,88	-5,21	0,50
1	40	41,00	5,38	57,36	2,06	21,10	9,42	37,00	-4,93	0,60
2		41,15	6,27	64,46	1,42	18,97	10,76	46,44	-4,87	0,53
3		44,85	7,14	76,01	0,68	19,23	12,37	57,97	-4,86	0,50

Fonte: Do autor.

^a CLA (comprimento da LA, Eq. 3.7); ^b ILA (inclinação da LA, Eq. 3.8); ^c $(\alpha = \frac{\text{massa da fase superior}}{\text{massa de alimentação}})$

Figura 4. 21: Diagramas de fases e influência da temperatura na inclinação das LAs dos sistemas formados por [bmim]BF₄ (1) + acetato de sódio (NaC₂H₃O₂), citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) ou tartarato de sódio (Na₂C₄H₄O₆) (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.

A qualidade dos dados obtidos foi verificada usando os testes de Othmer-Tobias (1942) e Bancroft (González-Tello *et al.*, 1996), sendo que as constantes desses testes, bem como os coeficientes de determinação ($R^2 > 0,9581$), estão apresentados na Tabela 4.17. Os dados experimentais podem, portanto, ser considerados adequados.

Tabela 4. 17: Parâmetros das Equações (3.9 e 3.10) para os sistemas formados por [bmim]BF₄ (1) + sal (2) + água (3) em diferentes temperaturas.

$T / ^\circ\text{C}$	<i>Othmer-Tobias (Eq. 3.9)</i>			<i>Bancroft (Eq. 3.10)</i>		
	k_1	n	R_1^2	k_2	r	R_2^2
<i>Acetato de sódio</i>						
20	0,0568	1,0916	0,9842	11,5155	0,8706	0,9892
30	0,0712	1,1094	0,9876	8,8388	0,7704	0,9925
40	0,0012	3,0952	0,9999	6,6729	0,2579	0,9995
<i>Citrato de sódio</i>						
20	0,0005	3,1173	0,9987	9,6914	0,3347	0,9988
30	0,0004	3,0686	0,9801	10,3820	0,2658	0,9696
40	0,0066	2,1418	0,9931	8,3765	0,3596	0,9957
<i>Tartarato de sódio</i>						
20	0,0379	1,3912	0,9963	8,9863	0,7060	0,9951
30	0,0310	1,4317	0,9509	9,1069	0,5101	0,9581
40	0,0021	2,5914	0,9760	8,2506	0,3447	0,9919

Fonte: Do autor.

4.2.6– INFLUÊNCIA DOS ÂNIONS DOS SAIS NAS CURVAS BINODAIS

A habilidade dos sais em formar fases pode ser associada à energia de Gibbs de hidratação dos íons (ΔG_{hyd}), conforme pode ser verificado, por exemplo, nos trabalhos de Marcus (1991) e Zafarani-Moattar *et al.* (2004). Sendo assim, a capacidade “*salting-out*” a 30°C de cinco sais foi verificada através da avaliação conjunta de alguns diagramas de fases, obtidos experimentalmente neste trabalho, com os valores de (ΔG_{hyd}) dos íons destes sais, os quais foram listados na Tabela 4.18.

Tabela 4. 18: Energia de Gibbs de hidratação dos íons (ΔG_{hyd}) de alguns sais deste trabalho

Íons	(ΔG_{hyd}) kJ.mol ⁻¹	Referência
Tartarato (C ₄ H ₄ O ₆ ⁻²)	-1010	Nemati-Kande e Shekaari (2013)
Tiosulfato (S ₂ O ₃ ⁻²)	-1160	
Citrato (C ₆ H ₅ O ₇ ⁻³)	-2793	Silvério <i>et al.</i> (2013)
Fosfato (HPO ₄ ⁻²)	-1125	
Potássio (K ⁺)	-295	Marcus (1991)
Sódio (Na ⁺)	-365	
Formiato (CHO ⁻²)	-395	Zafarani-Moattar e Hamzehzadeh (2005)

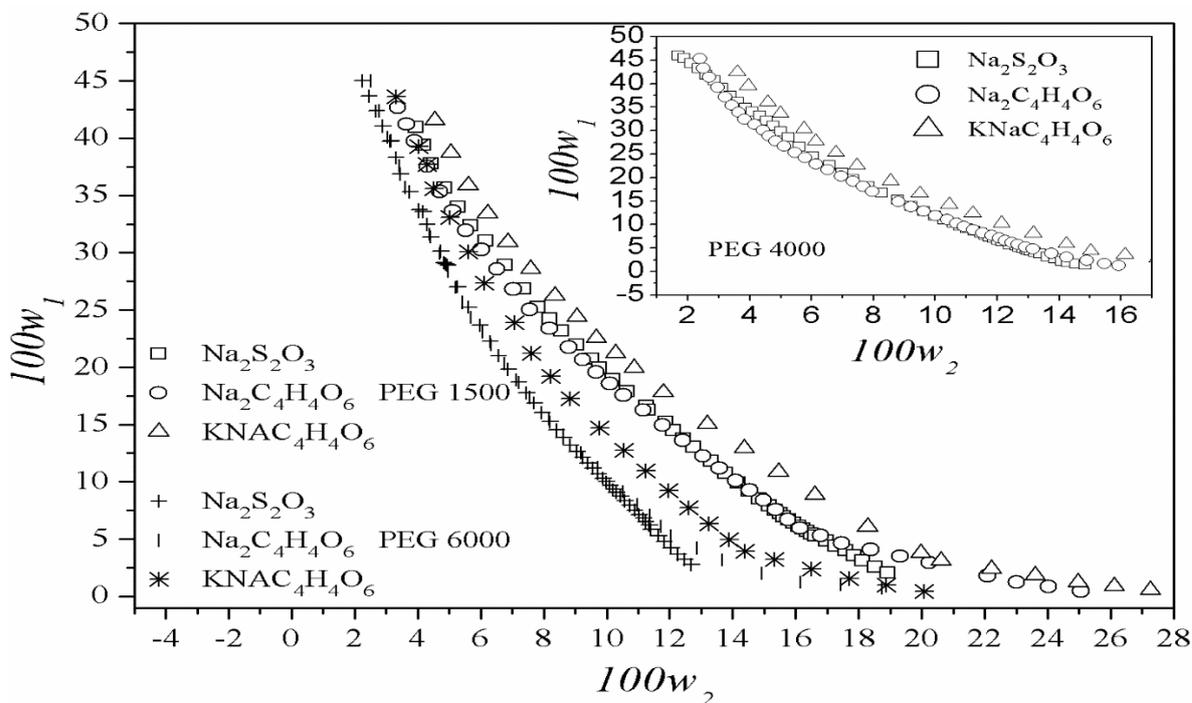
Fonte: Do autor.

Segundo análise do trabalho de Nemati-Kande e Shekaari (2013), valores mais negativos de (ΔG_{hyd}) de cátions ou ânions de sais resultam em maiores *salting-out* dos íons.

Na Figura 4.22, foram comparadas as binodais dos sais que possuem em comum o cátion Na^+ em sua estrutura química. Neste caso, a habilidade “*salting-out*”, levando em consideração os valores de (ΔG_{hyd}) em parênteses, segue a seguinte ordem: $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ ($-1160 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) > $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{-2}$ ($-1010 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). No entanto, não se percebe grande diferença de posição das curvas binodais experimentais dos sais tartarato de sódio e tiosulfato de sódio, pois elas se sobrepõem ou são muito próximas. Isto está de acordo com a pequena diferença nos valores de (ΔG_{hyd}) relacionados a elas. Em relação à curva binodal do tartarato de sódio e potássio pode-se fazer a seguinte análise: como o (ΔG_{hyd}) do cátion Na^+ é mais negativo que o do K^+ , espera-se que o *salting-out* do tartarato de sódio seja maior que o do tartarato de sódio e potássio e isto está de acordo com o que é observado na Figura 4.22.

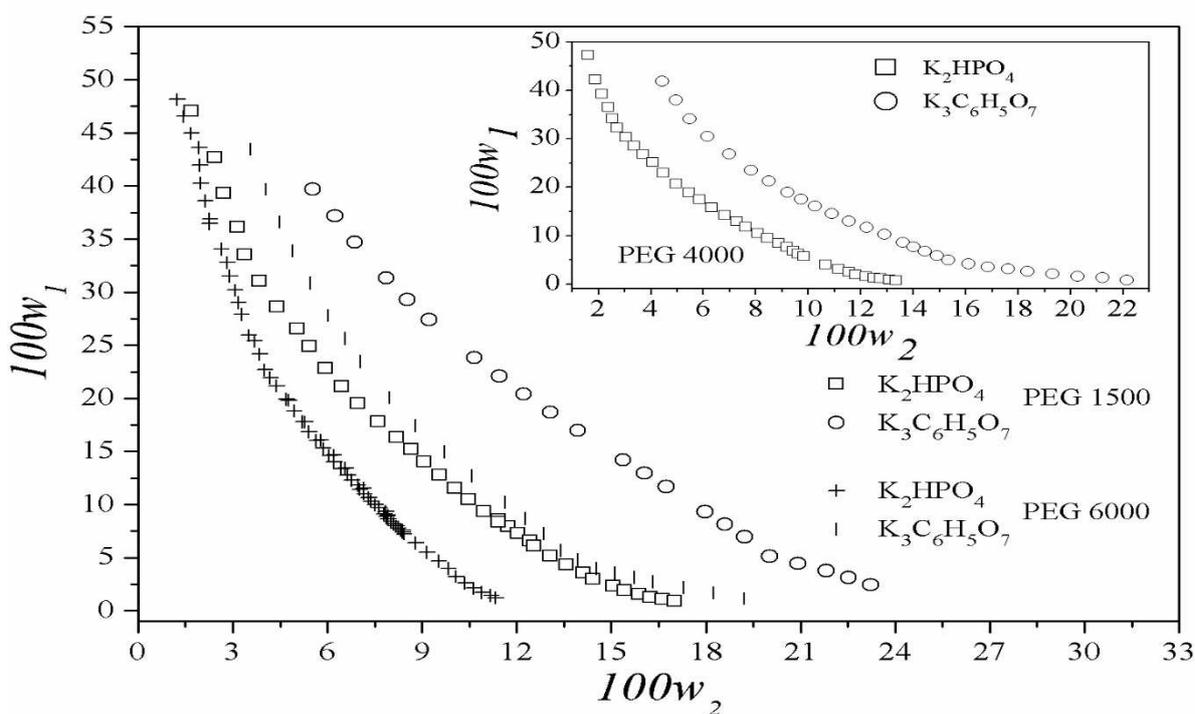
Uma outra análise foi realizada, na Figura 4.23, considerando os sais que possuem o cátion K^+ em comum, tendo verificado a seguinte sequência de “*salting-out*” nos diagramas de fases: HPO_4^{-2} ($-1125 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) > $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{-3}$ ($-2793 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), a qual não está coerente com a os valores de (ΔG_{hyd}) dos ânions. Silvério et al. (2013) também encontraram os mesmos resultados em seus experimentos para estes dois ânions. Seria esperado que íons de maior valência apresentassem maior *salting-out* (ANANTHAPADMANALBA E GODDARD, 1987), porém, já é conhecido (LIADOSA *et al.*, 2012; MIRSIAGHI *et al.*, 2010) que os íons citrato não seguem à regra que relaciona (ΔG_{hyd}) com o tamanho da região bifásica em SABs do tipo PEG/sal.

Figura 4. 22: Influência dos ânions dos sais nas curvas binodais formadas por PEG (1) + tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), tartarato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ou tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) (2) + água (3) a 30°C



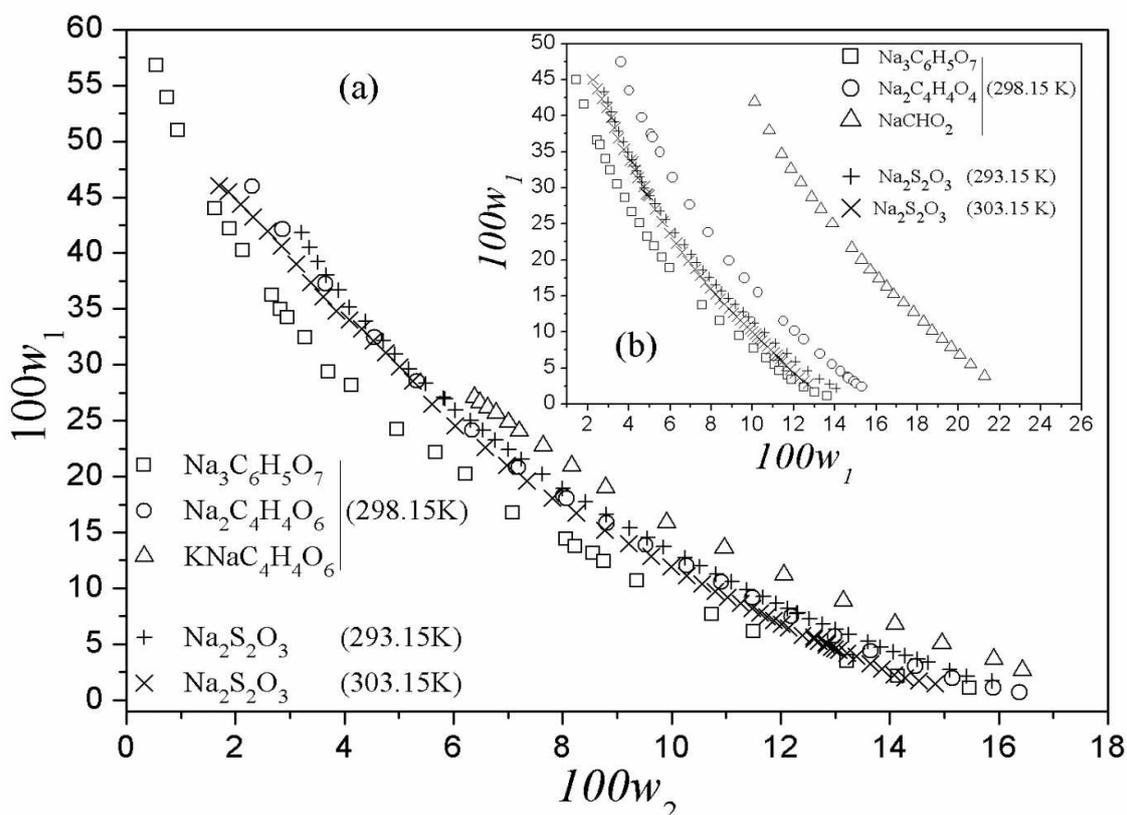
Fonte: Do autor.

Figura 4. 23: Influência dos ânions dos sais nas curvas binodais formadas por PEG (1) + fosfato dipotássico (K_2HPO_4) ou citrato de potássio ($\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (2) + água (3) a 30°C .



Fonte: Do autor.

Figura 4. 24: Influência dos ânions dos sais nas curvas binodais formadas por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C: tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$); tartarato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$), tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), formiato de sódio (NaCHO_2) ou succinato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$)



Fonte: Do autor.

Na Figura 4.24, comparou-se a capacidade *salting-out* do ânion do tiosulfato de sódio, estudada nos SABs deste trabalho, com outros ânions de sais de sódio analisando os diagramas de fases junto com os valores de (ΔG_{hyd}) . Assim, SABs envolvendo PEG 4000 (ou PEG 6000) e esses sais a 25°C foram encontrados na literatura (ZAFARANI-MOATTAR *et al.*, 2004; WYSOCZANSKA E MACEDO, 2016; ZAFARANI-MOATTAR E HAMZEZHADI, 2005; ZAFARANI-MOATTAR *et al.*, 2008; ZAFARANI-MOATTAR E TOLUEI, 2008) e comparados com os sistemas obtidos neste trabalho em 20 e 30°C, embora nossos dados estejam em temperaturas diferentes. A Figura 4.24 mostra claramente que, para sais que compartilham um cátion comum, mas contêm ânions diferentes, a capacidade *salting-out* dos ânions segue a sequência (entre parênteses valores de (ΔG_{hyd}) dos íons): $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{-3}$ (-2793 kJ.mol⁻¹) > $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ (-1160 kJ.mol⁻¹) > $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{-2}$ (-1010 kJ.mol⁻¹) > CHO_2^{-2} (-395 kJ.mol⁻¹). Em adição, considerando a avaliação feita para os SABs com sais tartarato de sódio e

potássio e tartarato de sódio na Figura 4.22, a sequência final para a capacidade *salting-out* do ânion nas Figuras 24 (a) e 24 (b) é: $C_6H_5O_7^{-3}$ (citrato) > $S_2O_3^{-2}$ (tiosulfato) > $C_4H_4O_6^{-2}$ (tartarato) > $KC_4H_4O_6^{-2}$ (Ktartarato) > $C_4H_4O_4^{-2}$ (succinato) > CHO^{-2} (formato). Desta forma, o melhor efeito *salting-out* nas Figuras 24 (a) e 24 (b) é observado para SABs com citrato de sódio, que apresentou um valor mais negativo de (ΔG_{hyd}) . Esses resultados estão de acordo com Li et al. (2012), que mostraram que o efeito *salting-out* dos íons citrato, tartarato e succinato segue a ordem: $C_6H_5O_7^{-3}$ > $C_4H_4O_6^{-2}$ > $C_4H_4O_4^{-2}$. É possível concluir que a posição das curvas binodais deste trabalho nas Figuras 4.24 (a) e 4.24 (b), quando comparadas com outras da literatura, está de acordo com os valores de (ΔG_{hyd}) encontrados.

4.3 - MODELAGEM TERMODINÂMICA

Os parâmetros ajustados do modelo NRTL e os desvios médios quadráticos (Eq.3.15) obtidos, referentes à modelagem dos sistemas formados por PEG + sal + água, estão apresentados na Tabela 4.19. Os parâmetros de interação dos modelos termodinâmicos foram estimados utilizando o programa TML_LLE 2.0 (STRAGEVITCH e D'AVILA, 1997), implementado em linguagem Fortran. O procedimento é baseado no método Simplex Modificado, proposto por NELDER e MEAD (1965).

O comportamento das linhas de amarração calculadas, podem ser vistos nas Figuras F1 a F7 do Apêndice F para cada um dos sistemas da Tabela 4.19. A faixa de desvio do NRTL foi de 0,456 % a 1,133 % para todos os sistemas, exceto para o SAB formado por PEG 1500/ tiosulfato de sódio. Portanto, é possível concluir que este modelo é adequado para a modelagem dos dados experimentais.

Tabela 4. 19: Parâmetros de interação binária regredidos para o modelo NRTL e desvios médios quadráticos (Eq. 3.15) obtidos para as interações entre os componentes dos SABs formados por PEG (1) + sal (2) + água (3): sistemas a 30°C e com variação de temperatura

<i>i/j</i>	<i>*A_{ij}/ K</i>	<i>*A_{ji}/ K</i>	<i>*B_{ij}</i>	<i>*B_{ji}</i>	<i>*a_{ij}</i>	<i>*rmsd (%)</i>
<i>Tiosulfato de sódio</i>						
PEG 1500–sal	-688,4	4699,7	130380,0	-33450,0	0,200	1,781
PEG 1500–água	-3588,9	6709,0	68071,0	0,3	0,470	
sal–água	-117,0	784,6	66574,0	128270,0	0,200	
PEG 4000– sal	-6730,9	5360,4	-34810,0	24468,0	0,470	0,932
PEG 4000–água	-3275,4	5617,0	-17979,0	-0,7	0,234	
sal–água	-144,7	504,9	-31935,0	27961,0	0,470	
PEG 6000– sal	2761,2	7140,6	-237000,0	-0,5	0,200	0,965
PEG 6000–água	-2866,3	5243,2	-16870,0	-0,3	0,308	
sal–água	-274,6	-785,9	-31318,0	-16466,0	0,451	
<i>Citrato de potássio</i>						
PEG 1500–sal	1385,1	880,5	-	-	0,270	0,812
PEG 1500–água	21024,0	3716,8	-	-	0,450	
sal–água	-686,6	692,0	-	-	0,423	
PEG 4000– sal	425,1	866,7	-	-	0,309	0,527
PEG 4000–água	-96702,0	8759,9	-	-	0,226	
sal–água	-818,7	9839,5	-	-	0,217	
PEG 6000– sal	311,0	922,3	-	-	0,201	1,070
PEG 6000–água	35059,0	8364,2	-	-	0,242	
sal–água	-859,7	8178,7	-	-	0,204	
<i>Fosfato dipotássico</i>						
PEG 1500–sal	913,5	2116,0	-	-	0,340	0,617
PEG 1500–água	181,1	7565,8	-	-	0,320	
sal–água	-854,7	14985,0	-	-	0,200	
PEG 4000– sal	206,6	2126,3	-	-	0,200	0,672
PEG 4000–água	186,1	1252,6	-	-	0,392	
sal–água	14996,0	5359,2	-	-	0,235	
PEG 6000– sal	274,4	2325,6	-	-	0,205	0,613
PEG 6000–água	220,3	1058,3	-	-	0,470	
sal–água	15000,0	7332,1	-	-	0,203	
<i>Tartarato de sódio</i>						
PEG 1500–sal	1888,0	990,1	-	-	0,291	0,456
PEG 1500–água	642,5	7377,6	-	-	0,210	
sal–água	11837,0	182,7	-	-	0,470	
PEG 4000– sal	1844,3	825,1	-	-	0,275	0,918
PEG 4000–água	862,6	8111,5	-	-	0,200	
sal–água	14868,0	122,6	-	-	0,462	
PEG 6000– sal	1487,7	863,0	-	-	0,292	0,668
PEG 6000–água	798,2	7917,4	-	-	0,200	
sal–água	14706,0	117,2	-	-	0,435	

Continuação da Tabela 4.19...

<i>Tartarato de sódio e potássio</i>						
PEG 1500–sal	112,2	2019,2	-	-	0,2001	0,729
PEG 1500–água	1297,3	1034,1	-	-	0,4251	
sal–água	14994,0	5956,1	-	-	0,2170	
PEG 4000– sal	185,8	842,5	-	-	0,2660	1,128
PEG 4000–água	929,5	9398,0	-	-	0,2000	
sal–água	12604,0	11518,0	-	-	0,4614	
PEG 6000– sal	179,6	633,0	-	-	0,2645	1,133
PEG 6000–água	1093,9	8407,6	-	-	0,2000	
sal–água	13840,0	10944,0	-	-	0,4619	

Fonte: Do autor;

* $rmsd$ (Eq. 3.15), A_{ij} e B_{ij} são parâmetros de energia com interações i-j, e α_{ij} está relacionado à não-aleatoriedade da mistura

4.4- RESUMO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO ELL

Os SABs obtidos foram de dois tipos: PEG (1500, 4000 ou 6000)/ sal (inorgânico ou orgânico) e Líquido iônico (LI) ([bmim]BF₄)/ sal (orgânico). Os sais utilizados foram: acetato de sódio, citrato de sódio, citrato de potássio, tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, tiossulfato de sódio e fosfato dipotássico. Os resultados obtidos e as análises realizadas estão resumidos nos seguintes itens:

- ✓ A influência da massa molar do PEG nas curvas binodais de todos os sistemas foi estudada e o resultado obtido neste trabalho está de acordo com o esperado para os sistemas trabalhados, ou seja, quanto maior a massa molar do PEG, maior é a tendência das curvas binodais em se aproximarem de regiões de menores concentrações de PEG e sal. Este efeito ficou mais evidente, na maioria dos SABs, em regiões de baixas concentrações de PEG. Nas regiões com maiores concentrações do polímero, as curvas para os PEGs 4000 e 6000 se sobrepõem para todos os sistemas, exceto para o sistema com PEG/ citrato de potássio;
- ✓ Estudou-se o efeito do pH nos sistemas formados por PEG/tampão citrato e PEG/tampão fosfato e foi avaliado que tanto o aumento do pH, quanto da massa molar do PEG, é favorável para a formação da região de duas fases (efeito *salting-out*). Nesses sistemas também foi estudado o comportamento da inclinação das linhas de amarração em relação à variação do pH e da massa molar do PEG. Em ambos os casos, pequenos efeitos foram observados em sua maioria;
- ✓ A influência da temperatura nas curvas binodais foi estudada para o sistema dos tipos PEG/tiossulfato de sódio e [bmim]BF₄/sais orgânicos e os resultados foram

conforme o esperado para cada tipo de SAB. Para o primeiro sistema foi encontrado que um acréscimo na temperatura, favorece a formação da região bifásica. O efeito contrário é válido para o segundo sistema. Porém, através de trabalhos publicados na literatura foi verificado que este último sistema hidrolisa na presença de água, o que invalida seu uso com um SAB;

- ✓ A capacidade de *salting-out* a 30°C das curvas binodais do tipo PEG/sal foi verificada através da avaliação conjunta dos diagramas de fases experimentais com os valores de energia de Gibbs de hidratação (ΔG_{hyd}) disponíveis na literatura para os íons destes sais. Foram comparadas as curvas binodais dos sais que possuem em comum o cátion Na^+ em sua estrutura química e foi observado que o efeito *salting-out* dos SABs com tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) é menor que aqueles com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e tartarato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$). Além disso, as curvas binodais dos SABs com tiosulfato de sódio, obtidas neste trabalho, foram comparadas com curvas de solubilidade de outros sais da literatura. Ambas as análises mostraram concordância com os valores de (ΔG_{hyd}) dos íons destes sais. Considerando os sais que possuem o cátion K^+ em comum, uma outra análise foi realizada e encontrou-se a seguinte sequência de *salting-out*: HPO_4^{-2} (-1125 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) > $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7^{-3}$ (-2793 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) e este resultado não seguiu o que era esperado em relação aos valores de (ΔG_{hyd}) dos íons;
- ✓ Os dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido foram correlacionados pelo modelo NRTL para o cálculo do coeficiente de atividade, encontrando desvios globais médios na faixa de 0,456 a 1,133%, com exceção do SAB do tipo PEG1500/tiosulfato de sódio, cujo desvio obtido foi de 1,781%. Além disso, a qualidade dos dados de ELL foi medida pelos testes de Othmer-Tobias e Bancroft, obtendo coeficientes de determinação ($R^2 \cong 1$).

4.5- PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS

Nesta seção, estão apresentados os resultados das partições das proteínas albumina de soro bovino (BSA) e lisozima (LS) nos sistemas formados por PEG (1500, 4000 ou 6000) + tartarato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$), tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), tampão fosfato de potássio, pH 7,0 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) ou citrato de potássio ($\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) + água a 30°C. Ressalta-se que nos sistemas com sais citrato de potássio, o estudo de particionamento foi realizado apenas com a LS, pois observou-se que as fases dos SABs deste tipo não estavam límpidas após a partição.

4.5.1- RESULTADOS OBTIDOS

Nas Tabelas 4.20 (partições da BSA) e 4.21 (partições da LS) são mostrados os valores dos coeficientes de partição (K_P , Eq. 3.11), eficiência de extração ($\% \varepsilon$, Eq. 3.12 ou Eq. 3.13), comprimento da linha de amarração (CLA, Eq. 3.7) e as frações mássicas ($100w_4$) das duas proteínas particionadas nos SABs. As frações mássicas de alimentação dos sistemas ternários utilizados na partição destas biomoléculas são as mesmas dos experimentos de ELL discutidos no item 4.2. Cada SAB é identificado pelos números (1-4) das linhas de amarração (LAs).

É possível observar em ambas as tabelas que algumas linhas de amarração não têm resultados de partição, pois na maioria dos casos foi observado precipitado na interface. Os valores de K_P foram obtidos apenas para os SABs com menos precipitado na região intermediária das fases em ELL. Santhi e colaboradores (2020) verificaram que em valores de CLA maiores, algumas proteínas precipitavam na interface e isso pode ser atribuído ao efeito *salting-out* que ocorre com o aumento da concentração de sal na fase rica nesse componente.

Ressalta-se que nos sistemas formados por PEG 1500 e tartarato de sódio (Tabela 4.20), foi usado uma concentração de BSA menor (0,5g/L) que nos sistemas com PEG 4000 e 6000 com este mesmo sal, devido à presença de precipitação de proteína na interface desses sistemas quando se usou a concentração de 1 g/L.

Pode-se observar na Tabelas 4.20, que a BSA foi particionada para a fase inferior em todos os casos, conforme pode ser comprovado pelos valores dos coeficientes de partição menores que 1, mostrando uma migração preferencial para a fase rica em sal.

Vários autores (BOÁGLIO *et al.*, 2006; PERUMALSAMY e MURUGESAN, 2007; PERUMALSAMY e BATCHA, 2011), ao estudarem a partição da BSA em SABs do

tipo PEG/sal, encontraram resultados iguais ao deste trabalho com relação à preferência de fase da BSA pela fase inferior. Boaglio *et al.* (2006) concluíram que a transferência de proteína para a fase rica em sal pode ser devido à diminuição do volume livre disponível na fase superior. Já, Perumalsamy e Murugesan (2007) ao investigarem o efeito dos componentes formadores de fase, pH e adições de sal neutro (NaCl) na partição da BSA em SABs do tipo PEG 2000/ citrato de sódio, confirmaram que a partição de BSA depende da hidrofobicidade relativa dos compostos, bem como de sua carga. Perumalsamy e Batcha (2011) verificaram que com o aumento da concentração de sal, a afinidade da BSA pela fase inferior diminui e isso refere-se ao efeito *salting-out* que leva à precipitação da biomolécula devido à diminuição da disponibilidade de água para sua solubilização em solução salinas mais concentradas.

Porém, também existem trabalhos com resultados contrários em relação à partição da BSA, dependendo dos componentes do sistema. Yan-Min *et al.* (2010) estudaram o efeito do pH, da massa molar do PEG e concentração de BSA em sistemas formados por PEG (1000, 2000, 4000 e 6000) /citrato de potássio. Esses autores observaram que a BSA foi particionada para a fase superior em alguns sistemas e em outros preferiu a fase rica em sal. Este resultado mostra que uma mesma proteína, dependendo do sistema, pode ter preferência tanto pela fase superior quanto pela inferior. Capézio *et al.* (2005) também verificaram que a BSA teve preferência pela fase superior em SABs formados por PEG (1000, 1500 ou 3350) e tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄/KOH).

Tabela 4. 20: Coeficientes de partição (K_P , Eq. 3.11) e eficiência de extração ($\% \varepsilon$, Eq. 3.12) da albumina de soro bovino (BSA) em sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.

LA	PEG 1500				PEG 4000				PEG 6000			
	CLA	K_P	Desvio ^a	$\% \varepsilon$	CLA	K_P	Desvio ^a	$\% \varepsilon$	CLA	K_P	Desvio ^a	$\% \varepsilon$
Tartarato de sódio e potássio, pH \approx 7,5; (100w ₄ = 0,05) ^b												
1	33,71	0,170	0,008	82,22	26,78	0,064	0,005	92,45	23,52	0,067	0,004	90,93
2	40,07	0,259	0,007	74,38	37,03	0,097	0,006	87,47	32,68	0,086	0,003	88,09
3	44,5	0,298	0,005	71,24	43,41	0,145	0,005	81,37	37,63	0,136	0,005	81,83
4	48,69	0,335	0,009	68,98	47,95	0,155	0,007	80,45	40,72	0,147	0,004	80,02
Tartarato de sódio, pH \approx 7,0; (100 w ₄ =0,06 para PEG 4000 e 6000 e 100 w ₄ = 0,03 para PEG 1500) ^b												
1	40,35	0,507	0,005	59,41	27,14	0,107	0,003	89,54	29,45	0,157	0,006	84,87
2	46,04	0,531	0,004	57,57	35,12	0,141	0,006	86,47	35,88	0,198	0,007	79,75
3	53,4	0,566	0,004	56,22	42,68	0,152	0,004	84,32	42,81	0,186	0,005	78,59
4					47,51	0,199	0,003	79,68	47,78	0,273	0,008	72,65
Tampão fosfato de potássio, pH 7,0 (100w ₄ = 0,02) ^b												
1	30,42	0,316	0,005	67,07	23,53	0,204	0,015	75,41				
2	37,00	0,341	0,018	64,27	31,38	0,227	0,031	73,14	32,08	0,210	0,005	72,55
3	42,98	0,385	0,008	60,25	36,99	0,237	0,022	70,34	37,14	0,223	0,018	70,62
4	46,83	0,444	0,018	57,42	40,65	0,238	0,029	70,66	42,11	0,271	0,004	65,39
Tiosulfato de sódio, pH \approx 6,15; (100 w ₄ = 0,06) ^b												
1	30,82	0,402	0,005	60,11	33,61	0,288	0,008	66,26	35,91	0,295	0,004	63,18
2	38,88	0,286	0,007	67,17	39,06	0,234	0,004	69,91	40,28	0,233	0,011	68,81
3	43,91	0,252	0,010	69,68	43,29	0,208	0,006	71,81	44,67	0,209	0,007	70,54
4	49,07	0,241	0,005	69,54	46,77	0,194	0,005	73,46	47,89	0,223	0,006	71,65

Fonte: Do autor; ^a desvio padrão = $\sqrt{\frac{\sum(X-\bar{X})}{n-1}}$, em que n e \bar{X} são, respectivamente o tamanho e a média da amostra; ^b fração mássica da proteína.

Tabela 4. 21: Coeficientes de partição (K_P , Eq.3.11) e eficiência de extração ($\% \varepsilon$, Eq.3.12 ou 3.13) da lisozima (LS) em sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C

LA	PEG 1500				PEG 4000				PEG 6000			
	CLA	K_P	Desvio ^a	$\% \varepsilon$	CLA	K_P	Desvio ^a	$\% \varepsilon$	CLA	K_P	Desvio ^a	$\% \varepsilon$
Tartarato de sódio e potássio, pH \approx 7,5; ($100w_4 = 0,045$) ^b												
1	33,71	4,888	0,232	86,38	26,78	1,687	0,054	68,61	23,52	1,324	0,021	66,41
2	40,07	7,165	0,173	90,62	37,03	2,835	0,052	81,02	32,68	1,219	0,012	65,75
3					43,41	2,971	0,038	82,38	37,63	1,372	0,018	69,45
4	48,69	8,65	0,056	92,2					40,72	1,554	0,026	72,56
Tartarato de sódio, pH \approx 7,0; ($100w_4 = 0,045$) ^b												
1	40,35	9,745	0,338	93,63	27,14	1,309	0,058	65,66	29,45	0,932	0,073	60,21
2	46,04	18,751	0,762	96,49	35,12	1,586	0,081	71,52	35,88	0,792	0,065	56,10
3	53,40	22,785	0,542	96,72	42,68	1,602	0,076	72,98	42,81	1,212	0,045	67,21
4					47,51	3,430	0,065	85,02	47,78	1,95	0,078	76,84
Fosfato de potássio, pH 7,0 ($100w_4 = 0,02$) ^b												
1	30,42	0,856	0,023	57,11	23,53	0,387	0,008	61,79	27,77	0,252	0,007	69,02
2	37,00	0,946	0,021	60,77	31,38	0,251	0,004	71,06	32,08	0,188	0,003	74,69
3	42,98	1,161	0,041	66,53	36,99	0,235	0,016	70,49	37,14	0,153	0,003	77,84
4	46,83	1,657	0,037	73,45	40,65	0,205	0,002	73,67	42,11	0,158	0,016	76,62
Citrato de potássio, pH \approx 8,3; ($100w_4 = 0,045$) ^b												
1	31,18	12,951	0,432	94,43	35,11	2,913	0,151	81,50	27,14	1,162	0,192	61,04
2	39,34	15,232	0,623	95,39	38,39	3,693	0,121	84,86	33,88	1,261	0,233	63,73
3	45,76	25,551	0,551	97,3	41,62	4,981	0,094	88,49	41,09	2,274	0,123	77,54
4									46,89	4,011	0,165	86,55

Continuação da Tabela 4.21...

Tiosulfato de sódio, pH \approx 6,15; (100w ₄ = 0,045) ^b												
1	30,82	0,599	0,009	50,26	33,61	0,444	0,005	56,03	35,91	0,374	0,007	57,51
2	38,88	0,493	0,007	54,28	39,06	0,334	0,008	61,86	40,28	0,266	0,009	65,89
3	43,91	0,453	0,011	56,09	43,29	0,273	0,007	66,02	44,67	0,225	0,005	68,99
4	49,07	0,457	0,007	54,64	46,77	0,287	0,012	65,19	47,89	0,206	0,004	73,21

Fonte: Do autor.

^a desvio padrão = $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$, em que n e \bar{X} são, respectivamente o tamanho e a média da amostra; ^b fração mássica da proteína.

As partições da lisozima (Tabela 4.21), mostram que a maior parte dos SABs com esta proteína, apresentou valores de K_p maiores que 1, indicando a preferência desta enzima pela região rica em PEG. Picó *et al.* (2007) estudaram as interações proteína-polímero e concluíram que a lisozima tem alta afinidade pelo PEG, sendo que essa alta interação diminui com o aumento da massa molar do polímero. Porém, na maioria dos SABs formados com o tampão fosfato de potássio e nos sistemas com tiosulfato de sódio, o mesmo não aconteceu. A lisozima, nestes sistemas, teve preferência pela fase inferior. A literatura (HAGHTALAB *et al.*, 2003; PEREZ *et al.*, 2013; PENG *et al.*, 1995; SU e CHIANG, 2006; FARRUGIA *et al.*, 2004) aponta que a lisozima, na maior parte dos SABs estudados, tem preferência pela fase superior, rica em PEG, mas isso também não é uma regra. Nos trabalhos de Perez *et al.* (2013) e Haghtalab *et al.* (2003) algumas das partições das lisozimas em SABs do tipo PEG/sal foram para a fase inferior.

Hatalab *et al.* (2003) estudaram a partição da lisozima em SABs com PEG 4000 e tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) em pH 7,1 a 25°C, e também chegaram à conclusão que neste tipo de sistema, os valores de K_p foram inferiores a 1, corroborando com os dados obtidos nesta tese para os mesmos componentes de fase e pH, ainda que exista uma diferença de 5°C entre as temperaturas estudadas. De acordo com Sindhu e colaboradores (2013), a fase com sais fosfatos são mais hidrofóbicas que a fase polimérica. Sendo assim, moléculas de água são expelidas para a fase superior, fazendo com que aumente a partição da biomolécula na fase inferior.

SU e CHIANG (2006) em seus estudos sobre partição da lisozima nos sistemas compostos por PEG, sulfato de sódio e água, sugeriram que a partição da lisozima para a fase superior foi influenciada pela hidrofobicidade. Além disso, mencionaram que em sistemas PEG/sal, o comportamento da partição protéica também pode ser impulsionado pelas forças que provocam o efeito *salting-out*.

A lisozima é mais hidrofóbica que a BSA (SU e CHIANG, 2006). Portanto, de acordo com as análises de resultados de partições da literatura dessas duas proteínas (item 2.5), é provável que nos SABs com sais tartaratos e citrato de potássio, o controle das partições da lisozima esteja relacionado com a hidrofobicidade das fases. Já nos casos dos sistemas com PEG/tiosulfato de sódio e PEG/tampão fosfato de potássio, a característica hidrofóbica dos sais foi mais forte que a do PEG, atraindo a lisozima para a fase rica em sal. A BSA, naturalmente hidrofílica, pode ter sido atraída pela fase rica em sal devido à menor hidrofobicidade da fase rica em sal, conforme avaliou Sindhu *et al.* (2013) em seus estudos de partição da BSA em SABs do tipo PEG/ sal (carbonato de sódio ou sulfato de sódio).

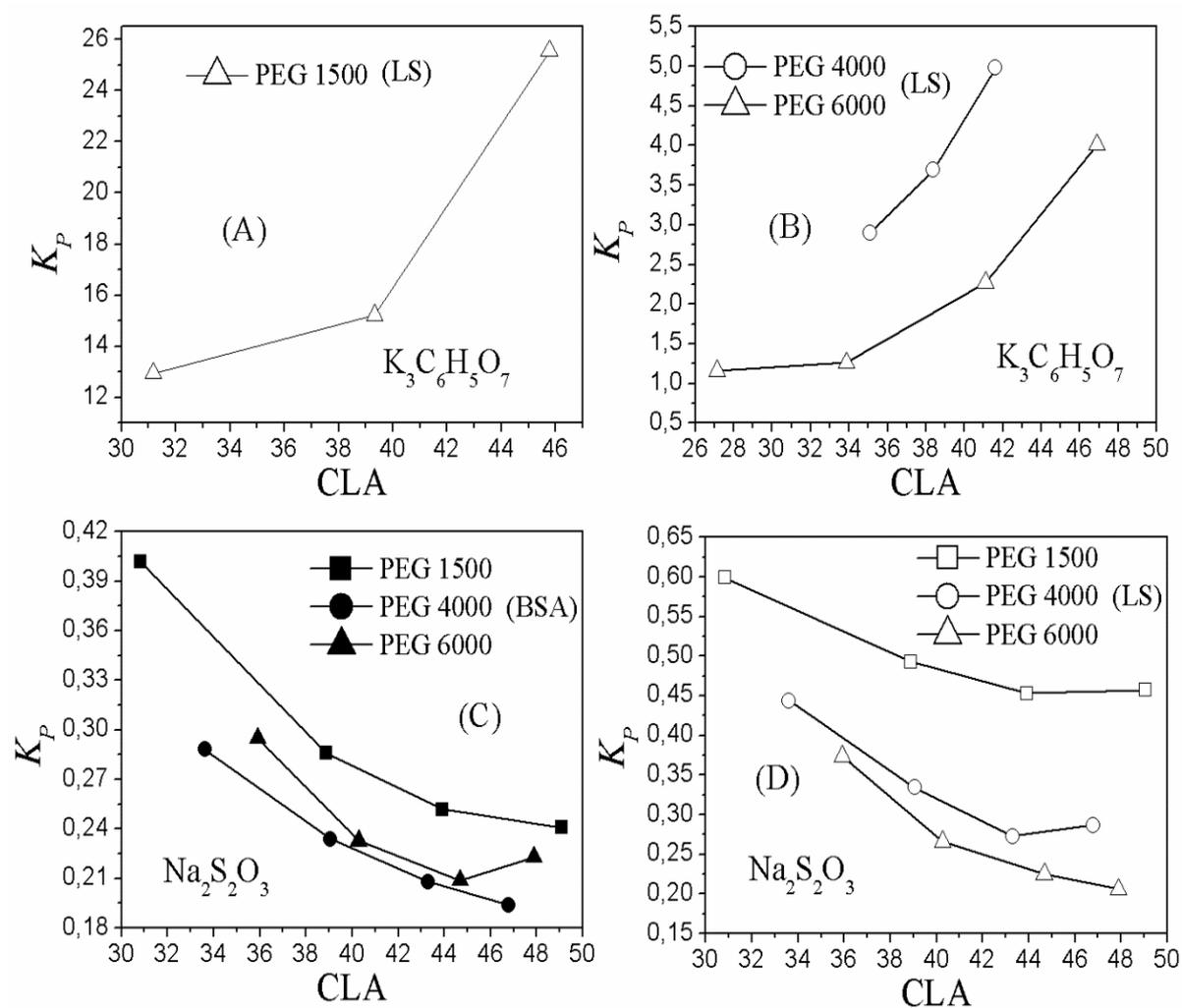
Embora vários estudos teóricos e experimentais forneçam algum suporte para os principais fatores da partição de biomoléculas, eles ainda são muito complexos e pouco compreendidos. Enquanto alguns autores sugerem que a hidrofobicidade controla a partição de biomoléculas, outros sugerem que as interações eletrostáticas desempenham o papel principal (PEREIRA E COUTINHO, 2020). Portanto, os resultados experimentais são a única base para se avaliar o comportamento de partição de determinado soluto em um tipo de sistema específico, não sendo possível se basear em dados experimentais da literatura. Cada sistema estudado apresenta uma análise diferente e não existe comportamento sistemático sobre esse assunto.

A distribuição desigual de proteínas entre as duas fases aquosas é resultante de um delicado balanço de interações entre a proteína e as outras espécies presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (LUECHAU *et al.*, 2010; PEREIRA E COUTINHO, 2020). Portanto, o valor do coeficiente de partição obtido em um SAB pode fornecer informações sobre as interações que determinam sua distribuição entre as fases em equilíbrio (FERREIRA *et al.*, 2020). Diversas propriedades físico-químicas do sistema e da biomolécula determinam o valor de K_p , por exemplo, algumas propriedades das fases como a natureza química dos componentes, massa molar, pH, temperatura, concentrações de sal e do polímero, comprimento das linhas de amarração, entre outras (DA SILVA e LOH, 2006; PEREIRA E COUTINHO, 2020). Os resultados apresentados nessa tese e os dados experimentais da literatura corroboram com essa afirmação.

4.5.2 – INFLUÊNCIA DO CLA NO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

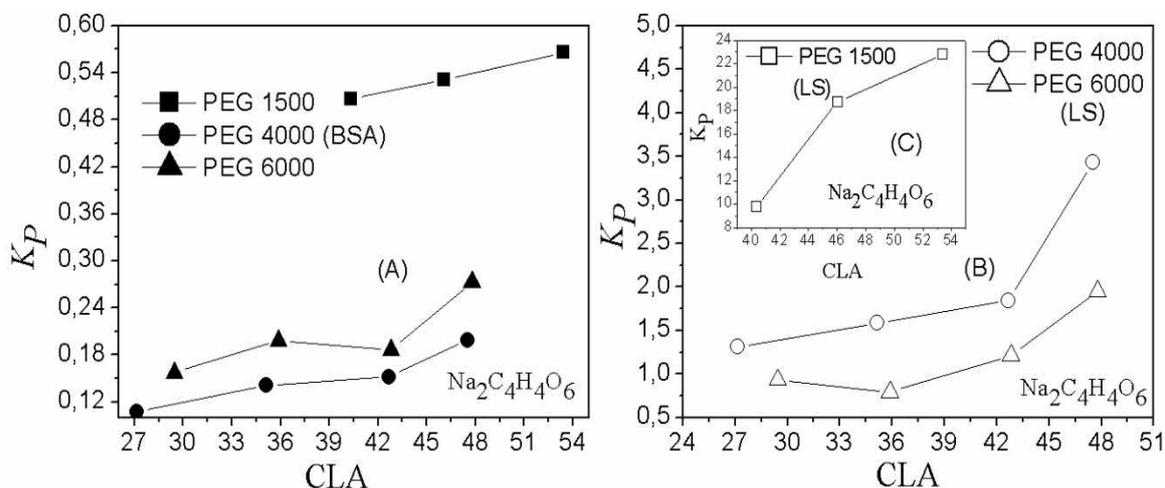
O conhecimento do comprimento da linha de amarração (CLA), o qual expressa a diferença entre as concentrações de polímeros e sal presentes nas fases de cada SAB, é normalmente utilizado para indicar o possível comportamento da partição de biomoléculas (VIEIRA *et al.*, 2019). Tal comportamento e o efeito da massa molar do PEG nos coeficientes de partição podem ser vistos nas Figuras 4.25 a 4.28 e confirmam a discussão do item 4.4.1, ou seja, a BSA foi particionada para a fase inferior ($K_p < 1$) em todos os sistemas e a lisozima para a fase superior ($K_p > 1$) na maioria dos casos. Foi observado também que nos SABS formados por PEG 1500 e fosfato de potássio para a partição da lisozima (Figura 4.28-B), parte dos valores de K_p são menores que 1 e a outra parte maiores que 1. Este comportamento já foi encontrado em trabalhos de partição da literatura (VIEIRA *et al.*, 2019, PEREZ *et al.*, 2013).

Figura 4. 25: Influência do CLA e massa molar do PEG no coeficiente de partição (K_P) da albumina de soro bovino (BSA) ou lisozima (LS) nos sistemas do tipo PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C: (A) e (B) citrato de potássio; (C) e (D) tiosulfato de sódio.



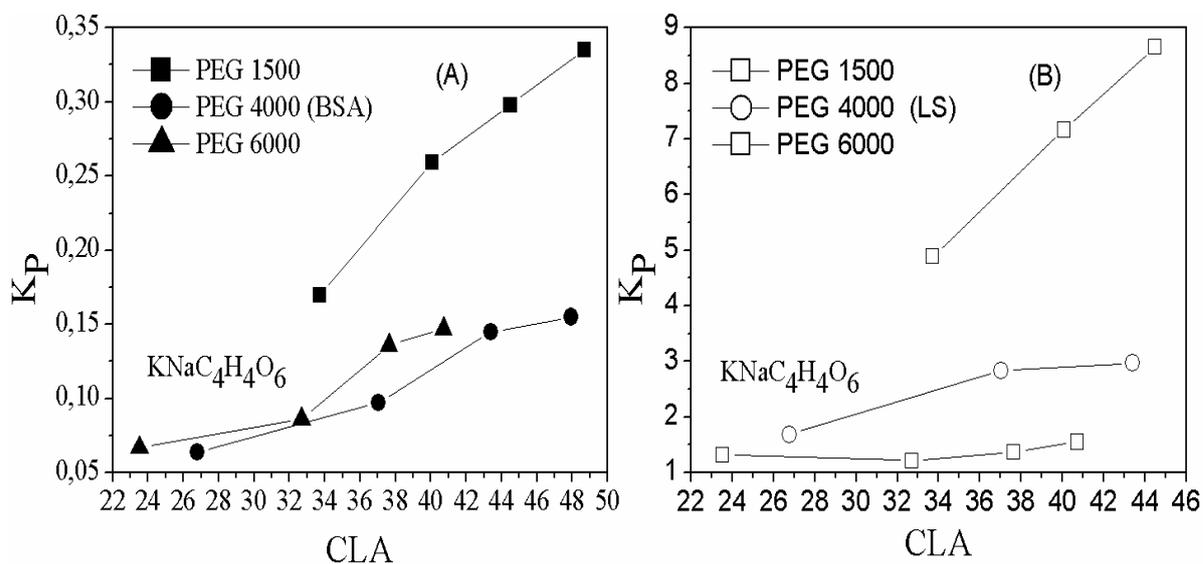
Fonte: Do autor.

Figura 4. 26: Influência do CLA e massa molar do PEG no coeficiente de partição (K_P) nos sistemas do tipo PEG (1) + tartarato de sódio (2) + água (3) a 30°C: (A) albumina de soro bovino (BSA); (B e C) lisozima (LS)



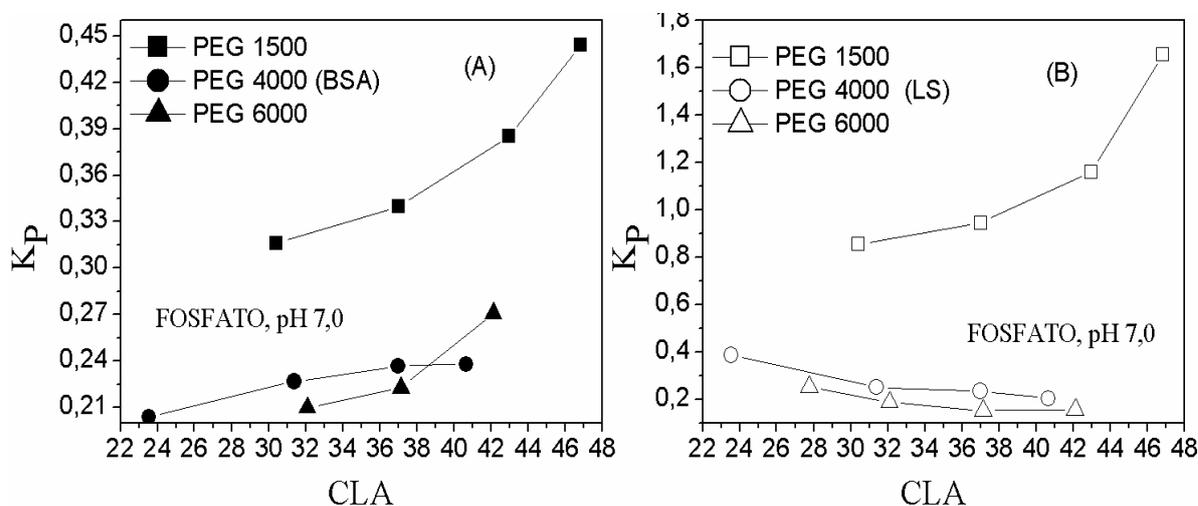
Fonte: Do autor.

Figura 4. 27: Influência do CLA no coeficiente de partição (K_P) nos sistemas do tipo PEG (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 30°C: (A) albumina de soro bovino (BSA); (B) lisozima (LS)



Fonte: Do autor.

Figura 4. 28: Influência do CLA no coeficiente de partição (K_p) nos sistemas do tipo PEG (1) + fosfato de potássio, pH 7,0 (2) + água (3) a 30°C: (A) albumina de soro bovino (BSA); (B) lisozima (LS).



Fonte: Do autor.

A Figura 4.25 mostra as análises das partições da BSA e LS realizadas nos SABs formados pelos sais citrato de potássio ($K_3C_6H_5O_7$) e tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$). Foi observado que o K_p diminui com o aumento da CLA para os sistemas com tiosulfato de sódio e o efeito contrário pôde ser detectado nos SABs com citrato de potássio. O mesmo comportamento dos SABs com citrato de potássio foi observado nos demais sistemas das Figuras 4.26 a 4.28, exceto para os sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) /tampão fosfato de potássio (pH 7,0), representados na Figura 4.28 (B), no caso específico de partição da LS. Esses dois resultados já foram observados na literatura (BABU *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2001; SOUZA, 2008, BOÁGLIO *et al.*, 2006; GAFFARI *et al.*, 2020).

De acordo com Da Silva e Loh (2006), com o aumento do CLA, a biomolécula de interesse tende a migrar preferencialmente para uma das fases, isto é, o valor do coeficiente de partição torna-se mais distante da unidade. Esse comportamento é resultado do aumento da diferença de composição entre as fases, que aumenta as contribuições entálpicas e entrópicas na transferência da biomolécula para uma das fases. Nos casos da partição da BSA nos SABs com os dois sais tartaratos e com tampão fosfato de potássio, o aumento do CLA aumentou o valor de K_p na fase inferior, ou seja, a partição foi menos eficiente em maiores valores de CLA. Isso pode ser devido à precipitação de proteínas na interface (efeito *salting-out*) que ocorre com aumento da concentração de sal, como foi observado experimentalmente nestes sistemas.

O efeito da massa molar do PEG no coeficiente de partição (K_p) da BSA e LS também pode ser avaliado através das Figuras 4.25 a 4.28. Sobre este efeito, pôde ser observado

que na maioria dos SABs estudados, quanto maior a massa molar do polímero, menor é o K_P e tal situação já foi comprovada por vários pesquisadores em estudos de separação com sistemas aquosos do tipo PEG/sal (BOÁGLIO *et al.*, 2006; CAPÉZIO *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2009). Perez *et al.* (2013), estudaram a partição de oito proteínas em diferentes SABs compostos por PEG e sal e concluíram que nem sempre o aumento da massa molar do PEG propiciou a diminuição do K_P . Neste trabalho, ao avaliar este efeito nos SABs com PEG (4000 ou 6000) / (sais tartaratos e tiossulfato de sódio), Figuras 4.26(A), 4.27(A) e 4.25 (C), o aumento da massa molar do polímero propiciou coeficientes de partição maiores.

Conforme pode ser visto nas Figuras 4.25 a 4.28, nos sistemas formados por PEG e tiossulfato de sódio, nos quais as duas proteínas foram particionadas para a fase inferior, os coeficientes de partição da lisozima são maiores que os da BSA. Isso mostra que as interações entre a BSA e os componentes da fase inferior deste tipo de SAB foram mais fortes, pois valores de K_P menores na fase inferior estão relacionados a maiores eficiências de extração.

Além disso, em alguns SABs deste trabalho foi observado que ao aumentar o CLA, não houve grandes variações no K_P . Exemplos desta situação podem ser vistos nos sistemas, relacionados à partição da BSA, formados por PEG4000/fosfato de potássio e nos SABs do tipo PEG 1500/tiossulfato de sódio referentes aos resultados de partição da lisozima. O coeficiente de partição depende da composição e propriedades da fase e, portanto, variará com comprimento da linha de amarração. No entanto, é possível ter o mesmo coeficiente de partição em linhas de amarração diferentes quando outros fatores, como a razão de volume (alterando a solubilidade) e a precipitação entram em jogo (SANTHI *et al.*, 2020). Além disso, o aumento do K_P nas últimas linhas de amarração dos SABs com PEG 6000 (Fig 4.25C) e com PEG 4000 (Fig. 4.25 D) também podem estar relacionados à precipitação de proteínas devido ao aumento do efeito *salting-out* em altas concentrações de sal (PERUMALSAMY E BATCHA, 2011).

É importante ressaltar que as proteínas foram particionadas em sistemas do mesmo tipo com CLAs de mesmo valor para que fosse possível avaliar o efeito de um mesmo SAB na separação de biomoléculas diferentes. Os resultados das partições mostraram que para um mesmo tipo de sistema, a BSA e lisozima tiveram comportamentos tanto semelhantes (SABs do tipo PEG/ tiossulfato de sódio ou PEG/tampão fosfato) quanto diferentes (demais SABs) em relação à análise do CLA e à fase de preferência da fase para partição. Perez *et al.* (2013) também estudaram a partição de biomoléculas com características diferentes em diversos SABs e comprovaram que não existe um padrão nos resultados de partição. Vieira *et al.* (2019) também mostraram que a partição de duas moléculas semelhantes (ácido salicílico e ácido acetil

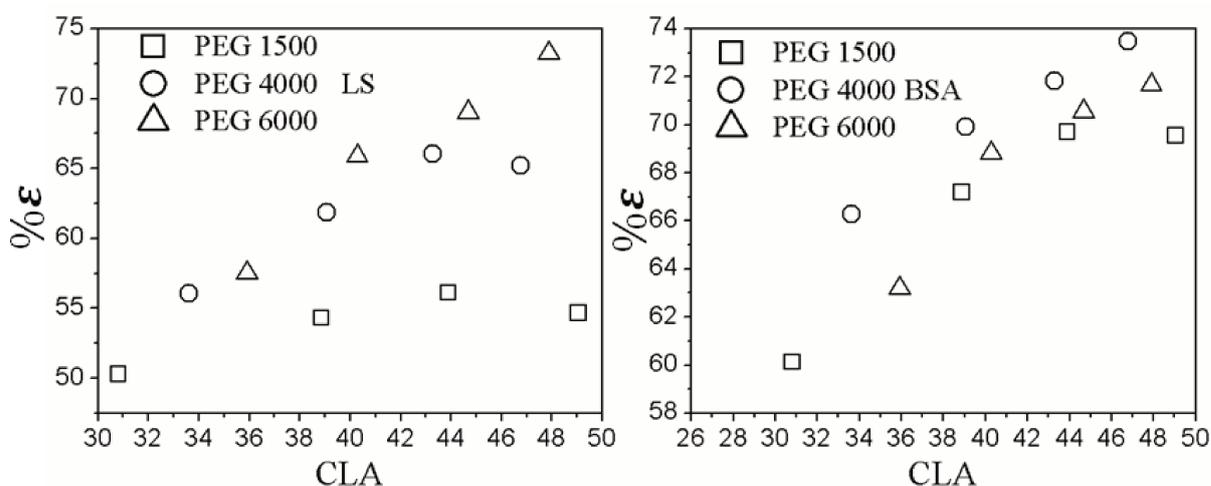
salicílico) em sistemas iguais do tipo PEG/sal, apresentaram diferenças importantes nos coeficientes de partição.

4.5.3 – INFLUÊNCIA DO CLA NA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

Nas Figuras 4.29 (partições da BSA e lisozima) e 4.30 (partições da lisozima), é possível ver que, na maioria dos SABs, quanto maior o CLA mais eficiente é o processo de particionamento. Já na Figura 4.31 (partições da BSA) foi observado o efeito contrário na maioria dos sistemas. Segundo Salabat *et al.* (2010), a diminuição dos valores de eficiências de extração ($\% \epsilon$) com o aumento do CLA pode estar relacionado ao efeito *salting-out* dos sais em soluções mais concentradas. Esses autores explicaram que com o aumento da CLA, grandes quantidades de proteínas podem se concentrar na interface das fases e isto pode estar relacionado a esta perda de eficiência de extração.

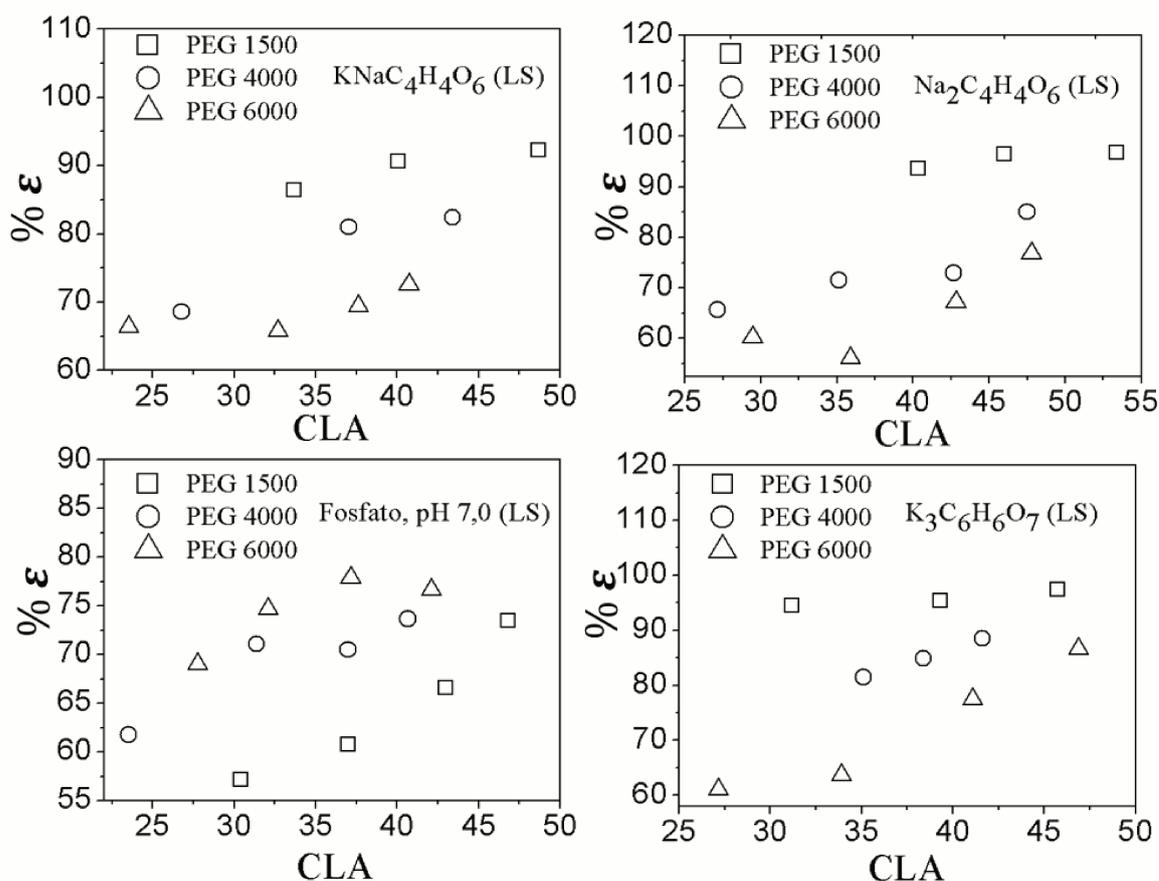
As maiores eficiências de extração para a lisozima foram obtidas para os sistemas formados por PEG 1500/(sais tartaratos ou citrato de potássio), conforme pode ser observado nas Figuras 4.29 e 4.30, as quais mostram os dados da Tabela 4.21. Eficiências acima de 80 % também podem ser vistas em SABs dos sistemas formados por PEG (4000 ou 6000) e sais tartarato, citrato de potássio e tiossulfato de sódio, nos resultados referentes às últimas linhas de amarração. Nos demais sistemas envolvendo a partição desta proteína, as $\% \epsilon$ estão entre 50 e 78 %. SABs com polímeros de maiores massas molares apresentaram eficiências de extração menores na fase superior devido à diminuição do volume livre disponível para a proteína se acomodar nessa fase (PERUMALSAMY e BATCHA, 2011, VIEIRA *et al.*, 2019), situação também chamada de efeito do volume excluído (SU e CHIANG, 2006). De fato, isso explica as maiores eficiências estarem relacionadas aos sistemas com PEG 1500. Nos sistemas com PEG/ fosfato de potássio da Figura 4.30, o efeito é contrário, pois a partição da lisozima foi direcionada para a fase inferior, como discutido no item 4.4.2.

Figura 4. 29: Eficiência de extração em função da CLA para o sistema formado por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) a 30°C.



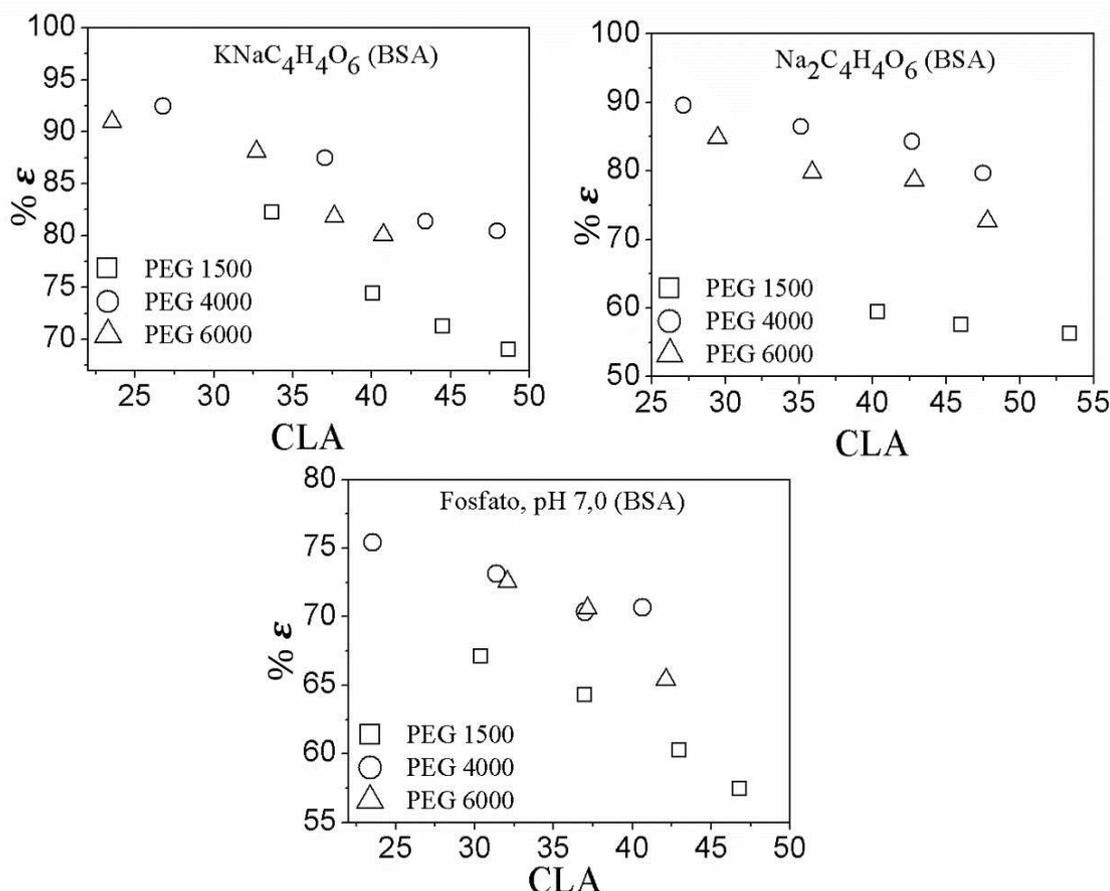
Fonte: Do autor.

Figura 4. 30: Eficiência da extração da lisozima (LS) em função da CLA para os SABs formados por PEG (1) + sal (2) + água a 30°C.



Fonte: Do autor.

Figura 4. 31: Eficiência da extração da albumina de soro bovino (BSA) em função da CLA para os SABs formados por PEG (1) + sal (2) + água a 30°C



Fonte: Do autor.

Como observado nas Figuras 4.29 e 4.31, em relação às partições da BSA da Tabela 4.20, as maiores % ε foram obtidas pelos SABs do tipo PEG (4000 ou 6000) / sal (tartarato de sódio e potássio ou tartarato de sódio). Nos sistemas com tampão fosfato e tiosulfato de sódio, as eficiências ficaram entre 57-76% e 60-74%, respectivamente. O maior valor de eficiência de extração encontrado foi de 92,45% para o PEG 4000/ tartarato de sódio e potássio no CLA igual a 26,78.

Devido ao aumento natural da hidrofobicidade do PEG de altas massas molares, a partição na fase inferior será maior nos SABs com polímeros de massas molares maiores, diferente do que acontece com a partição na fase superior (PERUMALSAMY E BATCHA, 2011). Portanto, as maiores eficiências obtidas na fase inferior serão observadas para os SABs com os polímeros de massas molares maiores, como foi observado neste trabalho para os casos da Figura 4.31 e especificamente para o SAB formado por PEG/tampão fosfato da Figura 4.30.

4.5.4 – EFEITO DO SAL NA PARTIÇÃO

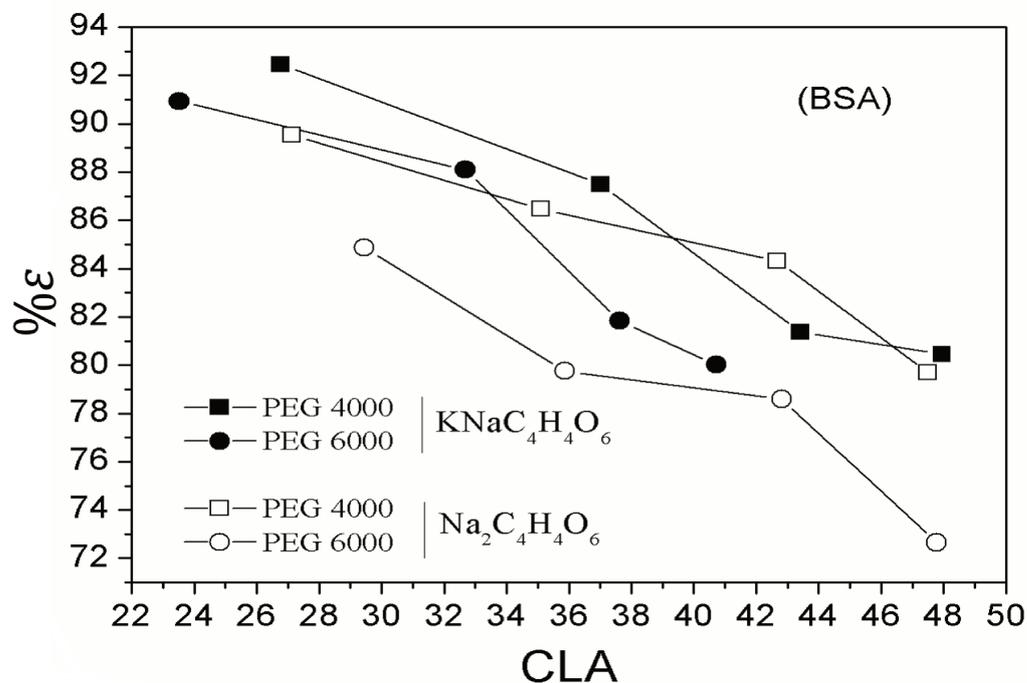
Como os SABs com PEG (4000 ou 6000) / sais tartaratos e PEG 1500/ (citrato de potássio e sais tartaratos) apresentaram as maiores eficiências de extração para a partição da BSA e da lisozima, respectivamente, o estudo do efeito do sal foi realizado nestes sistemas.

Considerando a extração da BSA (Figura 4.32), uma comparação entre os sistemas com os sais tartarato de sódio e tartarato de sódio e potássio, mostrou que o segundo foi mais eficiente para a extração desta proteína na maioria dos sistemas com PEG 4000 e PEG 6000, tendo alcançando eficiência máxima de 92,45% no CLA igual a 26,78 e com PEG 4000. Isso mostra que os sais com cátion K^+ em sua estrutura e mesmo ânion, proporcionou as maiores eficiências de extração na maioria dos SABs.

Em relação à partição da lisozima (Figura 4.33), as maiores % ϵ obtidas foram 96,72 para o tartarato de sódio (CLA=53,40), 92,20 para o tartarato de sódio e potássio (CLA=48,69) e 97,30 para o citrato de sódio (CLA= 45,76). Os resultados obtidos mostraram que o eletrólito tartarato de sódio e potássio teve o pior desempenho na separação desta proteína nas condições analisadas nesse trabalho.

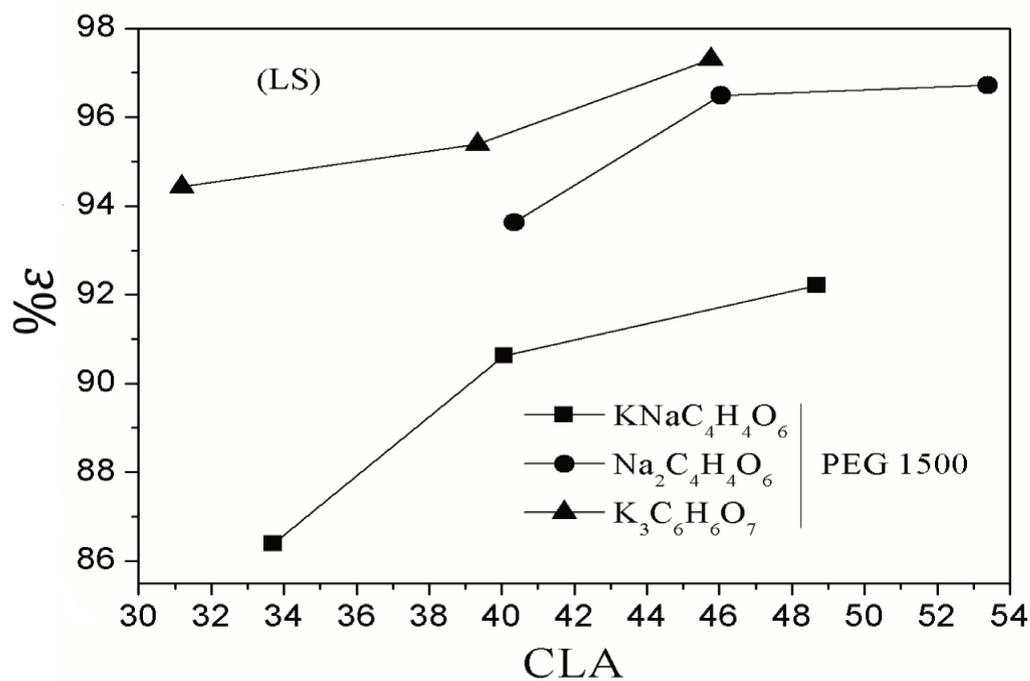
Corroborando com os achados dessa tese, a razão da influência do eletrólito nos SABs sobre a partição de solutos permanece desconhecida, e a literatura não revela comportamento sistemático (BORGES *et al.*, 2016).

Figura 4. 32: Influência do eletrólito no coeficiente de partição (K_P) da albumina de soro bovino (BSA) nos sistemas do tipo PEG 4000 ou 6000 (1) + sais tartaratos (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.

Figura 4. 33: Influência do eletrólito no coeficiente de partição (K_P) da lisozima (LS) nos sistemas do tipo PEG 1500 (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.

4.6- RESUMO DOS RESULTADOS DA PARTIÇÃO DAS PROTEÍNAS

A partição da albumina de soro bovino (BSA) e lisozima (LS) foi estudada nos SABs formados por PEG (1500, 4000 ou 6000 g.mol⁻¹)/ sal (inorgânico ou orgânico) a 30°C. Os sais utilizados foram: citrato de potássio, tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, tiossulfato de sódio e fosfato dipotássico/ fosfato monopotássico (pH 7,0). Os principais resultados obtidos e análises realizadas estão enumeradas nos itens seguintes:

- ✓ A lisozima ficou concentrada na fase superior na maioria dos sistemas e a BSA foi particionada para a fase inferior em todos os sistemas. Em especial, nos SABs do tipo PEG/ tiossulfato de sódio, e PEG/ tampão fosfato de potássio (pH 7,0), a lisozima teve preferência pela fase rica em sal (fase inferior).
- ✓ O acréscimo do comprimento da linha de amarração (CLA) aumenta o coeficiente de partição (K_p) na maioria dos sistemas avaliados, com exceção dos sistemas com tiossulfato de sódio e com tampão fosfato e PEGs 4000 e 6000, cujo efeito é inverso.
- ✓ Em geral, foi observado que o aumento massa molar do PEG diminui os valores de K_p .
- ✓ Em relação às eficiências de extração ($\% \varepsilon$), considerando as duas proteínas, os sistemas formados por PEG + (tiossulfato de sódio ou tampão fosfato) apresentaram eficiências entre 57,11 e 77,84%. Nos sistemas formados por PEG e sais tartaratos as $\% \varepsilon$ ficaram entre 56,22 e 92,45 para a BSA e entre 66,41 e 96,79 para a lisozima. Por último, os SABs formados por PEG e citrato de potássio, apresentaram eficiências de extração entre 61,04 a 97,30 para a lisozima.

5. CONCLUSÕES

O objetivo desta tese foi avaliar o comportamento de partição de duas proteínas modelo (BSA e lisozima) em SABs formados por PEGs de diferentes massas molares combinados com sais orgânicos, inorgânicos e soluções tampão. Para isto, dados de equilíbrio líquido-líquido, alguns deles inéditos, foram estudados experimentalmente.

Os SABs obtidos foram de dois tipos: PEG (1500, 4000 ou 6000)/ sal e líquido iônico ([bmim]BF₄)/ sal. O estudo de partição foi realizado apenas no primeiro tipo de sistema. Os sais utilizados foram: acetato de sódio, citrato de sódio, citrato de potássio, tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, tiosulfato de sódio, fosfato monopotássico e fosfato dipotássico.

Esta tese fornece uma ampla e interessante contribuição de dados de ELL para a análise da partição de solutos em SABs, pois possibilita o estudo da influência da temperatura, do pH, do tipo de sal, da massa molar do PEG e do comprimento da linha de amarração no comportamento de separação de qualquer analito de interesse. Além disso, as análises relacionadas ao processo de extração de proteínas encontrados neste trabalho fornece também uma importante contribuição para a área de bioquímica e conhecimento de base.

Em relação aos estudos de partição das duas proteínas modelo, foi constatado que a partição da BSA nos SABs com PEG (4000 ou 6000) /tartarato de sódio e potássio foram os mais eficientes, alcançando o valor máximo de eficiências de extração (% ϵ) igual a 92,45% no comprimento de linha de amarração (CLA) igual a 26,78 relacionado a sistemas com o PEG 4000. No caso da lisozima, os SABs com maiores eficiências de extração foram aqueles formados por PEG 1500 e pelos sais tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio e citrato de potássio e as maiores % ϵ obtidas nos sistemas com estes sais foram 96,72 (CLA=53,40), 92,20 (CLA=48,69) e 97,30 (CLA= 45,76), respectivamente. Portanto, sugere-se esses sistemas para a extração dessas duas biomoléculas, desde que seja feito um estudo de viabilidade econômica e da atividade enzimática nestes SABs.

Os resultados do estudo de partição desta tese mostraram que uma mesma proteína em diferentes sistemas apresenta padrões de partição diferentes e também inesperados. O processo de partição pode depender de muitos fatores, tais como das características dos componentes dos sistemas e suas interações moleculares, hidrofobicidade relativa das fases, propriedades físico-químicas dos SABs, dentre outros. O comportamento de partição das biomoléculas não revelou um comportamento sistemático e ainda depende de muitos estudos para compreendê-lo.

6. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Nessa tese de doutorado foi apresentado um conjunto de dados de ELL experimental que pode ser utilizado para o estudo de partição de diferentes biomoléculas e compostos químicos. Em todos os sistemas foram obtidas 4 linhas de amarração cujas fases são de volumes aproximadamente iguais. Assim, as sugestões para pesquisas futuras estão baseadas em possíveis combinações de sistemas para aplicação do estudo de extração líquido-líquido de proteínas ou qualquer outro tipo de analito.

- ✓ Avaliar a partição da BSA e lisozima em todos os demais sistemas, incluindo análise da influência do pH (sistemas com tampão fosfato ou tampão citrato), da temperatura (sistemas com tiosulfato de sódio) e atividade enzimática;
- ✓ Os SABs com tiosulfato de sódio a 20, 30 e 40°C são inéditos e até o momento não há publicações de partições nestes sistemas. Portanto, seria interessante o uso desses sistemas para extração de diversos de compostos químicos;
- ✓ Outro tipo de SAB que ainda não foi muito explorado na literatura envolve o sal tartarato de sódio e potássio, sendo que até o momento não foram publicados dados de ELL com variação de temperatura e estudo do pH para este tipo de sistema;
- ✓ Estudo de partição utilizando apenas os sistemas tartaratos de sódio e tartarato de sódio e potássio para um determinado analito de interesse. Poderia incluir o estudo de ELL do tartarato de potássio que não foi utilizado neste trabalho.
- ✓ E por fim os dois sistemas com tampão fosfato de potássio (pH 6, 7 e 8) e tampão citrato de sódio (pH 5, 6 e 7) poderiam ser utilizados para um estudo da influência do pH na partição de proteínas ou substância de interesse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, F., PIRDASHTI, M., ROSTAMI, A.A. Density, refractive index and liquid–liquid equilibrium data of polyethylene glycol 3000 + potassium formate + water at different pH values Chinese. *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 26, p. 168–174, 2018.

ALBERTSSON, P.A. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. New York: John Wiley, 1986, 346 p.

ALBERTSSON, P.A. Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems. *Nature*, v. 182, p. 709-711, 1958.

ALVARENGA, B. G., VIRTUOSO, L. S., LEMES, N. H.T., LUCCAS, P. O. Phase behaviour at different temperatures of an aqueous two-phase ionic liquid containing ([bmim]BF₄ + manganese sulfate + water). *Journal Chemical Thermodynamics*, v. 61, p. 45–50, 2013.

ALVES, J.G.L. F., CHUMPITAZ, L.D., DA SILVA, L.H., FRANCO, T.T., MEIRELLES, A.J. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two- phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p.235-239, 2000.

ALVES, J. G. L. F., BRENNEISEN, J., NINNI, L., MEIRELLES, A. J. A., MAURER, G. Aqueous Two-Phase Systems of Poly (ethylene glycol) and Sodium Citrate: Experimental Results and Modeling. *Journal Chemical Engineering Data.*, v. 53, p. 1587-1594, 2008.

ANANTHAPADMANABHAN, K. P., GODDARD, E. D. Aqueous bi-phase formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. *Langmuir*, v. 3, p. 25-31, 1987.

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

BABU, B.R., RASTOGI, N.K., RAGHAVARAO K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 47. p. 83-89, 2008.

BAI, S., WAN, J., CAO, X. Partitioning of tylosin in recyclable aqueous two-phase systems based on two pH-responsive polymers. *Process Biochemistry*, v. 87, p. 204-212, 2019.

BASKARAN, D., CHINNAPPAN, K., MANIVASAGAN, R., MAHADEVAN, D.K. Partitioning of crude protein from aqua waste using PEG 600-inorganic salt Aqueous Two-Phase Systems. *Chemical Data Collections*, v.15–16, p.143–152, 2018.

BASSANI, G., FARRUGGIA, B., NERLI, B., ROMANINI, D., PICÓ, G. Porcine pancreatic lipase partition in potassium phosphate–polyethylene glycol aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 859, p. 222-228, 2007.

BELCHIOR, D.C.V., QUENTAL, M.V., PEREIRA, M. M., MENDONCA, C.M.N., DUARTE, I. F., FREIRE, M.G. Performance of tetraalkylammonium-based ionic liquids as constituents of aqueous biphasic systems in the extraction of ovalbumin and lysozyme. *Separation and Purification Technology*, v. 233, 116019, 2020.

BENAVIDES, J., RITO-PALOMARES, M., ASENJO, J.A. Aqueous two-phase systems. In: *Comprehensive biotechnology*, 2nd ed. Elsevier, p. 697–713, 2011.

BOAGLIO, A., BASSANI, G., PICO, G., NERLI, B. Features of the milk whey protein partitioning in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems with the goal of isolating human alpha-1 antitrypsin expressed in bovine milk. *Journal of chromatography B*, v. 827, p.18-23, 2006.

BORGES, G.A., SILVA, L. P., PENIDO, J. A., LEMOS, L. R., MAGESTE, A. B., RODRIGUES, G. D. A method for dye extraction using an aqueous two-phase system: Effect of co-occurrence of contaminants in textile industry wastewater. *Journal of environmental management*, v.183, p. 196-203, 2016.

CAO, Q., QUAN, L., HE, C., LI, N., LI, K., LIU, F. Partition of horseradish peroxidase with maintained activity in aqueous biphasic system based on ionic liquid. *Talanta*, v. 77, p. 160–165, 2008.

CAPELA E.V., QUENTAL M.V., DOMINGUES P., COUTINHO J.A.P., FREIRE M.G. Effective separation of aromatic and aliphatic amino acid mixtures using ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. *Green Chemistry*, v. 19, p. 1850-4, 2017.

CAPÉZIO, L., ROMANINI, D., PICÓ, G.A., NERLI, B., Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. *Journal of Chromatography B*, v. 819, p.25-31, 2005.

CASTRO, L.S., PEREIRA, P., PASSARINHA, L.A., FREIRE, M.G., PEDRO, A.Q. Enhanced performance of Polymer-polymer aqueous two-phase systems using ionic liquids as adjuvants towards the purification of recombinant proteins. *Separation and purification technology*, v. 2481, n. 117051, 2020.

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

CRUZ, J. L., RENON, H. “A New Thermodynamic Representation of Binary Electrolyte Solutions Nonideality in the Whole Range of Concentration”. *AIChE Journal*, v. 24, p. 817–830, 1978.

DA SILVA, C.A.S., COIMBRA, J.S.R., ROJAS, E.E.G., TEIXEIRA J.A.C. Partitioning of glycomacropetide in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1213-1216, 2009.

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

DA SILVA, L.H.M., DA SILVA, M.C.H., MESQUITA, A.F., DO NASCIMENTO, K.S., COIMBRA, J.S.R., MINIM, L.A. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer+ salt+ water two-phase systems at different temperatures and pH. *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 50, p. 1457-1461, 2005.

DINIS, T.B.V., PASSOS, H., LIMA, D.L.D., SOUSA, A.C.A., COUTINHO, J.A.P., ESTEVES, V.I. Simultaneous extraction and concentration of water pollution tracers using ionic-liquid-based systems. *Journal Chromatography A*, v. 1559, p. 69–77, 2018.

DOS SANTOS, N.V., DE CARVALHO, S. V., PESSOA JUNIOR, A., PEREIRA, J.F.B. Liquid–liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: trends and future prospects. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v. 93, p. 1845–63, 2018.

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

EMERSON, T. E. Unique features of albumin-A Brief Review. *Critical Care Medicine*, v. 17, p. 690-694, 1989.

FARRUGGIA, B., RIGATUSO, R., CAEZIO, L., DIEZ, V., PICÓ, G. Influence of high concentration monovalent cations on the protein partitioning in polyethyleneglycol 1500-phosphate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 809, p. 301-306, 2004.

FERREIRA, G.M.D., MALDANER, A.O., SILVA, L.H.M., HESPANHOL, M. C. Partitioning of cocaine and its adulterants in aqueous two-phase systems: An alternative drug identification method. *Fluid Phase Equilibria* v.506, 112367, 2020.

FERREIRA, L. A., TEIXEIRA, J. A. Salt effect on the aqueous two-phase system PEG 8000 – Sodium Sulfate. *Journal of Chemical Engineering Data*, v.56, p. 133-137, 2011.

FREIRE, M.G. Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems: fundamentals and applications. Berlin Heidelberg: Springer, 2016.

FREIRE, M.G., LOUROS, C.L.S., REBELO, L.P.N., COUTINHO, J.A.P. Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. *Green Chemistry*, v. 13, p.1536–45, 2011.

FREIRE, M.G., NEVES, C.M.S.S., MARRUCHO, I.M., COUTINHO, J.A.P., FERNANDES, A.M. Hydrolysis of tetrafluoroborate and hexafluorophosphate counter ions in imidazolium-based ionic liquids. *Journal Physical Chemistry A*, v.114, p.3744-3749, 2010.

GANDOLFI, O.R.R. Caracterização de sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, PEG e água e aplicação na partição de alfa-amilase. Itapetinga-Ba: Programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), 2016, 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).

GHAFFARI, S., SHAHROUZI, J.R., TOWFIGHI, F., KHOSHFETRAT, A.B. Partitioning of cefazolin in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium salts (citrate, tartrate, and sulphate). *Fluid Phase Equilibria*, v. 488, p. 54-61, 2019.

GHASEMZADEH, B., SHAHRIARI, S., PAZUKI, G. Efficient separation of curcumin using tetra butyl phosphonium bromide / carbohydrates (sorbitol, fructose) aqueous two-phase system. *Fluid Phase Equilibria*, v. 498, p.51-58, 2019.

GLYK, A., SOLLE, D., SCHEPER, T., BEUTEL, S. Evaluation of driving forces for protein partition in PEG-salt aqueous two-phase systems and optimization by design of experiments. *Journal of chromatography and separation techniques*, v. 8, 1000389, 2017.

GOLDBERG, R.J. A theory of antibody antigen reactions. I. Theory for reactions of multivalent antigen with bivalent and univalent antibody. *Journal of the American Chemical Society*, v. 74, p. 5715-5725, 1952.

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

GONZALEZ-MARTIN, R., PACHECO-FERNANDEZ, I., AYALA, J. H., AFONSO, A. M., PINO, V. Ionic liquid-based miniaturized aqueous biphasic system to develop an environmental-friendly analytical preconcentration method. *Talanta*, v. 203, p. 305–313, 2019.

GONZÁLEZ-TELLO, P., CAMACHO, F., BLÁZQUEZ, G. Liquid-liquid equilibrium in the system poly(ethylene glycol) + MgSO₄ + H₂O at 298 K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v.41, p. 1333–1336, 1996.

GRABER, T.A., TABOADA, M.E.T., ASENJO, J.A., ANDREWS, B.A. A influence of molecular weight of the polymer on the liquid-liquid equilibrium of the poly(ethyleneglycol)

+ NaNO₃ + H₂O system at 298.15K. *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 46, p.765-768, 2001.

GRILO, A.L., AIRES-BARROS, M.R., AZEVEDO, A.M. Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. *Separation & Purification Reviews*, v. 45, p. 68–80, 2016.

GUO, J., XU, S., QIN, Y., LI, Y., LIN, X., HE, C., DAI, S. The temperature influence on the phase behavior of ionic liquid based aqueous two-phase systems and its extraction efficiency of 2-chlorophenol. *Fluid Phase Equilibria*, v. 506, 112394, 2020.

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

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 Chemical Engineering Data*, v.48, p. 1170-1177, 2003.

HAMTA, A., DEHGHANI, M.R. Application of polyethylene glycol based aqueous two-phase systems for extraction of heavy metals. *Journal of Molecular liquids*, v.231, p. 20–24, 2017.

HAMZEHZADEH, S., MOHAMMED TAGHI ZAFARANI-MOATTAR, M. T. Phase separation in aqueous solutions of polypropylene glycol and sodium citrate: Effects of temperature and pH. *Fluid Phase Equilibria*, v. 385, p. 37–47, 2015.

HAN J., WANG, Y., YU, C.L., YAN, Y.S., XIE, X.Q. Extraction and determination of chloramphenicol in feed water, milk, and honey samples using an ionic liquid/sodium citrate aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytical Bioanalytical Chemical*, v. 399, p.1295–304, 2011.

HAN, J., YU, C., WANG, Y., XIE, X., YAN, Y., YIN, G., GUAN, W. Liquid-Liquid equilibria of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and sodium citrate/tartrate/acetate aqueous two-phase systems at 298,15K: Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilibria*, v.295, p. 98-103, 2010a.

HAN, J., PAN, R., XIE, X., WANG, Y., YAN, Y., YIN, G., GUAN, W. Liquid-Liquid Equilibria of Ionic Liquid 1-Butyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate + Sodium and Ammonium Citrate Aqueous Two-Phase Systems at (298.15, 308.15, and 323.15) K. *Journal Chemical Engineering Data*, v. 55, p. 3749–3754, 2010b.

HE, C., LI, S., LIU, H., LI, K., LIU, F. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. *Journal of Chromatography A*, v. 1082, p. 143-149, 2005.

HUANG, Y., CHENA, D., KONG, L., SU, M., CHEN, Y. Aqueous two-phase systems (polyethylene glycol+ammonia sulfate) for thallium extraction: Optimization of extraction efficiency, structural characterization, and mechanism exploration. *Separation and Purification Technology*, v.235, 115740, 2020.

HUBNER, M., LODZIAK, C., DO, H.T.J., HELD, C. Measuring and modeling thermodynamic properties of aqueous lysozyme and BSA solutions. *Fluid Phase Equilibria*, v.472, p. 62–74, 2018.

IQBAL, M., TAO, Y., XIE, S., ZHU, Y., CHEN, D., WANG, X., *et al.* Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, v.18, p.1–18, 2016.

IWASHITA, K., HANDA, A., SHIRAKI, K. Co-aggregation of ovalbumin and lysozyme. *Food Hydrocolloids*, v. 67, p. 206–215, 2017.

JAYAPAL, M., REGUPATHI, I., MURUGESAN, M. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly(ethylene glycol) 2000 + Potassium Citrate + Water at (25, 35, and 45) °C. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 52, p. 56–59, 2007.

JIMÉNEZ, Y.P., FREIJEIRO, C. R., RODRÍGUEZ, A. S. O. Phase equilibrium for polymer/ionic liquid aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v.506, 112387, 2020.

JOHANSSON, H. O., LUNDH, G., KARLSTROM, G., TJERNELD, F. Effects of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide co-polymers. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1290, p. 289-298, 1996.

LI, S. H., HE, C. Y., LIU, H. W., LI, K. A., LIU, F. Ionic Liquid-Salt Aqueous Two-Phase System, a Novel System for the Extraction of Abused Drugs. *Chinese Chemical Letters*, v. 16, n. 8, p. 1074–1076, 2005a.

LI, S., HE, C., LIU, H., LI, K., LIU, F. Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids. *Journal of Chromatography B*, v. 826, p. 58-62, 2005b.

LI, Y., YANG, L., ZHAO, X., GUAN, W. Liquid-Liquid equilibria of ionic liquid N-ethylpyridinium tetrafluoroborate+ trisodium citrate/ ammonin citrate tribasic/ sodium succinate/sodium tartrate aqueous two-phase systems at 298.15 K. *Thermochimica Acta*, v. 550, n. 5-12, 2012.

LI, Z., PEI, Y., LIU, L., WANG, J. (liquid + liquid) equilibria for (acetate-based ionic + inorganic salts) aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical thermodynamics*, v.42, p.932-937, 2010a.

LIADOSA, E., SILVÉRIO, S. C., RODRÍGUEZ, TEIXEIRA, J. A., MACEDO, E. A. Liquid–liquid equilibria of polymer–salt aqueous two-phase systems: UCON 50-HB-5100 with potassium citrate and (sodium or potassium) formate at 23 °C. *Journal Chemical Thermodynamic*, v.55, p.166–171, 2012.

LIU, Q., JIANG, Y., LI, W., HU, X., XIA, H., LIU, H., YANG, P. Partitioning behavior of Penicillin G in Aqueous Two-Phase System formed by ionic liquids and phosphate. *Separation Science Technology*, v. 41, p. 2849-2858, 2006.

LUECHAU, f., LING, T.C., LYDDIATT, A. Two-step process for initial capture of plasmid DNA and partial removal of RNA using aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1432-1436, 2010.

MALPIEDI, L. P., FERNÁNDEZ, C., PICÓ, G., NERLI, B. Liquid-Liquid Equilibrium Phase Diagrams of Polyethyleneglycol + Sodium Tartrate + Water Two-Phase Systems. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 53, n. 5, p. 1175–1178, 2008.

MANDEVILLE, J.S., TAJMIR-RIahi, H.A. Complexes of dendrimers with bovine serum albumin. *Biomacromolecules*, v. 11, p. 465–472, 2010.

MAOSOONGNERN, S., FLOOD, C., FLOOD, A.E., ULRICH, J. Crystallization of lysozyme from lysozyme – ovalbumin mixtures: separation potential and crystal growth kinetics. *Journal of Crystal Growth*, v.469, p. 2–7, 2017.

MARCUS, V. Thermodynamics of solvation of ions. Part 5. Gibbs free energy of hydration at 298.15 K. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, v. 87, p. 2995-2999, 1991.

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. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 53, p. 2441-2443, 2008.

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

MIRSIAGHI, M., PAZUKI, G., VOSSOUGH, M., ALEMZADEH, I. Partitioning of L-lysine monohydrochloride in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dipotassium hydrogen phosphate or trisodium citrate 5-hydrate. *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 55, p.3005–3009, 2010.

MOODY, M.L., WILLAUER, H.D., GRIFFIN, S.T., HUDDLESTON, J.G., ROGERS, R.D. Solvent property characterization of polyethylene glycol/dextran aqueous biphasic systems using the free energy of transfer of a methylene group and a linear solvation energy relationship. *Industrial Engineering Chemistry Research*, v.44, p.3749–60, 2005.

MORADI, F., SHAHROUZI, J.R. Phase equilibrium and partitioning of cephalosporins (cephalexin, cefazolin, cefixime) in aqueous two-phase systems based on carbohydrate (glucose, fructose, sucrose, maltose) / acetonitrile. *Fluid Phase Equilibria*, v. 507, 1123882019, 2020.

MORANDEIRA, L., DEIVE, F. J., SANROMÁN, M. A., RODRÍGUEZ, A., ÁLVAREZ, M. S. Aqueous two-phase systems containing imidazolium ionic liquids and a Tween surfactant. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 105, p. 209–216, 2017.

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

MURRELL, J. N., JENKINS, A. D. *Properties of liquids and solutions*, second edition. New York: J. Wiley, 1994.

MURUCHI, L., LUNARIO, L. D., JIMENEZ, Y. P. Application of central composite design to the partition of perrhenate anion in aqueous two-phase system $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + \text{PEG 4000} + \text{H}_2\text{O}$. *Journal of Molecular Liquids*, v. 279, p. 67–76, 2019.

NANDINI, K. E., RASTOGI, N. K. Liquid-Liquid extraction of lipase using aqueous two-phase system. *Food Bioprocess Technology*, v. 4, p. 295-303, 2011.

NASCIMENTO, K. S., YELO, S, CAVADA, B. S, AZEVEDO, A. M, AIRESBARROS, M. R. Liquid-liquid equilibrium data for aqueous two-phase systems composed of ethylene oxide propylene oxide copolymers. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 56, p. 190-194, 2011.

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

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

NEMATIKANDE, E., SHEKAARI, H. *Salting-out* effect of sodium, Potassium, Carbonate, Sulfite, Tartrate and thiosulfate ions on aqueous mixtures of acetonitrile or 1-methyl-2-pyrrolidone: a liquid-liquid equilibrium study, *Fluid Phase Equilibria*. v.360, p. 357-366, 2013.

OLIVEIRA, A.C., SOSA, F.H.B., COSTA, M.C., MONTEIRO FILHO, E.S., CERIANI, R., Study of liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems formed by poly (ethylene glycol) (PEG) and sodium thiosulfate pentahydrate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, v.476, p.118-125, 2018

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

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 and Engineering Data*, v. 53, p. 895-899, 2008.

OMANA, D.A., WANG, J., WU, J. Co-extraction of egg white proteins using ion-exchange chromatography from ovomucin-removed egg whites. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p.1771-1776, 2010.

OTHMER, D.F., TOBIAS, P.E. Liquid-Liquid extraction data-toluene and acetaldehyde systems. *Industrial and Engineering chemistry*, v. 34, p. 690-692, 1942.

PALOMARES, M. R., BENAVIDES, J. *Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products*, Cham, Switzerland: Springer, 2017.

PATEL, R., KUMARI, M., KHAN, A.B. Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.172, p. 3701-3720, 2014.

PEI, Y., WANG, J., WU, K., XUAN, X., LU, X. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. *Separation and Purification Technology*, v.64, p.288-295, 2009.

PENG, Q., LI, Z., LI, Y. Experiments, correlation and prediction of protein partition coefficient in aqueous two-phase systems containing PEG and K_2HPO_4 - KH_2PO_4 . *Fluid Phase Equilibria*, v. 107, p. 303-315, 1995.

PEREIRA, J.F.B., COUTINHO, J.A.P. Chapter 5 – Aqueous two-phase systems, liquid-phase extraction. *Handbooks in separation science*, p. 157-182, 2020

PEREIRA, J.F.B., FREIRE, M. G., COUTINHO, J. A. P. Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications. *Fluid Phase Equilibria*, v. 505, 112341, 2020.

PEREIRA, J.F.B., KURNIA, K.A., FREIRE, M.G., COUTINHO, J.A., ROGERS, R.D. Controlling the formation of ionic liquid-based aqueous biphasic systems by changing the hydrogen-bonding ability of Polyethylene glycol end groups. *ChemPhysChem*, v. 16, p. 2219–25, 2015a.

PEREIRA, J.F.B., VENTURA, S.P.M., SILVA, F.A., SHAHRIARI, S., FREIRE, M.G., COUTINHO, J.A.P. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and polymers: A platform for the purification of biomolecules. *Separation and purification technology*, v. 113, p.83-89, 2013.

PEREIRA, M. M., PEDRO, S. N., QUENTAL, M. V., LIMA, A. S., COUTINHO, J.A.P., FREIRE, M.G. Enhanced extraction of bovine serum albumin with aqueous biphasic systems of phosphonium- and ammonium-based ionic liquids. *Journal of Biotechnology*, v. 206, p. 17–25, 2015b.

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

PERUMALSAMY, M, BATCHA, M.I. Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based aqueous biphasic system. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 494-497, 2011.

PERUMALSAMY, M., MURUGESAN, T. Partition Behavior of Bovine Serum Albumin in PEG 2000-Sodium Citrate-Water Based Aqueous Two-Phase System. *Separation Science and Technology*, v.42, p.2049-2065, 2007.

PICÓ, G., BASSANI, G., FARRUGGIA, B., NERLI, B. Calorimetric investigation of the protein-flexible chain polymer interactions and its relationship with protein partition in aqueous two-phase systems, *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 40, p. 268-275, 2007.

PIRDASHTI, M., BOZORGZADEH, A., KETABI, M., KHOIROH, I. Phase equilibria of aqueous mixtures of PEG with formate salt: Effects of pH, type of cation, polymer molecular weight and temperature. *Fluid Phase Equilibria*, v. 485, p. 158-167, 2019.

PIRDASHTI, M., MOVAGHARNEJAD, K., ROSTAMI, A.A., AKBARPOUR, P., KETABI, M. Liquid-Liquid Equilibrium Data, Viscosities, Densities, Conductivities, and Refractive Indexes of Aqueous Mixtures of Poly(ethylene glycol) with Trisodium Citrate at Different pH. *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 60, p. 3423-3429, 2015.

PLOTKA-WASYLKA, J., RUTKOWSKA, M., OWCZAREK, K., TOBISZEWSKI, M., NAMIESNIK, J. Extraction with environmentally friendly solvents. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 91, p.12-25, 2017.

PORTO, T.S., PESSOA-FILHO, P.A., NETO, B.B., LIMA FILHO, J.L., CONVERTI, A., PORTO, A.L.F., Pessoa, A. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.34, p. 547-552, (2007).

PRAUSNITZ, J.M., LICHTENTHALER, R.N., AZEVÊDO, E. G. *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*. Prentice-Hall, Inc., 1986. 523 p. (series in the physical and chemical engineering science).

QUENTAL, M.V., PEREIRA, M.M., FERREIRA, A.M., PEDRO, S.N., SHAHRIARI, S., MOHAMADOU, A. Enhanced separation performance of aqueous biphasic systems formed by carbohydrates and tetraalkylphosphonium- or tetraalkylammonium-based ionic liquids. *Green Chemistry*, v. 20, p. 2978–83, 2018.

REGUPATHI, I., SHREELA, M., GOVINDARAJAN, R., AMARESH, S.P., MURUGESAN, T. Liquid-liquid equilibrium of poly (ethylene glycol) 6000 + triammonium citrate + water systems at different temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v.54, p. 1094-1097, 2009.

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

RESCHKE, T., BRANDENBUSCH, C., SADOWSKI, G. Modeling aqueous two-phase systems: I. Polyethylene glycol and inorganic salts as ATPS former. *Fluid Phase Equilibria*, v. 368, p. 91–103, 2014.

RODRIGUES, L. R. M. Valorização da Fração proteica do Soro de Queijo. Minho: Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, 2001, 198 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica).

RODRÍGUEZ, H., FRANCISCO, M., RAHMAN, M., SUM, N., ROGERS, R.D. Biphasic liquids mixtures of ionic liquids and polyethylene glycols. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 11, p.10916-10922, 2009.

ROSA, P.A.J., FERREIRA, I.F., AZEVEDO, A.M., AIRES-BARROS, M.R. Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, v.1217, p.2296–305, 2010.

ROSÁRIO, R.L.S.F., SOUZA, R.L., FARIA, F.O., MAFRAC, M.R., SOARES, C.M.F., PASSOS, H., COUTINHO, J.A.P., LIMA, A.S. Acetonitrile as adjuvant to tune polyethylene glycol+K₃PO₄ aqueous two-phase systems and its effect on phenolic compounds partition. *Separation and Purification Technology*, v. 223, p. 41–48, 2019.

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

SADEGHI R., MAALI M. Toward an understanding of aqueous biphasic formation in polymer-polymer aqueous systems. *Polymer*, v.83, p.1–11, 2016.

SALABAT, A.R., ABNOSI, M.H., Motahari, A. Application of aqueous mixtures of polypropylene glycol or polyethylene glycol with salts in proteomic analysis. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v.7, p. 142-149, 2010.

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

SANDLER, S. I. *Chemical, Biochemical, and Engineering Thermodynamics*. EUA: John Wiley & Sons Inc., 2006.

SANTHI, J. V., TAVANANDI, H.A., SHARMA, R., PRABHAKAR, G., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Differential partitioning of coconut whey proteins and fat using aqueous two-phase extraction. *Fluid Phase Equilibria*, v. 503, 112314, 2020.

SHAHBAZMOHAMMADI, H., SARDARI, S., OMIDINIA, E. Optimization of aqueous two-phase partitioning for purification of recombinant *Eupenicillium terrenum* fructosyl peptide oxidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, 101344, 2019.

SHAHRIARI, S., NEVES, C.M.S.S., FREIRE, M.G., COUTINHO, J.A.P. Role of the Hofmeister series in the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. *The Journal Physical Chemistry B*, v. 116, p.7252–7258, 2012.

SHIBUSAWA, Y., KIHIRA, S., ITO, Y. One-step purification of proteins from chicken egg-wite using counter-current chromatography. *Journal Chromatography B*, v. 709, p.301-315, 1998.

SHIRI, S., KHEZELI, T., LOTFI, S, SHIRI, S. Aqueous two-phase systems: a new approach for the determination of brilliant blue FCF in water and food samples. *Journal of Chemistry*, v. 236196, p.1–6, 2013

SILVÉRIO S.C., GRACIA, J., TEIXEIRA, J.A., MACEDO, E.A. Polyethylene glycol 8000+ citrate salts aqueous two-phase systems: relative hydrophobicity of the equilibrium phases. *Fluid Phase Equilibria*, v. 407, p.298–303, 2016.

SILVÉRIO, S. C., RODRIGUEZ, O., TEIXEIRA, J.A., MACEDO, E.A. The effect of salts on the liquid-liquid phase equilibria of PEG 6000 + salt aqueous two-phase systems. *Journal chemical engineering data.*, v. 58, p. 3528-3535, 2013.

SILVÉRIO, S. C., WEGRZYN, A., LLADOSA, E., RODRÍGUEZ, O., MACEDO, E. A. Effect of Aqueous Two-Phase System Constituents in Different Poly (ethylene glycol)–Salt Phase Diagrams. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 57, p. 1203–1208, 2012.

SINDHU,N., KALAIVANI, S., REGUPATHI,I. Bovine Serum Albumin Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Effects of Variables and Optimization. *BioProcess Journal*, v.12, p. 29-41, 2013.

SMITH, J. M., VAN NESS, H. C., ABBOTT, M. M. *Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química*. 7^o Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SNYDER, S. M., COLE, K. D., SZLAG, D. C. Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25.degree.C. *Journal of Chemical and engineering data*, v. 37, p. 268-274, 1992.

SOARES, R.R.G., AZEVEDO, A.M., VAN ALSTINE, J.M., AIRES-BARROS, M. R. Partitioning in aqueous two-phase systems: analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Biotechnology Journal*, v. 10, p. 1158-1169, 2015.

SOUZA, I. N., SOARES, C. M.F., SOUZA, R. L., FREIRE, M. G., LIMA, A. S. Aqueous two-phase systems formed by maltodextrin and acetonitrile: Phase diagrams and partitioning studies. *Fluid Phase Equilibria*, v. 476, p. 179-185, 2018.

SOUZA, R.C.S. Separação da lisozima e conalbumina presentes na clara do ovo: aspectos tecnológicos e termodinâmicos. Viçosa-MG: Programa de pós graduação e ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2008, 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos).

STRAGEVITCH, L. Equilíbrio líquido-líquido em sistemas não eletrolíticos. Campinas-SP: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1997, 360 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química).

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

TAGHAVIVAND, M., PAZUKI, G., A new biocompatible gentle aqueous biphasic system in cefalexin partitioning containing nonionic Tween 20 surfactant and three organic/inorganic different salts. *Fluid Phase Equilibria*, v.379, p. 62-71, 2014.

TEIXEIRA, A.G., AGARWAL, R., KO, K.R., GRANT-BURT, J., LEUNG, B.M., FRAMPTON, J.P. Emerging biotechnology applications of aqueous two-phase systems. *Advanced Healthcare Mater*, v.7, p.1–19, 2018.

TISELIUS, A., PORATH, J., ALBERTSSON, P.A. Separation and fractionation of macromolecules and particles. *Science*, v. 141, p.13-20, 1963.

TORRES, A. A.F.N. Estudo da partição de imunoglobulina g em sistemas aquosos bifásicos utilizando PEG/tampão citrato. Fortaleza-Ce: Departamento de engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2013, 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química).

TREYBAL, R. E. *Liquid Extraction*. 1st Edition. New Work, San Francisco, Toronto, London: McGraw-Hill Book Co., Inc. 1951. 432 p.

TREYBAL, R. E. *Liquid Extraction*. 2st Edition. New Work, San Francisco, Toronto, London: McGraw-Hill Book Co., Inc. 1963. 717 p.

TRUJILLO-RODRIGUEZ, M. J., NAN, H., VARONA, M., EMAUS, M., SOUZA, I. D., ANDERSON, J. L. Advances of ionic liquids in analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, v. 91, p. 505-531, 2019.

TUBÍO, G., PELLEGRINI, L., NERLI, B. B., PICO, G. A. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly (ethylene glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 51, p. 209-212, 2006.

VALADARES, A., VALADARES, C.F., LEMOS, L. R., MAGESTE, A. B., RODRIGUES, G. D. Separation of cobalt and nickel in leach solutions of spent nickel-metal hydride batteries using aqueous two-phase systems (ATPS). *Hydrometallurgy*, v. 181, p.180–188, 2018.

VENTURA, S.P.M., SILVA, F.A., QUENTAL, M.V., MONDAL, D., FREIRE, M.G., COUTINHO, J.A.P. Ionic-liquid-mediated extraction and separation processes for bioactive compounds: past, present, and future trends. *Chemical Reviews*, v.117, p. 6984–7052, 2017.

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

VIEIRA, A. W., MOLINA, G., MAGESTE, A. B., RODRIGUES, G. D., DE LEMOS, L. R. Partitioning of salicylic and acetylsalicylic acids by aqueous two-phase systems: Mechanism aspects and optimization study. *Journal of Molecular Liquids*, v. 296, 111775, 2019.

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

WANG, Y., XU, X., YAN, Y., HAN, J., ZHANG, Z. Phase behavior for the [Bmim]BF₄ aqueous two-phase systems containing ammonium sulfate/sodium carbonate salts at different temperatures: Experimental and correlation. *Thermochimica Acta*, v. 501, p. 112–118, 2010.

WANG, Y., XU, X.H., HAN, J., YAN, Y.S. Separation/enrichment of trace tetracycline antibiotics in water by [Bmim]BF₄–(NH₄)₂SO₄ aqueous two-phase solvent sublation. *Desalination*, v. 266, p. 114-118, 2011.

WATANABE, E.O. Equilíbrio de fases na precipitação de lisozima e albumina de soro bovino com uso de sais. Campinas-SP: Faculdade de engenharia química da Universidade estadual de campinas (UNICAMP) 2007, 215 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química).

WYSOCZANSKA, K., MACEDO, E.A. Influence of the Molecular Weight of PEG on the Polymer/Salt Phase Diagrams of Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v.61, p. 4229–4235, 2016.

XIE, X., YAN, Y., HAN, J., WANG, Y., YIN, G., GUAN, W. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems of PPG400 and biodegradable salts at temperatures of (298.15, 308.15, and 318.15) K. *Journal Chemical Engineering Data*, v.55, p. 2857–61, 2010.

XU, P., WANG, Y., CHEN, J., WEI, X., XU, W., NI, R., MENG, J., ZHOU, Y. Development of deep eutectic solvent-based aqueous biphasic system for the extraction of lysozyme. *Talanta*, v.202, p. 1–10, 2019.

YAN-MIN, L., YAN-ZHAO, Y., XI-DAN, Z., CHUAN-BO, X. Bovine serum albumin partitioning on polyethylene glycol (PEG/potassium citrate aqueous two-phase systems. *Food and Bioproducts Processing*, v. 88, p.40-46, 2010.

YAZDABADI, A., SHAHRIARI, S., SALEHIFAR, M. Extraction of caffeine Using aqueous two-phase systems containing ionic liquid and sorbitol. *Fluid Phase Equilibria*, v. 502, 112287, 2019.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T., HAMIDI, A. A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-potassium citrate system. *Journal Chemical. Engeneering Data*, v.48, p.262–265, 2003.

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

ZAFARANI-MOATTAR, M. T., HAMZEZHARDEH, S. *Salting-Out* Effect, Preferential Exclusion, and Phase Separation in Aqueous Solutions of Chaotropic Water-Miscible Ionic

Liquids and Kosmotropic Salts: Effects of Temperature, Anions, and Cations. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 55, p. 1598–1610, 2010.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T., HAMZEHZADEH, S., HOSSEINZADEH, S. Phase diagrams for liquid–liquid equilibrium of ternary poly (ethyleneglycol) + di-sodium tartrate aqueous system and vapor–liquid equilibrium of constituting binary aqueous systems at $T = (298.15, 308.15, \text{ and } 318.15)$ K. *Fluid Phase Equilibria*, v. 268, p. 142–152, 2008.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T., HASHEMI, V. H. (Liquid + liquid) equilibrium of the ternary aqueous system containing polyethylene glycol dimethyl ether 2000 and tri-potassium citrate at different temperatures. *Journal of Chemical thermodynamics*, v. 48, p. 75–83, 2012.

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 Equilibria*, 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., TOLOUEI, S. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol 4000 and di-potassium tartrate, potassium sodium tartrate, or di-potassium oxalate: Experiment and correlation. *Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry*, v. 32, p. 655-660, 2008.

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

ZAFARANI-MOATTAR, M.T., HAMZEHZADEH, S. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium succinate or sodium formate. *Chalphad*, v. 29, p. 1-6, 2005.

ZHANG, W., HU, Y., HAN, J., NI, L., WU, Y. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) de different molecular weights and several ammonium salts at 298.15K. *Thermochimica Acta*, v.560, p. 47-54, 2013.

ZIMMERMANN S., GRETZINGER, S., SCHWAB, M.L., SCHEEDER, C., OELMEIER, S.A. High-throughput downstream process development for cell-based products using aqueous twophase systems. *Journal of Chromatography A*, v.1464, p.1–11, 2016.

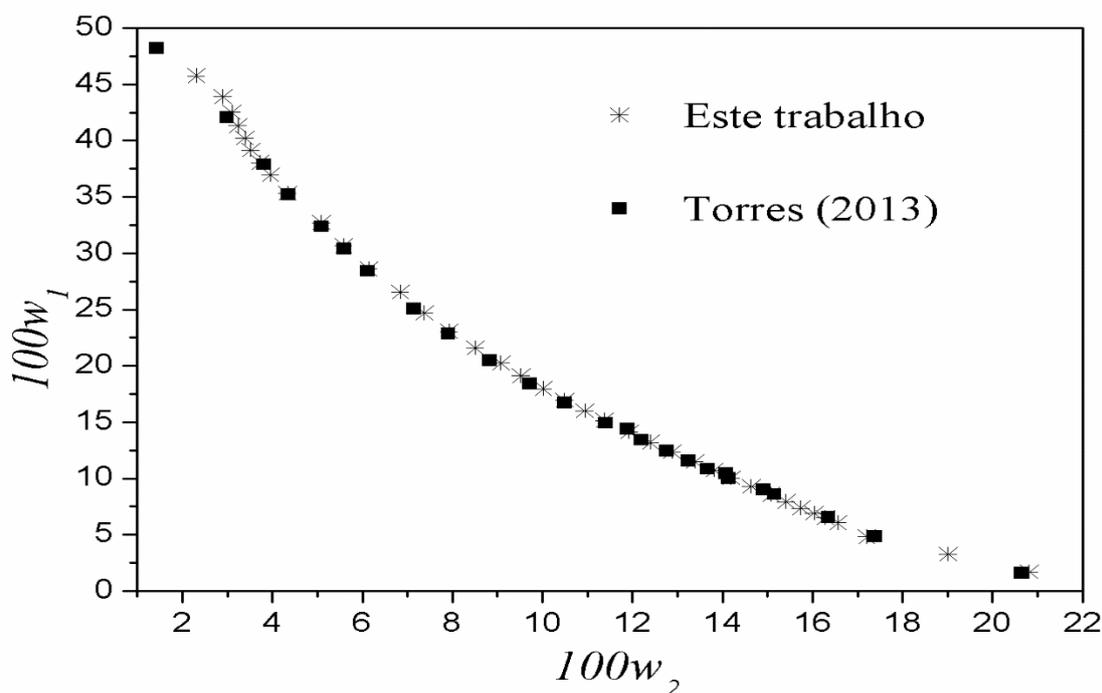
APÊNDICE A- Comparação com trabalhos da literatura

Tabela A 1: Dados das curvas binodais para o sistema: PEG 4000 (1) + tampão citrato de sódio (2), pH 5,0 + água (3) a 25°C.

Este trabalho						Torres (2013)			
100w ₁	100w ₂								
45,76	2,31	23,05	7,93	9,28	14,63	48,20	1,44	13,43	12,20
43,89	2,90	21,58	8,51	8,56	15,07	42,07	2,99	12,45	12,75
42,51	3,10	20,24	9,08	7,93	15,41	37,89	3,81	11,58	13,24
41,33	3,23	19,11	9,52	7,38	15,74	35,21	4,36	10,85	13,66
40,21	3,39	17,96	10,02	6,90	16,03	32,37	5,09	10,43	14,08
39,14	3,52	16,94	10,49	6,51	16,28	30,40	5,59	10,02	14,14
38,04	3,73	16,00	10,94	6,05	16,56	28,42	6,12	9,00	14,90
36,97	3,96	15,14	11,38	4,82	17,20	25,07	7,15	8,60	15,15
35,32	4,34	14,12	11,92	3,26	19,01	22,87	7,91	6,56	16,35
32,71	5,09	13,20	12,40	1,70	20,81	20,49	8,83	4,84	17,39
30,66	5,58	12,35	12,88			18,43	9,71	1,58	20,63
28,58	6,14	11,48	13,38			16,73	10,49		
26,54	6,84	10,72	13,81			14,94	11,41		
24,70	7,37	10,05	14,19			14,41	11,89		

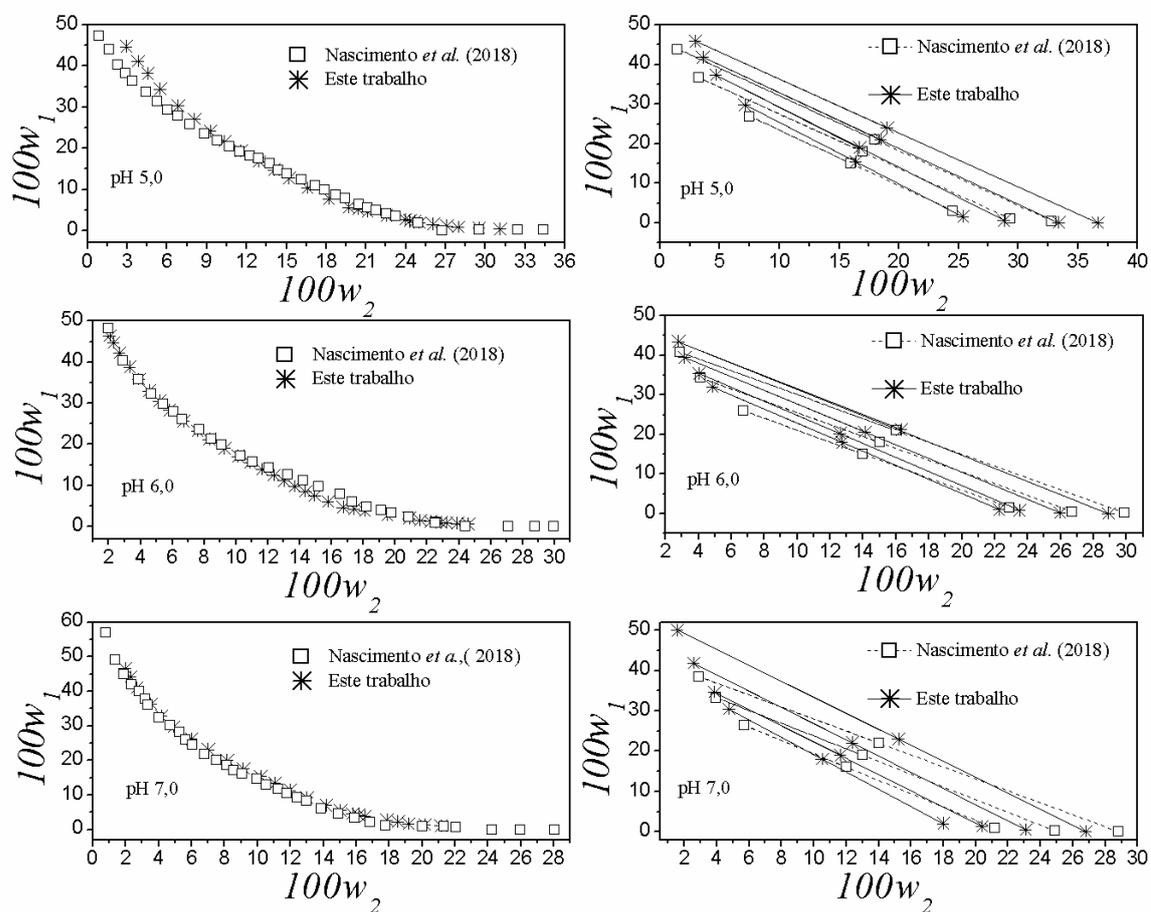
Fonte: Do autor.

Figura A 1: Curvas binodais do SAB formado por PEG 4000 (1) + tampão citrato de sódio (2), pH 5,0 + água (3) a 25°C.



Fonte: Do autor.

Figura A 2: Diagrama de fases dos SABs formados por PEG 1500 (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C em diferentes pHs. Comparação com dados da literatura (NASCIMENTO et al., 2018).



Fonte: Do autor.

APÊNDICE B- Curvas binodais dos experimentos de ELL

Tabela B 1: Dados das curvas binodais para o sistema: PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C e pressão atmosférica^a

pH 5,0				pH 6,0				pH 7,0			
<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>										
PEG 1500											
44,71	2,93	4,62	21,10	46,35	2,07	11,13	13,01	46,58	1,97	4,63	15,77
41,15	3,82	3,62	22,53	44,70	2,29	9,78	13,68	44,18	2,29	4,20	16,14
8,14	4,55	2,62	23,95	42,25	2,69	8,53	14,34	40,92	2,66	3,77	16,51
34,40	5,49	2,37	24,31	38,76	3,33	7,46	14,94	36,36	3,52	2,73	17,86
30,30	6,84	2,12	24,67	35,80	3,88	6,04	15,78	32,78	4,17	2,21	18,53
27,03	8,07	1,87	25,02	33,01	4,55	4,67	16,72	29,65	4,92	1,69	19,20
24,09	9,26	1,48	26,06	30,50	5,20	4,21	17,42	26,12	6,00	1,39	20,17
21,70	10,33	1,09	27,09	28,29	5,81	3,76	18,11	23,10	7,01	1,08	21,14
19,31	11,56	0,83	27,95	25,62	6,70	2,85	19,49	20,07	8,16		
16,75	12,92	0,58	29,52	23,15	7,59	1,94	20,88	17,66	9,15		
14,72	14,06	0,33	31,09	21,19	8,32	1,48	21,57	15,29	10,20		
12,74	15,19			18,96	9,28	1,20	22,22	13,34	11,07		
10,34	16,59			17,08	10,12	0,92	22,88	11,30	11,99		
7,71	18,20			15,51	10,86	0,86	23,19	9,18	13,01		
5,62	19,68			13,93	11,63	0,70	23,88	6,98	14,18		
5,12	20,39			12,43	12,36	0,54	24,58	5,49	15,03		
PEG 4000											
46,10	2,27	2,85	18,43	47,22	1,60	13,72	8,56	47,42	1,40	6,73	10,69
43,86	2,83	2,23	19,99	45,72	1,74	12,49	9,07	45,65	1,57	5,46	11,26
41,26	3,13	1,60	21,55	43,75	1,94	11,45	9,47	43,72	1,73	5,15	11,37
37,89	3,59	0,98	23,11	41,93	2,13	10,42	9,91	41,44	2,19	4,86	11,72
33,38	4,35	0,35	24,67	39,17	2,50	9,29	10,38	38,95	2,33	4,56	12,07
28,40	5,69			36,59	2,90	8,14	10,88	36,43	2,63	3,98	12,76
24,66	6,72			34,43	3,24	6,95	11,39	34,12	2,99	3,39	13,46
21,86	7,54			32,52	3,58	5,85	11,89	31,82	3,39	2,80	14,16
19,61	8,32			30,73	3,89	5,05	12,31	28,80	3,91	2,17	15,22
17,52	9,16			29,09	4,22	4,57	12,90	25,82	4,49	1,53	16,27
15,93	9,78			27,08	4,62	3,98	13,49	22,84	5,24	0,90	17,33
14,14	10,58			25,38	5,02	3,01	14,67	20,23	5,87	0,26	18,38
12,38	11,40			23,89	5,36	2,38	15,77	17,77	6,57		
10,72	12,20			22,09	5,86	1,76	16,87	15,81	7,20		
9,16	13,00			20,61	6,24	1,25	17,97	14,03	7,83		
6,90	14,16			19,25	6,65	0,94	18,52	12,54	8,39		
5,03	15,20			17,73	7,11	0,63	19,08	11,12	8,92		
3,94	16,81			16,40	7,57	0,48	20,56	9,83	9,41		
3,40	17,62			15,04	8,07			8,35	10,01		

Continuação da Tabela B1...

<i>PEG 6000</i>											
45,59	2,31	3,60	16,34	47,75	1,38	15,87	7,33	47,72	1,39	4,02	12,36
43,72	2,65	2,95	17,39	47,35	1,63	14,44	7,85	46,19	1,51	3,45	12,76
41,28	2,94	2,29	18,44	45,58	1,73	13,07	8,35	43,95	1,84	2,54	13,93
39,06	3,20	1,64	19,49	43,52	1,97	11,96	8,77	40,48	2,05	2,14	14,71
35,65	3,90	0,98	20,54	41,66	2,18	10,71	9,27	36,73	2,39	1,37	15,50
32,68	4,60			40,71	2,46	9,64	9,74	32,73	3,14	0,92	16,51
30,19	5,14			38,19	2,55	8,28	10,32	28,94	3,86		
26,64	6,01			38,29	2,70	7,20	10,77	25,21	4,55		
23,31	6,95			36,76	2,91	6,03	11,30	22,23	5,19		
20,12	7,95			35,43	3,00	4,98	11,79	19,32	5,91		
17,30	8,88			34,16	3,13	2,95	13,24	16,58	6,79		
14,80	9,89			32,20	3,44	1,94	13,96	14,23	7,43		
12,49	10,93			29,77	3,89	1,80	14,28	12,07	8,19		
10,60	11,82			27,04	4,47	1,67	14,60	10,16	8,93		
8,90	12,68			24,70	5,03	1,40	15,24	8,12	9,71		
6,64	13,78			22,50	5,44	1,16	16,10	6,60	10,32		
5,47	14,40			20,53	5,98	0,92	16,96	5,47	10,80		
5,00	14,88			18,90	6,40	0,45	18,69	5,15	11,19		
4,54	15,37			17,29	6,89			4,82	11,58		

Fonte: Do autor;

^a Incerteza (u): $u(w) = 0,0001$; $u(T) = 0,05$ K; e $u(p) = 5$ kPa.

Tabela B 2: Dados experimentais da curva binodal para o sistema PEG (1) + tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C e pressão atmosférica^a.

pH 5,0				pH 6,0				pH 7,0			
<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>										
PEG 1500											
43,31	2,47	12,44	12,22	45,88	1,80	9,98	12,28	45,90	1,64	13,37	9,18
42,26	2,62	11,82	12,52	44,07	2,23	8,47	13,05	43,79	1,91	11,33	10,03
41,20	2,78	11,52	12,67	40,64	2,61	6,80	13,94	41,68	2,19	9,23	10,93
39,06	3,15	11,21	12,81	37,17	3,16	5,37	14,77	38,11	2,74	6,92	11,99
36,92	3,52	9,57	13,63	36,57	3,19	4,29	15,52	38,09	2,70	5,28	12,80
34,12	4,13	7,93	14,45	32,92	3,89	3,22	16,27	35,62	3,12	4,03	13,53
31,32	4,73	7,22	15,18	30,24	4,57	3,05	16,58	33,14	3,54	3,59	13,79
28,39	5,61	6,51	15,92	29,64	4,66	2,89	16,88	31,33	3,92	3,43	13,98
25,45	6,48	5,81	16,65	26,72	5,45	2,73	17,18	29,12	4,35	3,28	14,17
23,63	7,22	5,10	17,39	24,13	6,27	2,57	17,49	27,11	4,77	3,13	14,37
21,80	7,96	4,24	18,44	20,63	7,48	2,29	18,04	25,10	5,19	2,97	14,56
19,98	8,70	3,38	19,50	20,62	7,49	2,01	18,59	23,40	5,65	2,63	15,05
18,15	9,44	2,51	20,55	17,74	8,61	1,72	19,14	21,71	6,11	2,29	15,55
16,73	10,14	1,65	21,61	13,53	10,52	1,44	19,69	20,02	6,72	1,95	16,04
15,30	10,83			14,50	10,08			18,34	7,32	1,60	16,54
13,87	11,53			12,10	11,23			15,69	8,27		
PEG 4000											
43,78	2,07	7,05	11,53	44,75	1,69	13,90	7,82	46,85	1,31	9,64	8,25
43,33	2,08	5,44	12,22	42,90	2,01	13,71	7,84	45,99	1,38	8,26	8,73
40,24	2,41	4,95	12,82	40,44	2,27	12,23	8,40	43,09	1,63	7,15	9,12
39,80	2,48	4,47	13,42	39,06	2,40	10,83	8,93	42,08	1,61	5,72	9,66
36,47	2,91	3,98	14,02	37,24	2,48	10,78	8,99	39,98	1,91	4,50	10,13
34,87	3,28	3,50	14,62	35,61	2,80	9,60	9,41	38,03	2,06	4,01	10,70
32,97	3,51	2,86	15,56	33,39	3,09	8,43	9,89	37,11	2,17	3,52	11,26
29,53	4,15	2,21	16,51	31,63	3,38	8,06	10,09	33,45	2,60	3,02	11,83
28,82	4,43	1,57	17,45	30,99	3,46	7,44	10,28	31,59	2,93	2,53	12,40
25,38	5,07	0,93	18,39	28,59	3,94	6,13	10,92	30,00	3,18	1,98	13,29
21,62	6,06			26,65	4,29	5,82	10,97	27,33	3,58	1,43	14,17
23,77	5,56			26,09	4,38	5,31	11,42	25,01	4,01	0,88	15,05
20,04	6,60			24,05	4,86	4,81	11,87	22,22	4,64	0,33	15,93
17,25	7,47			22,38	5,24	4,31	12,32	20,04	5,18		
16,86	7,67			21,69	5,43	3,80	12,77	19,52	5,35		
14,42	8,58			19,70	5,94	3,13	13,60	17,78	5,72		
12,89	9,17			19,18	6,05	2,45	14,43	15,92	6,24		
12,13	9,54			17,52	6,62	1,77	15,27	14,08	6,79		
10,40	10,18			16,47	6,88	1,09	16,10	12,59	7,28		
8,67	10,83			15,65	7,21			11,08	7,78		

Continuação da Tabela B2...

<i>PEG 6000</i>											
45,05	1,59	8,65	9,61	47,06	1,19	9,02	8,95	44,92	1,65	3,01	10,54
43,02	1,73	7,02	10,36	42,50	1,88	7,23	9,62	42,90	1,84	2,56	11,05
40,98	1,87	5,79	11,06	38,90	2,41	5,72	10,21	38,93	2,16	1,58	12,06
38,53	2,29	4,55	11,77	35,60	2,77	4,55	10,71	34,84	2,59	1,28	13,08
36,40	2,58	4,03	12,43	32,30	3,12	3,99	10,95	30,33	3,30	1,04	14,09
34,26	2,86	3,51	13,09	29,26	3,73	3,58	11,43	26,49	3,86	0,76	15,28
30,80	3,39	2,99	13,74	26,73	4,03	3,18	11,90	22,69	4,55		
28,43	3,86	2,47	14,40	24,57	4,46	2,77	12,38	18,88	5,36		
26,06	4,32	1,92	15,27	22,60	4,84	2,36	12,85	15,35	6,28		
22,47	5,08	1,37	16,13	20,12	5,46	1,88	13,53	12,32	7,17		
19,48	5,80	0,81	17,00	17,87	6,01	1,40	14,21	9,16	8,23		
16,29	6,73	0,26	17,86	15,57	6,68	0,92	14,89	7,58	8,79		
13,36	7,72			13,16	7,45	0,44	15,57	5,78	9,44		
10,27	8,85			10,94	8,22			4,56	10,03		

Fonte: Do autor.

^a Incerteza (u): $u(w) = 0,0001$; $u(T) = 0,05$ K; e $u(p) = 5$ kPa.

Tabela B 3: Dados experimentais da curva binodal para o sistema formado por PEG (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas e pressão atmosférica^a.

20°C				30°C				40°C			
100w ₁	100w ₂										
PEG 1500											
39,06	4,36	18,57	10,57	40,94	3,95	10,77	13,78	42,15	3,52	18,84	9,84
38,08	4,57	17,84	10,9	39,36	4,19	9,93	14,17	40,41	3,77	18,3	10,05
37,1	4,78	17,11	11,23	37,78	4,44	9,16	14,53	38,98	3,98	17,76	10,26
36,17	4,98	16,42	11,55	35,64	4,85	8,51	14,84	37,91	4,22	16,78	10,64
35,25	5,18	15,73	11,88	34	5,28	7,89	15,16	36,85	4,45	15,88	11
34,64	5,29	15,08	12,17	32,35	5,7	7,53	15,36	35,82	4,7	15,03	11,35
33,66	5,53	14,43	12,48	31,01	6,17	7,22	15,51	34,79	4,94	14,27	11,66
32,94	5,68	13,27	13,04	28,94	6,77	6,96	15,63	33,61	5,26	13,36	12,02
31,78	6,01	12,28	13,52	26,86	7,37	6,67	15,79	32,43	5,58	12,51	12,37
30,59	6,29	11,3	14,01	25,22	7,83	6,39	15,95	31,39	5,87	11,95	12,69
30,14	6,44	10,53	14,39	24,21	8,2	6,13	16,11	30,25	6,17	11,39	13,01
29,18	6,72	9,85	14,72	23,2	8,56	5,9	16,24	29,03	6,5	10,54	13,37
28,22	6,99	9,05	15,18	21,96	9,04	5,68	16,37	27,8	6,83	9,69	13,72
28,17	7,02	8,6	15,41	20,71	9,52	5,45	16,51	26,9	7,12	8,9	14,07
28,12	7,05	8,4	15,51	19,96	9,77	5,29	16,62	25,93	7,4	8,12	14,42
27,16	7,35	7,77	15,85	18,92	10,21	5,29	16,62	25,15	7,64	7,68	14,63
26,2	7,65	7,14	16,2	17,88	10,64	4,84	16,99	24,34	7,89	7,24	14,84
25,06	8,05			16,58	11,26	4,42	17,27	23,61	8,09	6,76	15,09
23,92	8,44			16,26	11,33	4,01	17,59	22,89	8,36	6,28	15,35
22,81	8,86			15,2	11,87	3,55	17,86	22,14	8,58	5,72	15,72
21,69	9,28			14,49	12,11	3,1	18,13	21,41	8,87	5,15	16,09
20,9	9,6			13,75	12,44	2,57	18,53	20,74	9,11	4,67	16,44
20,11	9,92			13,02	12,77	2,04	18,92	20,1	9,35	4,2	16,78
19,34	10,24			11,79	13,32			19,47	9,59		
PEG 4000											
41,85	3,21	9,88	11,38	46,04	1,69	9,19	11,02	43,41	2,99	17,25	7,6
40,53	3,36	9,24	11,67	45,5	1,87	8,65	11,26	42,07	3,12	16,14	7,93
39,2	3,5	8,68	11,92	44,37	2,1	8,17	11,47	40,35	3,35	15,12	8,24
38,02	3,67	8,19	12,12	43,24	2,33	7,8	11,61	39,27	3,45	14,25	8,51
36,7	3,89	7,8	12,31	41,94	2,59	7,44	11,75	40,74	3,24	13,31	8,8
35,17	4,08	7,78	12,3	40,65	2,84	7,1	11,88	38,19	3,55	12,48	9,08
33,88	4,38	7,76	12,29	39,01	3,11	6,77	12,01	37,01	3,7	11,77	9,29
32,17	4,71	7,28	12,53	37,38	3,38	6,48	12,14	38,31	3,54	10,9	9,56
30,98	4,92	6,8	12,77	36,11	3,61	5,81	12,4	38,44	3,53	10,19	9,8
29,65	5,18	6,32	13	34,85	3,85	5,66	12,61	38,68	3,5	9,11	10,2
28,34	5,49	5,85	13,25	34,04	4,08	5,45	12,61	32,06	4,26	8,28	10,5

Continuação da Tabela B3 ...

26,99	5,84	5,23	13,6	33,23	4,31	5,26	12,69	33,94	4,06	7,6	10,75
25,96	6,03	4,75	13,83	32,17	4,54	5,1	12,83	35,82	3,85	7,02	10,97
27,07	5,81	4,34	14,06	31,1	4,76	4,96	12,84	34,86	3,94	6,53	11,17
25,03	6,31	3,99	14,28	29,84	5,01	4,76	12,93	33,89	4,03	6,1	11,33
24,16	6,54	3,65	14,51	28,57	5,25	4,6	13	32,97	4,15	5,66	11,49
23,28	6,77	3,37	14,7	26,5	5,6	4,44	13,07	32,06	4,26	5,25	11,67
22,43	7,01	2,71	15,09	24,54	6,03	4,19	13,22	31,04	4,46	5,26	11,7
21,57	7,24	2,16	15,41	22,6	6,57	3,94	13,38	30,02	4,66	5,06	11,76
20,22	7,63	1,72	15,87	21,03	6,98	3,94	13,38	29,15	4,85	4,77	11,87
18,94	8			19,62	7,35	3,25	13,63	28,28	5,05	4,47	12
17,72	8,42			18,09	7,82	2,77	13,86	27,49	5,21	4,14	12,15
16,59	8,8			16,72	8,25	2,29	14,07	26,7	5,38	3,58	12,49
15,41	9,23			15,23	8,77	2	14,28	25,35	5,7	3,02	12,82
14,51	9,56			13,98	9,21	1,72	14,53	24,22	5,93	2,5	13,19
13,71	9,85			12,87	9,62	1,45	14,83	23,14	6,12	2,09	13,51
12,74	10,24			11,92	9,98			22,12	6,33	1,77	13,86
11,98	10,52			11,13	10,27			21,08	6,6	1,49	14,12
11,27	10,82			10,37	10,56			19,85	6,87	1,29	14,39
10,61	11,1			9,74	10,8			18,53	7,22		
PEG 6000											
43,31	2,8	12,08	9,8	45	2,24	14,54	8,4	44,13	2,61	14,54	7,7
41,93	2,97	11,31	10,08	43,68	2,45	13,87	8,62	42,85	2,68	13,88	7,9
40,56	3,13	9,88	10,58	42,37	2,68	13,22	8,85	41,78	2,78	12,56	8,29
39,19	3,31	8,45	11,09	41,06	2,89	12,63	9,05	40,2	2,96	11,23	8,68
37,81	3,48	7,03	11,67	39,74	3,12	12,14	9,23	39,13	3,13	10,46	8,93
36,36	3,71	5,93	12,1	39,76	3,15	11,64	9,4	38,99	3,13	9,69	9,18
34,91	3,95	4,6	12,68	38,31	3,3	11,18	9,56	38	3,24	8,92	9,43
33,93	4,14	3,46	13,26	36,87	3,45	10,71	9,73	36,85	3,4	8,15	9,68
32,95	4,33	2,73	13,74	35,32	3,75	10,32	9,88	35,92	3,46	7,77	9,81
32,33	4,39	2,2	14,06	33,77	4,04	10	9,98	34,21	3,7	7,39	9,95
31,58	4,53			33,58	4,17	9,66	10,1	32,82	3,93	7,01	10,08
30,79	4,64			32,49	4,29	9,33	10,21	31,61	4,07	6,63	10,21
29,99	4,75			31,39	4,41	9,06	10,31	30,42	4,23	6,37	10,28
28,91	5			30,13	4,72	8,76	10,44	29,25	4,42	6,12	10,34
27,83	5,26			28,91	4,95	8,36	10,57	28,11	4,62	5,74	10,48
26,74	5,52			29,02	4,89	7,96	10,72	27,09	4,78	5,37	10,62
25,66	5,77			29,13	4,82	7,53	10,88	26,1	4,94	5,35	10,69
23,75	6,23			27,04	5,26	7,15	11,03	25,08	5,13	5,12	10,71
22,13	6,67			25,26	5,62	6,82	11,16	23,96	5,33	4,88	10,8
20,74	7,03			23,68	5,97	6,52	11,23	22,89	5,5	4,37	11,1
19,67	7,28			22,26	6,29	6,21	11,35	22,02	5,69	3,78	11,37

Continuação da Tabela B3 ...

18,6	7,58	21,02	6,56	5,85	11,4	21,11	5,85	3,11	11,71
17,58	7,89	19,83	6,87	5,31	11,64	20,39	6,03	2,66	11,95
16,57	8,21	18,7	7,2	4,79	11,82	19,76	6,21		
15,71	8,49	17,76	7,45	4,23	12,04	18,82	6,41		
14,72	8,83	16,89	7,7	3,67	12,26	17,67	6,77		
13,83	9,14	16,04	7,94	3,22	12,47	16,53	7,12		
12,78	9,52	15,24	8,2	2,77	12,68	15,2	7,51		

Fonte: Do autor.

^a Incerteza (u): $u(w) = 0,0001$; $u(T) = 0,05$ K; e $u(p) = 5$ kPa.

Tabela B 4: Dados experimentais da curva binodal para o sistema PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C e pressão atmosférica^a.

PEG 1500				PEG 4000				PEG 6000			
<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>
<i>PEG-Citrato de potássio</i>											
39,68	5,54	9,32	17,97	41,88	4,43	8,58	13,61	43,46	3,56	7,28	12,86
37,19	6,24	8,14	18,60	37,98	4,95	7,62	14,01	39,70	4,04	5,69	13,39
34,70	6,87	6,96	19,23	34,08	5,47	6,71	14,44	36,63	4,48	4,81	13,93
31,33	7,87	5,13	20,03	30,52	6,15	5,83	14,89	33,91	4,89	3,99	14,53
29,31	8,54	4,46	20,92	26,90	7,00	4,95	15,34	30,87	5,47	3,57	15,13
27,40	9,22	3,78	21,82	23,43	7,82	4,11	16,10	27,83	6,03	3,16	15,72
23,83	10,66	3,11	22,52	21,22	8,51	3,56	16,85	25,66	6,55	2,74	16,32
22,11	11,45	2,44	23,23	19,00	9,20	3,12	17,61	23,49	7,06	2,22	17,28
20,39	12,23	1,76	24,67	17,52	9,73	2,65	18,37	20,07	7,97	1,70	18,25
18,69	13,07	1,41	26,53	16,05	10,25	2,05	19,31	17,46	8,78	1,19	19,22
16,96	13,94			14,54	10,90	1,52	20,26	14,96	9,71		
14,21	15,37			13,03	11,54	1,27	21,20	12,73	10,58		
12,95	16,05			11,64	12,23	0,77	22,15	10,23	11,64		
11,69	16,74			10,21	12,91			8,72	12,26		
<i>PEG-Fosfato dipotássico</i>											
47,06	1,69			47,33	1,61			48,15	1,23	12,32	6,76
42,66	2,44			42,26	1,86			46,55	1,45	11,84	6,96
39,29	2,71			39,24	2,13			44,96	1,68	11,55	7,14
36,13	3,15			36,62	2,36			43,63	1,92	11,44	7,02
33,54	3,38			34,29	2,53			41,96	1,95	11,04	7,16
31,03	3,84			32,26	2,71			40,28	1,98	10,68	7,30
28,65	4,40			30,29	3,05			38,60	2,12	10,33	7,38
26,53	5,06			28,53	3,36			36,92	2,27	9,99	7,51
24,91	5,43			26,90	3,70			36,46	2,26	9,69	7,64
22,86	5,94			25,10	4,06			34,06	2,63	9,36	7,84
21,11	6,46			22,93	4,45			32,79	2,82	9,11	7,79
19,50	6,98			20,75	4,94			31,52	2,90	9,00	7,91
17,82	7,60			18,93	5,45			30,19	3,07	8,86	7,87
16,35	8,21			17,46	5,85			29,05	3,17	8,66	7,92
15,19	8,66			15,85	6,30			27,91	3,27	8,42	8,01
14,02	9,08			14,25	6,80			25,95	3,50	8,19	8,09
12,77	9,55			12,95	7,27			25,42	3,68	7,98	8,18
11,57	10,04			11,77	7,61			24,18	3,84	7,77	8,24
10,46	10,49			10,52	8,07			22,70	4,01	7,61	8,38
9,36	10,97			9,43	8,45			21,95	4,19	7,59	8,32
8,58	11,44			8,43	8,87			21,20	4,38	7,40	8,38
7,96	11,73			7,65	9,16			19,94	4,69	7,25	8,42
7,31	12,03			6,95	9,41			19,83	4,77	6,39	8,79
6,59	12,43			6,26	9,59			18,83	4,94	5,52	9,15

Continuação da Tabela B4...

8,36	11,44			5,68	9,81			17,79	5,21	4,69	9,52
6,12	12,55			5,68	9,82			17,78	5,28	3,97	9,83
5,19	13,07			4,08	10,65			16,87	5,41	3,24	10,07
4,31	13,58			3,12	11,15			16,07	5,78	2,62	10,36
3,55	14,12			2,46	11,54			16,03	5,65	2,13	10,64
2,95	14,43			1,98	11,80			15,30	5,86	1,73	10,90
2,31	15,06			1,62	12,18			14,65	6,19	1,44	11,18
1,90	15,43			1,37	12,51			14,62	6,06	1,23	11,32
1,54	15,88			1,17	12,75			14,00	6,20		
1,29	16,25			0,98	13,09			13,46	6,56		
1,08	16,63			0,84	13,32			13,38	6,43		
0,91	17,00							12,81	6,64		

PEG-Tartarato de sódio

42,68	3,37	11,18	13,58	45,29	2,38	14,90	8,80	45,01	2,51	9,15	10,51
41,22	3,64	10,10	14,10	43,31	2,50	13,82	9,22	42,39	2,79	8,02	10,96
39,75	3,90	9,26	14,54	41,30	2,69	12,81	9,61	40,09	3,04	7,06	11,37
37,55	4,30	8,41	14,98	39,13	2,95	11,86	10,01	37,61	3,42	6,13	11,72
35,35	4,70	7,56	15,37	37,21	3,20	11,04	10,37	35,71	3,60	5,29	12,05
33,66	5,12	6,70	15,75	35,44	3,43	10,29	10,68	33,60	4,04	4,23	12,86
31,96	5,53	5,96	16,14	33,83	3,64	9,63	10,94	31,61	4,37	3,21	13,67
30,27	6,02	5,30	16,80	32,44	3,82	8,96	11,23	29,95	4,69	2,04	14,94
28,58	6,51	4,64	17,46	31,25	4,17	8,27	11,53	28,38	4,96	1,25	16,15
26,82	7,03	4,08	18,38	30,13	4,43	7,64	11,82	27,00	5,21	1,04	17,45
25,05	7,56	3,51	19,31	28,83	4,63	7,10	12,06	25,69	5,42	0,77	18,74
23,40	8,18	2,94	20,24	27,77	4,84	6,65	12,26	24,38	5,70		
21,75	8,80	1,81	22,09	26,68	5,12	6,20	12,47	23,11	6,05		
20,67	9,24	1,24	23,01	25,34	5,47	5,75	12,68	21,99	6,34		
19,58	9,67	0,85	24,03	24,19	5,79	5,28	12,92	20,33	6,76		
18,57	10,10	0,47	25,05	22,90	6,13	4,81	13,16	18,90	7,13		
17,56	10,53			21,65	6,52	3,89	13,76	17,37	7,56		
16,26	11,16			20,35	6,95	3,07	14,25	15,52	8,17		
14,95	11,77			19,22	7,33	2,32	14,89	14,11	8,62		
13,61	12,41			18,18	7,66	1,71	15,48	12,56	9,19		
12,26	13,05			17,10	7,96	1,32	15,93	11,24	9,73		

PEG-Tartarato de sódio e potássio

41,55	4,55	15,05	13,20	1	42,45	3,59	10,32	12,15	43,62	3,31	12,73	10,55
38,69	5,05	12,92	14,36	2	39,55	3,94	8,13	13,16	39,27	4,03	10,97	11,23
35,89	5,60	10,88	15,45	3	36,06	4,58	5,92	14,24	37,73	4,30	9,26	11,96
33,40	6,21	8,85	16,60	4	33,68	4,98	4,43	15,02	35,62	4,52	7,72	12,61
30,94	6,85	6,04	18,28	5	30,40	5,76	3,59	16,12	33,11	5,03	6,32	13,23
28,59	7,58	3,79	19,97	6	27,81	6,14	2,85	17,18	30,11	5,60	4,95	13,89
26,23	8,35	3,10	20,62	7	25,34	6,79	1,81	18,87	27,34	6,11	3,93	14,40
24,41	9,06	2,41	22,22	8	22,63	7,47	0,83	20,70	23,89	7,07	3,22	15,33
22,59	9,66	1,82	23,60	9	19,27	8,55			21,22	7,62	2,38	16,51

Continuação da Tabela B4...

21,26	10,29	1,24	24,97	10	16,62	9,49	19,23	8,22	1,53	17,69
19,92	10,87	0,91	26,11	11	14,25	10,44	17,26	8,85	0,98	18,88
17,80	11,79	0,58	27,25	12	12,45	11,20	14,71	9,77	0,42	20,07

Fonte: Do autor.

^a Incerteza (u): $u(w) = 0,0001$; $u(T) = 0,05$ K; e $u(p) = 5$ kPa.

Tabela B 5: Dados experimentais da curva binodal para o sistema [bmim]BF₄ (1) + sal (2) + água (3) em diferentes temperaturas e pressão atmosférica^a.

20°C				30°C				40°C			
<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>	<i>100w₁</i>	<i>100w₂</i>
<i>Acetato de sódio</i>											
70,13	0,59	37,70	2,13	72,11	1,13	37,93	3,72	69,56	1,58	25,00	8,52
63,44	0,82	34,90	2,32	67,30	1,26	36,15	3,83	62,68	2,24	22,37	9,63
58,48	1,05	31,49	2,67	65,87	1,43	32,55	4,31	59,44	2,54	18,90	11,94
56,03	1,28	28,55	3,05	60,63	1,61	28,94	4,94	57,37	2,73		
52,47	1,31	25,83	3,60	56,49	2,18	25,88	5,69	52,32	3,34		
50,88	1,40	23,34	4,25	56,17	2,00	25,60	6,13	49,39	3,76		
49,29	1,46	20,22	5,50	52,46	2,31	23,19	6,58	41,78	4,81		
47,07	1,50	16,59	7,73	48,83	2,67	20,63	7,70	39,77	5,11		
44,80	1,65			48,10	2,57	18,11	9,22	35,73	5,84		
43,09	1,78			45,44	3,00	15,57	12,00	30,41	6,86		
41,02	1,89			41,37	3,25	15,47	11,45	28,34	7,36		
<i>cittrato de sódio</i>											
73,08	0,28	21,44	4,66	68,59	0,63	51,71	1,70	72,46	1,14	23,21	7,22
66,57	0,59	19,40	5,51	67,98	0,67	47,44	2,04	63,78	1,74	22,25	7,54
60,15	0,74	17,93	6,24	66,81	0,72	42,91	2,44	57,54	1,88	21,07	7,95
55,05	0,95	16,55	7,07	62,58	0,95	38,78	2,82	51,43	2,45	20,81	7,93
50,80	1,14	15,05	8,14	60,96	1,01	35,42	3,21	46,39	3,01	19,87	8,41
47,42	1,29			59,33	1,13	32,72	3,54	41,76	3,66	17,67	9,36
44,21	1,44			57,55	1,21	30,49	3,87	38,12	4,16	16,30	10,57
41,31	1,65			56,74	1,26	28,32	4,23	36,01	4,47	14,40	10,92
38,76	1,83			55,46	1,36	26,37	4,59	33,99	4,80	12,50	11,88
35,73	2,05			54,56	1,41	23,83	5,23	32,14	5,08	11,31	12,71
33,07	2,32			54,08	1,45	21,59	5,90	30,57	5,35	10,15	13,62
30,65	2,64			53,32	1,49	19,39	6,76	28,98	5,69		
28,66	2,86			52,68	1,53	18,33	7,23	27,48	6,03		
25,96	3,38			52,19	1,57	16,33	8,31	26,05	6,37		
23,54	4,02			51,39	1,64	15,25	8,97	24,70	6,76		
<i>Tartarato de sódio</i>											
67,11	0,88	23,11	4,67	66,59	1,10	31,47	4,47	71,54	0,95	27,17	7,10
60,68	0,94	20,80	5,48	64,88	1,20	28,87	4,96	66,14	1,23	24,40	8,01
55,15	1,11	19,46	6,14	60,98	1,46	26,64	5,45	61,04	1,70	22,04	8,98
49,73	1,41	18,63	6,54	57,11	1,71	24,10	6,45	55,72	2,22	18,86	10,70
45,45	1,71	17,70	7,06	52,80	2,03	49,95	2,19	52,00	2,69		
41,55	1,99	17,07	7,43	48,11	2,49	41,86	3,05	47,30	3,35		
38,30	2,20	16,42	7,88	45,64	2,74	36,06	3,80	43,63	3,90		
35,52	2,48			43,49	2,97	31,46	4,48	40,35	4,42		
32,95	2,72			41,38	3,21	26,23	5,58	37,48	4,84		

Continuação da Tabela B5 ...

30,80	2,99	39,38	3,43	22,31	6,84	35,12	5,27
28,62	3,32	37,67	3,63	18,71	8,52	32,93	5,69
26,70	3,70	36,05	3,82	16,48	9,54	31,00	6,09
24,98	4,12	33,84	4,12			29,03	6,59

Fonte: Do autor.

^a Incerteza (u): $u(w) = 0,0001$; $u(T) = 0,05$ K; e $u(p) = 5$ kPa.

APÊNDICE C- Parâmetros da equação de Merchuk *et al.* (1998)

Tabela C 1: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para o sistema PEG (1) + tampão citrato de sódio (2) + água (3) a 30°C

<i>pH</i>	<i>A</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>B</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>C</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>R²</i>	<i>sd^a</i>
PEG 1500											
5,0	0,8816	(0,8488	0,9143)	-3,9109	(-4,0818	-3,7399)	123,7214	(112,8029	134,6399)	0,9996	0,0025
6,0	0,8920	(0,8720	0,9121)	-4,5504	(-4,6702	-4,4307)	209,9376	(197,1185	222,7568)	0,9998	0,0023
7,0	0,9304	(0,8928	0,9680)	-4,9573	(-5,1836	-4,7311)	236,9550	(206,9039	267,0062)	0,9952	0,0033
PEG 4000											
5,0	1,0360	(0,9644	1,1075)	-5,2285	(-5,6018	-4,8552)	262,1562	(210,9153	313,3971)	0,9988	0,0044
6,0	0,9720	(0,9562	0,9879)	-5,6990	(-5,8008	-5,5973)	476,2542	(453,8898	498,6186)	0,9998	0,0017
7,0	0,9509	(0,9098	0,9921)	-5,8163	(-6,1032	-5,5294)	606,6204	(534,3255	678,9153)	0,9996	0,0038
PEG 6000											
5,0	0,9925	(0,9504	1,0346)	-5,0708	(-5,3073	-4,8344)	329,3059	(282,2826	376,3293)	0,9995	0,0025
6,0	0,9658	(0,9129	1,0187)	-5,6785	(-6,0431	-5,3139)	617,0354	(529,7317	704,3390)	0,9986	0,0056
7,0	0,9781	(0,9108	1,0453)	-6,0669	(-6,5441	-5,5897)	681,4526	(463,8145	899,0907)	0,9983	0,0044

Fonte: Do autor.

^a *sd* representa a incerteza padrão (Eq. 3.2); ^b intervalo de confiança de 95%.

Tabela C 2: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para os sistemas formados por PEG (1) +tampão fosfato de potássio (2) + água (3) a 30°C.

<i>pH</i>	<i>A</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>B</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>C</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>R²</i>	<i>sd^a</i>
PEG 1500											
6,0	0,9196	(0,8937	0,9456)	-4,8016	(-4,9520	-4,6512)	182,8368	(165,8210	199,8526)	0,9996	0,0023
7,0	0,9193	(0,8815	0,9571)	-5,0699	(-5,2987	-4,8410)	255,6941	(224,6915	286,6967)	0,9991	0,0039
8,0	0,9224	(0,8943	0,9505)	-5,3587	(-5,5379	-5,1795)	434,9703	(399,0691	470,8715)	0,9994	0,0367
PEG 4000											
6,0	1,0002	(0,9608	1,0396)	-5,7917	(-6,0229	-5,5605)	417,2964	(369,7396	464,8533)	0,9993	0,0031
7,0	1,0636	(1,0058	1,1214)	-6,4956	(-6,8442	-6,1470)	476,8985	(328,3021	625,4948)	0,9986	0,0033
8,0	0,9811	(0,9516	1,0106)	-6,5001	(-6,7094	-6,2908)	841,2456	(759,4299	923,0613)	0,9994	0,0033
PEG 6000											
6,0	0,9668	(0,9317	1,0020)	-6,0917	(-6,3256	-5,8578)	605,8353	(542,3131	669,3575)	0,9995	0,003
7,0	0,9053	(0,8366	0,9739)	-5,6574	(-6,1372	-5,1776)	937,2794	(788,7417	1085,8170)	0,9970	0,0063
8,0	1,1047	(1,0528	1,1566)	-6,9877	(-7,2980	-6,6773)	929,6769	(821,7573	1037,5965)	0,9996	0,0028

Fonte: Do autor.

^a *sd* representa a incerteza padrão (Eq. 3.2); ^b intervalo de confiança de 95%.

Tabela C 3: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para os sistemas formados por PEG (1) + tiossulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.

<i>T/ °C</i>	<i>A (I.C. 95%)^b</i>	<i>B (I.C. 95%)^b</i>	<i>C (I.C. 95%)^b</i>	<i>R²</i>	<i>sd^a</i>
PEG 1500					
20	1,0786 (1,0445, 1,1126)	-4,8246(-4,9604, -4,6887)	167,4698 (158,5552, 176,3843)	0,9996	0,0019
30	0,9325 (0,8852, 0,9799)	-4,1830 (-4,4026, -3,9634)	245,7538 (232,7616, 258,7460)	0,9989	0,0038
40	0,9595 (0,9351, 0,9840)	-4,4024 (-4,5175, -4,2872)	264,1662 (254,8999, 273,4324)	0,9996	0,0021
PEG 4000					
20	1,1407 (1,0937, 1,1878)	-5,6245 (-5,8243, -5,4248)	393,6823 (372,8304, 414,5341)	0,9993	0,0031
30	0,8233 (0,7951, 0,8517)	-4,2188 (-4,4120, -4,0256)	623,3137 (593,8675, 652,7599)	0,9988	0,0049
40	1,3505 (1,2661, 1,4350)	-6,5819 (-6,9075, -6,2562)	603,2373 (555,3699, 651,1046)	0,9988	0,0048
PEG 6000					
20	1,1370 (1,0780, 1,1952)	-5,7664 (-6,0318, -5,5009)	514,4199 (473,3316, 555,5082)	0,9991	0,0037
30	1,0219 (0,9805, 1,0633)	-5,3086 (-5,5282, -5,0890)	692,4398 (655,5115, 729,3680)	0,999	0,004
40	1,3902 (1,3254, 1,4549)	-7,0865 (-7,3414, -6,8316)	736,0536 (687,0734, 785,0338)	0,9992	0,0037

Fonte: Do autor.

^a *sd* representa a incerteza padrão (Eq. 3.2); ^b intervalo de confiança de 95%.

Tabela C 4: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para os sistemas formados por PEG (1) + sal (2) + água (3) a 30°C.

<i>PEG</i>	<i>A</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>B</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>C</i>	<i>(I.C. 95%)^b</i>		<i>R²</i>	<i>sd^a</i>
<i>PEG-Tartarato de sódio</i>											
1500	1,0262	(0,9781	1,0744)	-4,7737	(-4,9908	-4,5565)	197,0983	(180,1184	214,0782)	0,9992	0,0034
4000	1,1146	(1,052	1,1772)	-6,03	(-6,3292	-5,7309)	379,9518	(339,311	420,5927)	0,9982	0,005
6000	1,2334	(1,1868	1,2801)	-6,3387	(-6,5405	-6,1369)	498,2675	(462,6684	533,8667)	0,9995	0,0026
<i>PEG-Tartarato de sódio e potássio</i>											
1500	1,1542	(1,0148	1,2935)	-4,7962	(-5,2967	-4,2957)	140,9091	(116,0578	165,7604)	0,9986	0,0044
4000	1,3363	(1,2296	1,4430)	-6,0141	(-6,3938	-5,6344)	278,4856	(240,4975	316,4736)	0,9993	0,0031
6000	1,3099	(1,2112	1,4086)	-5,9292	(-6,2950	-5,5634)	372,5174	(332,0989	412,9359)	0,9993	0,0033
<i>PEG-Citrato de potássio</i>											
1500	0,9836	(0,8367	1,1306)	-3,6945	(-4,255	-3,1339)	113,1124	(94,2144	132,0105)	0,9976	0,0053
4000	1,7967	(1,5170	2,0764)	-6,7004	(-7,371	-6,0291)	173,6023	(130,0468	217,1579)	0,9984	0,0046
6000	1,511	(1,3526	1,6694)	-6,3714	(-6,8601	-5,8827)	272,2645	(226,9529	317,5761)	0,9989	0,004
<i>PEG-Fosfato dipotássico</i>											
1500	0,9771	(0,9249	1,0293)	-5,5533	(-5,8480	-5,2586)	404,7846	(363,0209	446,5483)	0,9981	0,0056
4000	1,1365	(1,0471	1,2260)	-7,2554	(-7,7456	-6,7651)	736,4817	(612,9336	860,0298)	0,9971	0,0072
6000	1,1818	(1,1218	1,2419)	-7,6421	(-7,9759	-7,3083)	965,1673	(845,6330	1084,7016)	0,9966	0,0073

Fonte: Do autor.

^a *sd* representa a incerteza padrão (Eq. 3.2); ^b intervalo de confiança de 95%.

Tabela C 5: Parâmetros da equação de Merchuk (Eq. 3.1) para o sistema [bmim]BF₄ (1) + sal (2) + água (3).

<i>T</i> / °C	<i>A</i>	<i>(I.C. 95%)^a</i>		<i>B</i>	<i>(I.C. 95%)^a</i>		<i>C</i>	<i>(I.C. 95%)^a</i>		<i>R</i> ²	<i>Sd</i>
Acetato de sódio											
20	1,4892	(1,3705	1,6079)	-9,3302	(-10,0111	-8,6493)	-865,8243	(-1389,1687	-342,48)	0,9906	0,0097
30	1,6347	(1,5319	1,7376)	-7,6352	(-8,0626	-7,2078)	-145,353	(-250,2479	-40,4581)	0,9948	0,0089
40	1,4746	(1,3453	1,6039)	-5,7587	(-6,2816	-5,2357)	90,1917	(-21,9153	202,2987)	0,9956	0,0087
Citrato de sódio											
20	1,1898	(1,1242	1,2553)	-8,2281	(-8,7387	-7,7175)	-555,4067	(-947,5501	-163,2632)	0,9929	0,0092
30	1,2014	(1,1595	1,2432)	-6,7263	(-7,023	-6,4296)	187,5841	(12,129	363,0391)	0,9967	0,0074
40	1,5156	(1,4595	1,5717)	-6,8332	(-7,0562	-6,6102)	74,2211	(28,0357	120,4066)	0,9980	0,0054
Tartarato de sódio											
20	1,5246	(1,4207	1,6285)	-9,3142	(-9,8543	-8,7741)	-902,4176	(-1198,6836	-606,1516)	0,9951	0,0085
30	1,3985	(1,3446	1,4524)	-6,9089	(-7,169	-6,6488)	44,7145	(-70,6925	160,1215)	0,9973	0,0076
40	1,1872	(1,1333	1,2411)	-5,1287	(-5,4313	-4,826)	202,4081	(99,3958	305,4203)	0,9970	0,0072

Fonte: Do autor.

^a *sd* representa a incerteza padrão (Eq. 3.2); ^b intervalo de confiança de 95%.

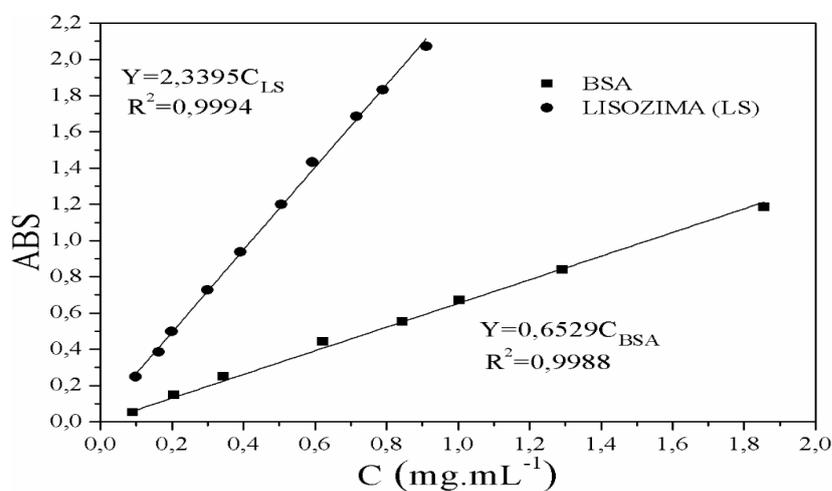
APÊNDICE D – Curvas de calibração

Tabela D1- Dados obtidos para a curva de calibração da BSA a 280 nm

C (mg/ml)	Absorbâncias (ABS)			MÉDIA
	ABS1	ABS2	ABS3	
Albumina de soro bovino (BSA)				
0,090	0,0531	0,0505	0,0541	0,0526
0,206	0,1471	0,1465	0,1477	0,1471
0,344	0,2516	0,2493	0,2487	0,2499
0,622	0,4401	0,4459	0,4424	0,4428
0,844	0,5520	0,5560	0,5547	0,5542
1,005	0,6743	0,6713	0,6748	0,6735
1,291	0,8330	0,8442	0,8442	0,8405
1,856	1,1804	1,1890	1,1851	1,1848
Lisozima (LS)				
0,099	0,248	0,2487	0,2484	0,2483
0,163	0,385	0,3862	0,3841	0,3849
0,199	0,499	0,5005	0,4984	0,4992
0,299	0,726	0,7273	0,7264	0,7267
0,392	0,938	0,9324	0,9387	0,9362
0,505	1,198	1,1989	1,1989	1,1985
0,593	1,432	1,432	1,4341	1,4327
0,716	1,685	1,6854	1,6854	1,6854
0,789	1,83	1,8276	1,8332	1,8303
0,911	2,073	2,0719	2,0687	2,071

Fonte: Do autor.

Figura D 1: Curvas de absorção a 280 nm de solução de BSA ou lisozima em água.



Fonte: Do autor.

APÊNDICE E – Cálculo das incertezas do ELL

INCOGNITAS: $w_1^I, w_1^{II}, w_2^I, w_2^{II}$; I (fase superior); II (Fase inferior).

A, B, C, D, E, F, G são definidos como incertezas associadas.

$$w_1^I = A * \exp \left[B(w_2^I)^{0,5} - C(w_2^I)^3 \right] \quad (\text{E1})$$

$$w_1^{II} = A * \exp \left[B(w_2^{II})^{0,5} - C(w_2^{II})^3 \right] \quad (\text{E2})$$

$$w_1^I = G + Hw_1^{II} \quad (\text{E3})$$

$$w_2^I = I + Hw_2^{II} \quad (\text{E4})$$

Equação (E3) e Equação (E4) em Equação (E1) = Equação (E5)

$$(w_1^{II}) = \frac{-G}{H} + \frac{A}{H} \exp \left[B(I + Hw_2^{II})^{0,5} - C(I + Hw_2^{II})^3 \right] \quad (\text{E5})$$

Equação (E5) - Equação (E2) = $f(w_2^{II}) = 0$

$$f(w_2^{II}) = \frac{-G}{H} + \frac{A}{H} \exp \left[B(I + Hw_2^{II})^{0,5} - C(I + Hw_2^{II})^3 \right] - A * \exp \left[B(w_2^{II})^{0,5} - C(w_2^{II})^3 \right] = 0 \quad (\text{E6})$$

$$w_2^{II} = f(A, B, C, G, H, I)$$

EQUAÇÃO GERAL DA PROPAGAÇÃO DE ERROS:

$$\sigma^2 Y = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial k_i} \right)^2 \sigma^2 k_i; \text{ em que } k = A, B, C, G, H, I \quad (\text{E7})$$

Então, tendo os valores das seis derivadas, $\frac{\partial w_2^{II}}{\partial k}$; $k = A, B, C, G, H, I$, calcula-se:

$$(\sigma w_2^{II})^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial w_2^{II}}{\partial k} \right)^2 (\sigma k)^2 \quad (\text{E7})$$

Com o valor de w_2^{II} da Equação E6, encontra-se o valor de w_2^I usando a Equação E4.

$$w_2^I = I + Hw_2^{II}$$

$$(\sigma w_2^I)^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial w_2^I}{\partial k} \right)^2 (\sigma k)^2; \text{ em que } k = A, B, C, G, H, I \quad (\text{E8})$$

Com os valores de w_2^I da Equação E4, encontra-se o valor de w_1^I , usando a Equação E1

$$w_1^I = A * \exp \left[B(w_2^I)^{0,5} - C(w_2^I)^3 \right]$$

$$(\sigma w_1^I)^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial w_1^I}{\partial k_i} \right)^2 (\sigma k_i)^2; \text{ em que } k_i = A, B, C, G, H, I \quad (\text{E9})$$

Com os valores de w_1^I da Equação E1, encontra-se o valor de w_1^{II} , usando a Equação E3

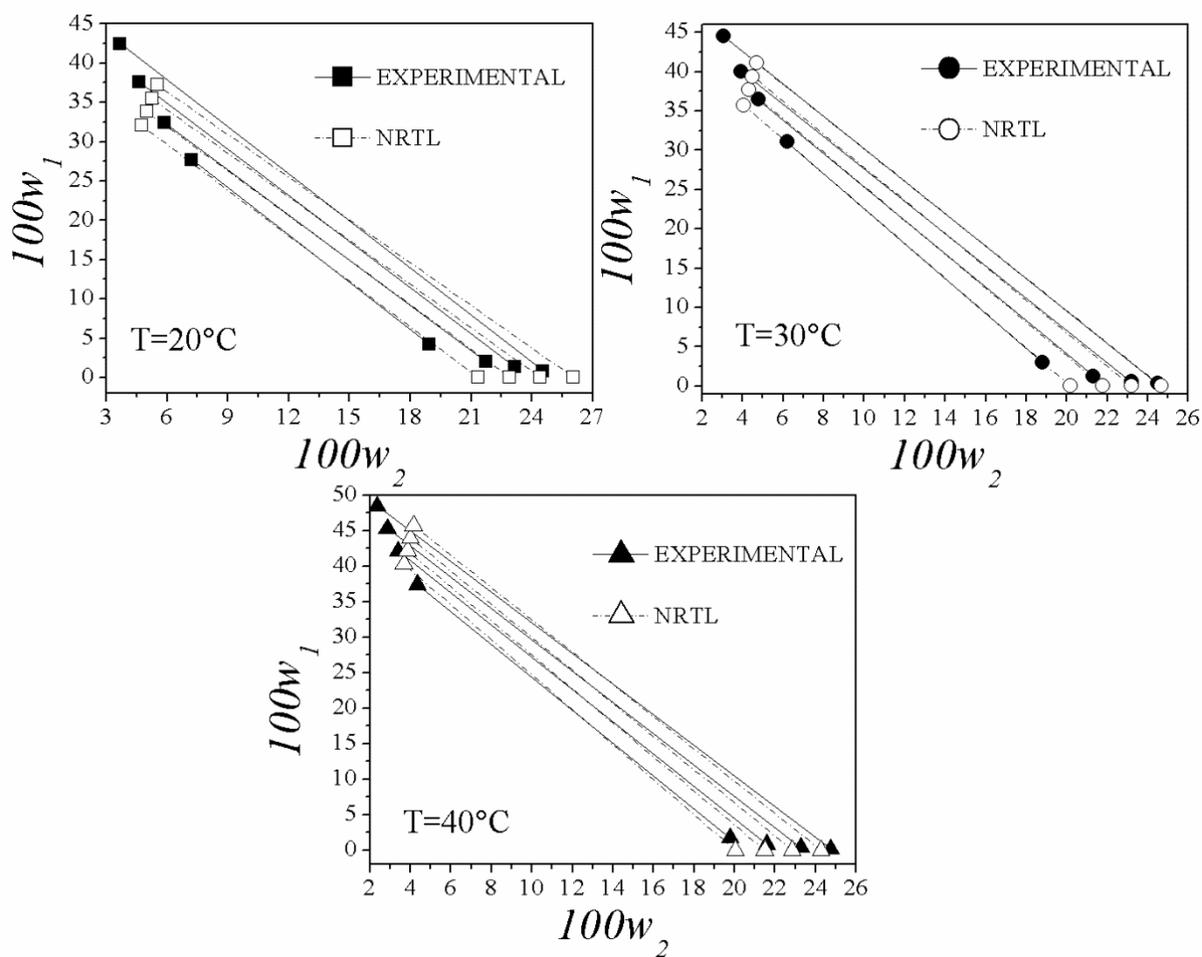
$$w_1^I = G + Hw_1^{II}$$

$$w_1^{II} = \frac{w_1^I - G}{H}$$

$$(\sigma w_1^{II})^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial w_1^{II}}{\partial k_i} \right)^2 (\sigma k_i)^2; \text{ em que } k = A, B, C, G, H, I \quad (\text{E10})$$

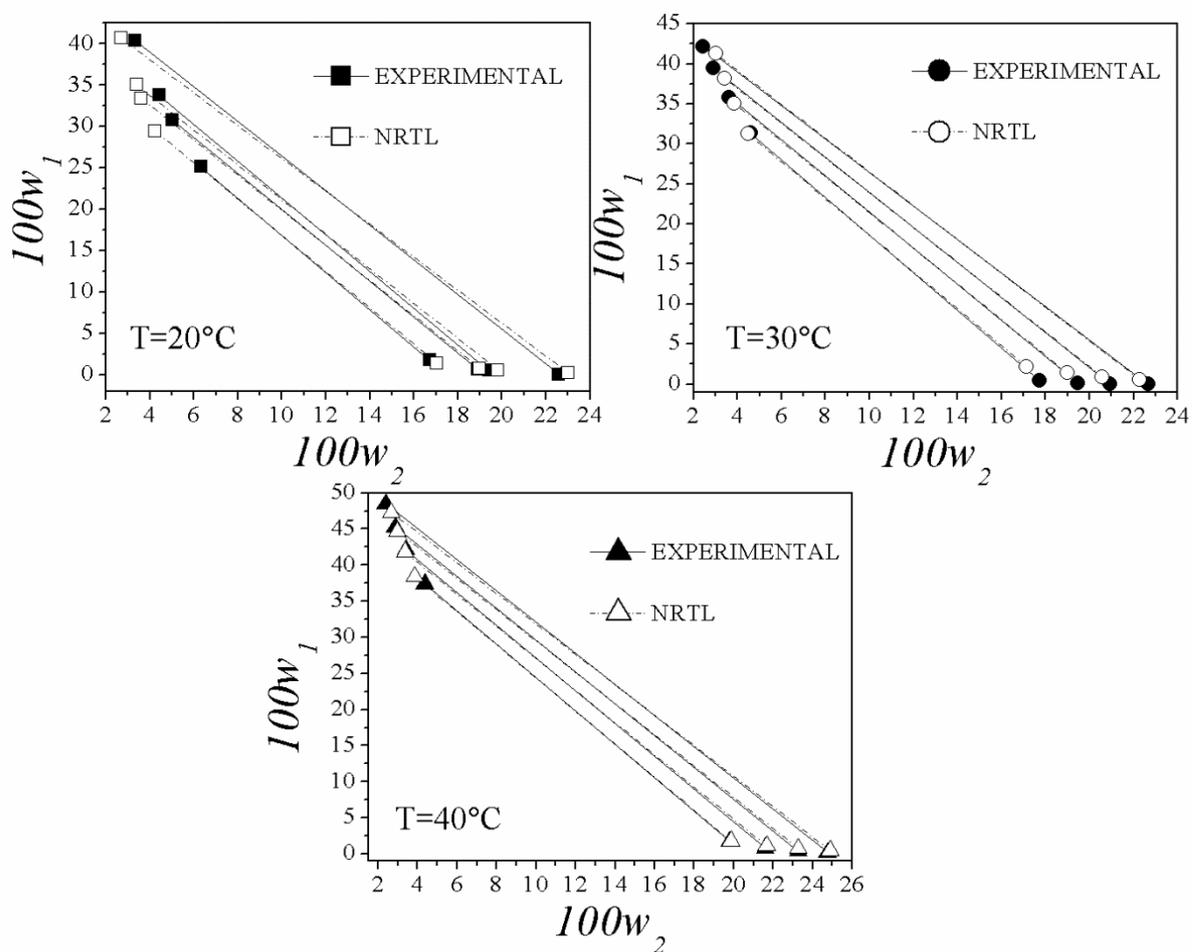
APÊNDICE F – Tie lines experimentais e calculadas

Figura F 1: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG 1500 (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.



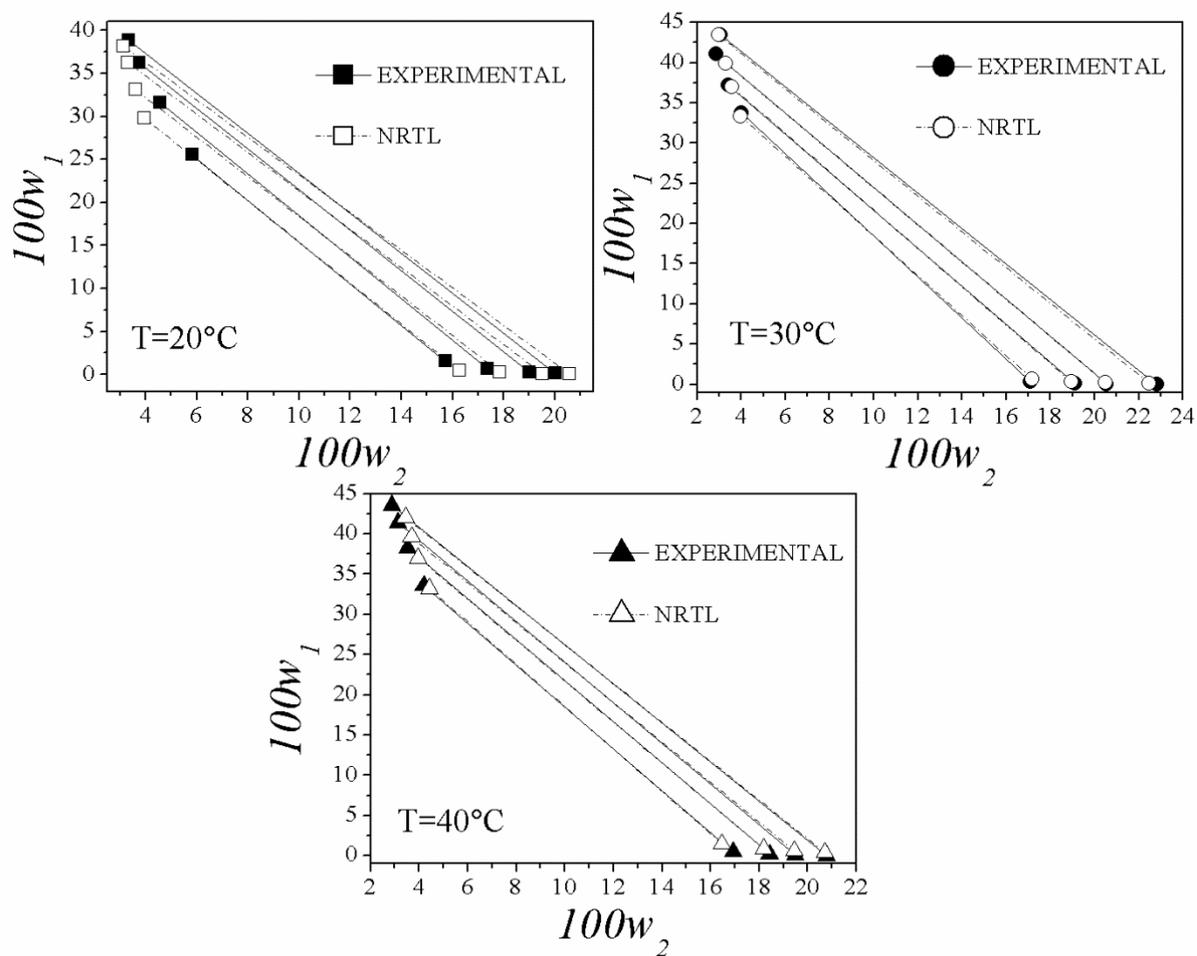
Fonte: Do autor.

Figura F 2: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG 4000 (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.



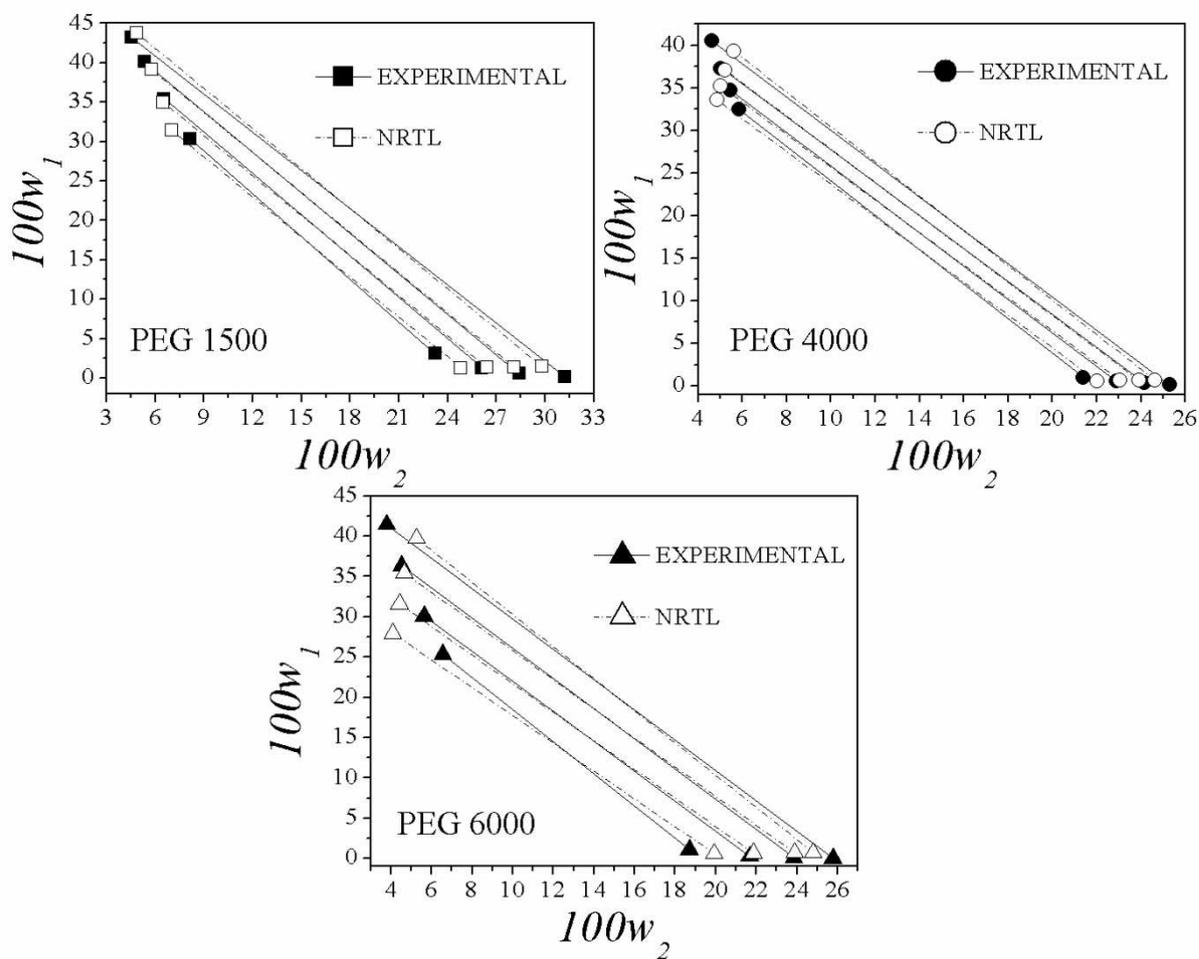
Fonte: Do autor.

Figura F 3: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG 6000 (1) + tiosulfato de sódio (2) + água (3) em diferentes temperaturas.



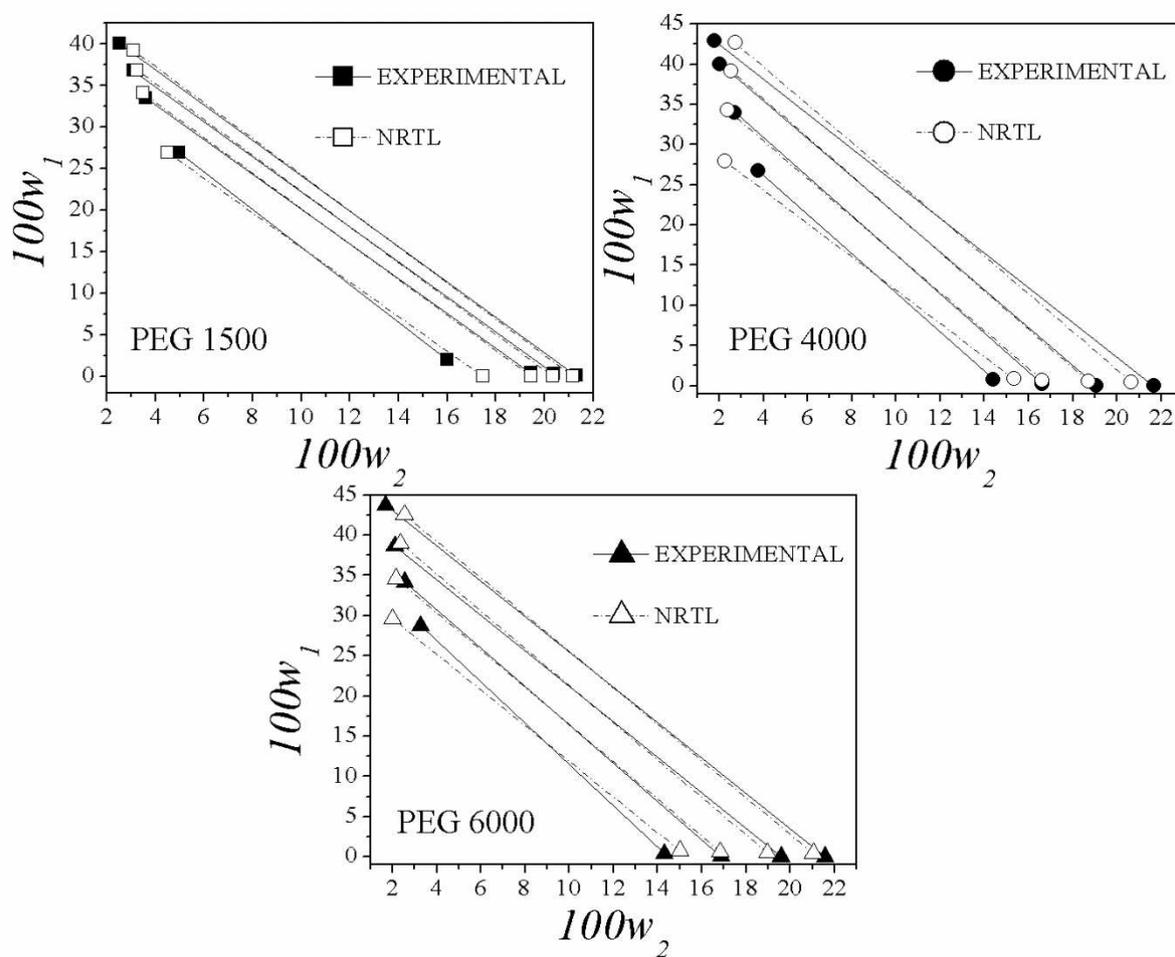
Fonte: Do autor.

Figura F 4: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG (1) + citrato de potássio (2) + água (3) a 30°C.



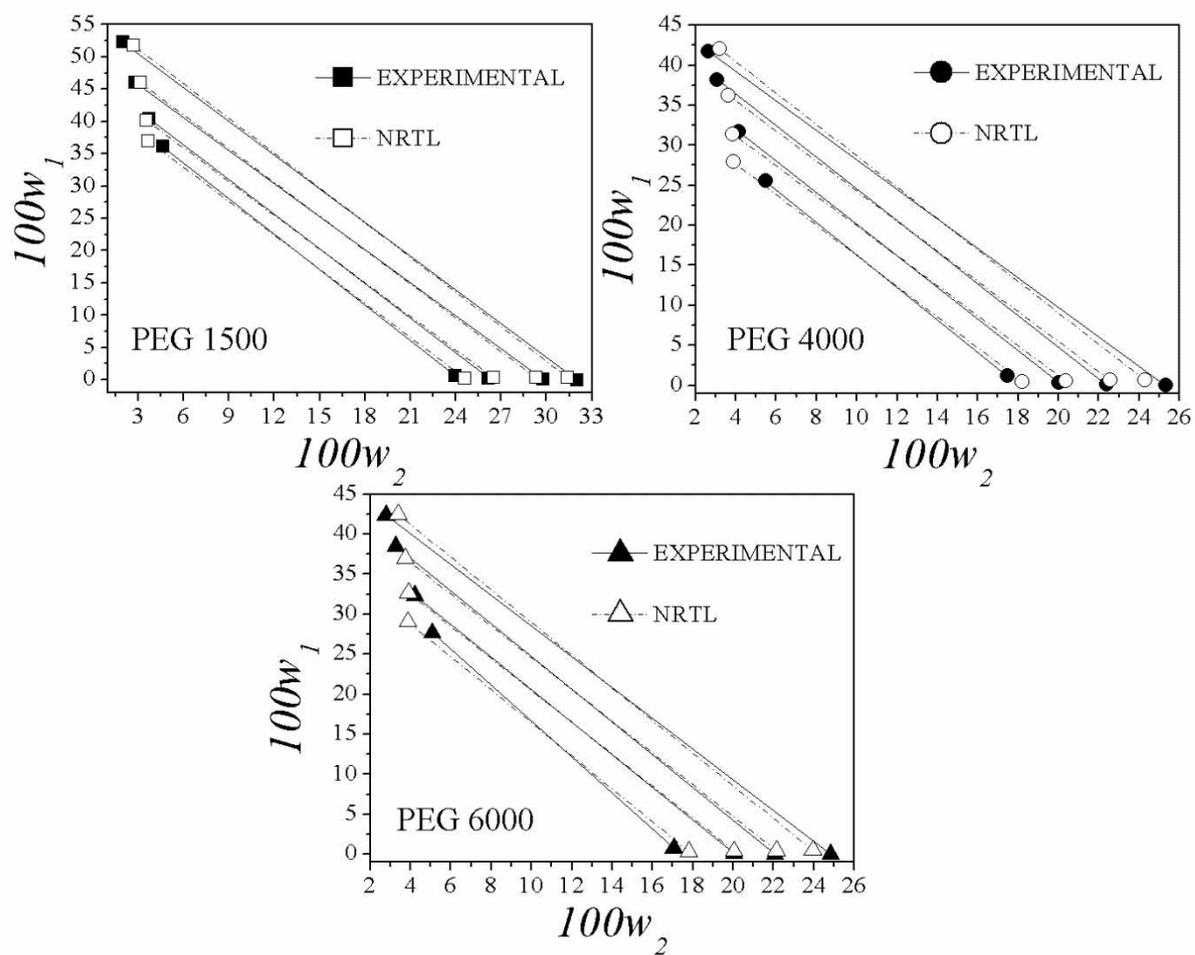
Fonte: Do autor.

Figura F 5: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG (1) + fosfato dipotássico (2) + água (3) a 30°C.



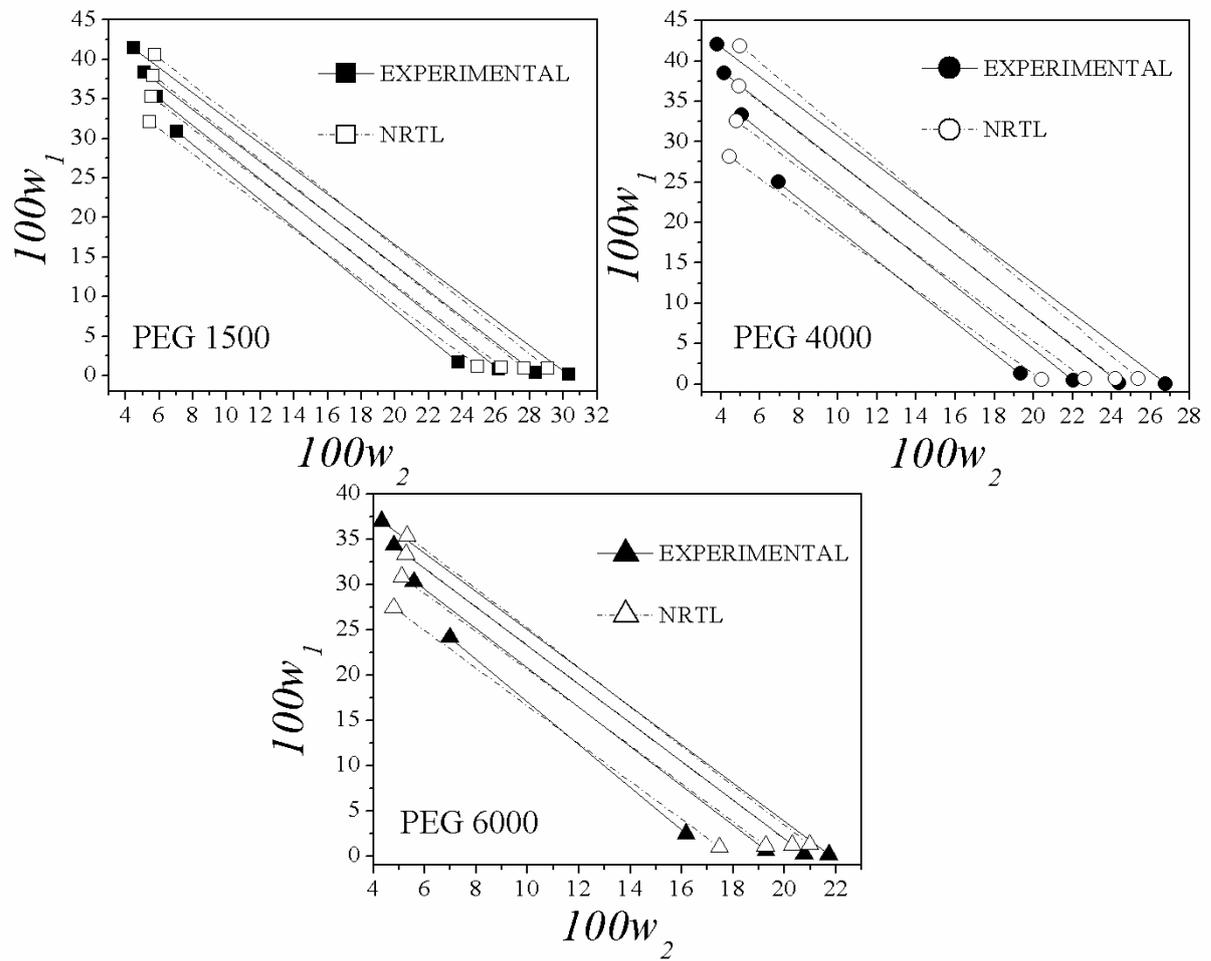
Fonte: Do autor.

Figura F 6: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG (1) + tartarato de sódio (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.

Figura F 7: Diagrama de fases experimental e calculado para o sistema: PEG (1) + tartarato de sódio e potássio (2) + água (3) a 30°C.



Fonte: Do autor.