

LILIAN BOZZI ZEFERINO

**DESENVOLVIMENTO DE DIAGRAMAS BIFÁSICOS DE
SISTEMAS CONSTITUÍDOS POR COPOLÍMEROS-SAIS E
LÍQUIDO IÔNICO-SAIS PARA APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO
DE PROTEÍNAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Z43d
2013 Zeferino, Lilian Bozzi, 1987-
Desenvolvimento de diagramas bifásicos de sistemas
constituídos por copolímeros-sais de líquido iônico-sais para
aplicação na partição de proteínas / Lilian Bozzi Zeferino. –
Viçosa, MG, 2013.

xii, 38 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luis Antonio Minim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Sistemas aquosos bifásicos. 2. Separação (Tecnologia).
3. Soro de leite. 4. Partição de fases. 5. Equilíbrio
líquido-líquido. 6. Leite - Proteínas. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22. ed. 660.2842

LILIAN BOZZI ZEFERINO

**DESENVOLVIMENTO DE DIAGRAMAS BIFÁSICOS DE
SISTEMAS CONSTITUÍDOS POR COPOLÍMEROS-SAIS E
LÍQUIDO IÔNICO-SAIS PARA APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO
DE PROTEÍNAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2013

Monique Renon Eller

Ana Clarissa S. Pires

Wilmer Edgard Luera Peña

Kelany Santiago do Nascimento
(Coorientadora)

Luis Antonio Minim
(Orientador)

À Deus, pelo dom da vida e bênçãos concedidas. À minha mãe e ao meu padrasto, Maria Aparecida e Reginaldo, às minhas irmãs, Leiliane e Liliane, pelo amor incondicional, incentivo e por me fortalecerem nos momentos difíceis. Aos meus familiares, pelo companheirismo, motivação e orações.

Dedico.

"O verdadeiro conhecimento, como qualquer outra coisa de valor, não é para ser obtido facilmente. Deve-se trabalhar por ele, estudar por ele, e mais que tudo, orar por ele."

Thomas Arnold

AGRADECIMENTOS

À Deus, o centro da minha vida, por ter me sustentado em Suas mãos para que eu superasse as adversidades e provações.

À minha mãe e ao meu padrasto, Maria Aparecida e Reginaldo, que me ensinaram: “Para ser grande é preciso ser perseverante e forte”. Em especial à minha mãe pela inteira dedicação e por muitas vezes ter deixado de lado seus sonhos para acreditar nos meus.

Às minhas irmãs, Leiliane e Liliane, pelo amor, carinho e companheirismo.

Aos meus familiares pelas valiosas orações e apoio em todos os momentos.

Às minhas irmãs da República Bico Fino, Ana Laís, Bárbara, Fernanda, Larissa, Luane, Marcella e Verônica pelo convívio, amizade, compreensão e companheirismo. Sem vocês meus dias em Viçosa não teriam a mesma alegria.

Aos meus amigos da época de graduação, Alan, Gisela, Gabriela, Renato, Schalana, Vinícius, pela amizade verdadeira e incentivo.

Aos meus amigos Renée Tavares Gattegno e Ricardo Domingues pela amizade e apoio constante.

Às minhas amigas Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo e Vanessa Santos Sampaio pelo companheirismo, ombro amigo, apoio e compartilhamento de conhecimento.

Ao meu companheiro de laboratório e amigo, Lucas Rocha, pela amizade, dedicação, apoio e incontáveis momentos de ajuda para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do LADESP pela ajuda na realização deste trabalho, pelo incentivo e momentos de descontração.

Ao professor Luis Antonio Minim, pela orientação e atenção durante a realização deste trabalho.

À coorientadora Kelany Santiago do Nascimento pela atenção, valiosas sugestões, motivação e essencial colaboração no trabalho.

À coorientadora Valéria Paula Rodrigues Minim pela gentileza, pela simpatia e contribuições para a realização deste trabalho.

Aos professores Ana Clarissa S. Pires, Monique Renon Eller e Wilmer Edgard Luera Peña que gentilmente aceitaram o convite de participar como membros da banca que avaliou este trabalho.

Aos professores Luis Henrique Mendes da Silva e Maria do Carmo Hespanhol da Silva pela colaboração na realização das análises disponibilizando equipamentos.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

À Universidade Federal de Viçosa.

Ao Cnpq pela concessão da bolsa.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e me apoiaram durante esses dois anos.

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Lílian Bozzi Zeferino, filha de Maria Aparecida Bozzi e Josué Antônio Zeferino, nasceu em Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo, no dia 30 de setembro de 1987.

Em agosto de 2006, iniciou o curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Espírito Santo, colando grau em julho de 2011. No mês seguinte ingressou no curso de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nível mestrado, na Universidade Federal de Viçosa. Em julho de 2013 submeteu-se a defesa de dissertação.

RESUMO

ZEFERINO, Lilian Bozzi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Desenvolvimento de diagramas bifásicos de sistemas constituídos por copolímeros-sais e líquido iônico-sais para aplicação na partição de proteínas.** Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadores: Kelany Santiago do Nascimento e Valéria Paula Rodrigues Minim.

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) têm sido utilizados com grande sucesso em processos de separação, concentração e purificação de moléculas bioativas, uma vez que são uma variante da extração líquido-líquido convencional, que favorecem a estabilidade de biomoléculas. Sendo a água o componente presente em maior quantidade em ambas as fases, estes sistemas fornecem um ambiente ameno para as biomoléculas preservando, assim, a sua estabilidade molecular e evitando perdas das atividades biológicas. Assim sendo, neste trabalho obteve-se novos dados de equilíbrio para sistemas formados por líquido iônico ($[C_4min][BF_4]$) + Li_2SO_4 + água; líquido iônico ($[C_4min][BF_4]$) + $MnSO_4$ + água; copolímero (F68) + $C_4H_4NaO_6$ + água; e copolímero (F68) + $C_4H_4K_2O_6$ + água na temperatura de 25 °C. Em seguida, empregou-se estes novos dados no estudo de partição das proteínas do soro α -lactalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg). Para os sistemas compostos por líquido iônico e sulfato foi observado que ao mudar o cátion do sulfato adicionado ao sistema houve uma tendência do aumento da região bifásica para a curva do Li_2SO_4 , em concentrações maiores de sal. No caso do sistemas constituídos por copolímero e sal orgânico também houve deslocamento significativo da região bifásica. Para o sistema no qual utilizou-se $C_4H_4NaO_6$, a região com formação de duas fases foi maior. Foram estudados os efeitos dos tipos de sais utilizados na formação dos sistemas sobre o coeficiente de partição das proteínas de interesse. Os sistemas formados por $[C_4min][BF_4]$, Li_2SO_4 e água conseguiram particionar as proteínas, nos quais a maior concentração de α -la foi detectada na fase inferior (rica em líquido iônico). Já a β -lg particionou para a fase salina (fase superior). No caso dos sistemas constituídos por $[C_4min][BF_4]$, $MnSO_4$ e água, ambas proteínas particionaram exclusivamente para a fase inferior. Entretanto, verificou-se precipitação de proteínas na interface

dos sistemas. Já os sistemas formados por copolímero (F68), $C_4H_4NaO_6$ e água; e copolímero (F68), $C_4H_4K_2O_6$ e água, particionaram as proteínas de interesse exclusivamente para a fase salina (fase inferior), ou seja, os sistemas não foram capazes de separar as proteínas de interesse em duas fases distintas.

ABSTRACT

ZEFERINO, Lilian Bozzi, M.Sc., Federal University of Viçosa, July, 2013. **Development diagrams biphasic systems consisting of copolymers-salts and ionic liquids-salts for application to the partition proteins.** Adviser: Luis Antonio Minim. Co-advisers: Kelany Santiago do Nascimento e Valéria Paula Rodrigues Minim.

Aqueous two phase systems (ATPS) have been used with great success in processes of separation, concentration and purification of bioactive molecules, since they are a variant of conventional liquid-liquid extraction, which favor the stability of biomolecules. As the water component present in the largest amount in both phases, these systems provide an environment for the biomolecules mild preserving thus its stability and avoiding loss of molecular biological activities. Therefore, this study was obtained new equilibrium data for systems formed by ionic liquid ([C₄min] [BF₄]) + Li₂SO₄ + water, ionic liquid ([C₄min] [BF₄]) + MnSO₄ + water; copolymer (F68) + C₄H₄NaO₆ + water, and copolymer (F68) + C₄H₄K₂O₆ + water at 25 ° C. For systems consisting of ionic liquid and sulfate it was observed that by changing the cation of the sulphate added to the system, there was a tendency of increased region to the biphasic curve Li₂SO₄ higher concentrations of salt. In the case of copolymer systems formed of organic and salt were also significant shift of the two phase region. For the system in which it was used C₄H₄NaO₆ the region with the formation of two phases is greater. Subsequently, was used these new data in the study of partition of the whey proteins α -lactalbumin (α -la) and β -lactoglobulin (β -lg). In this step sought to partition the proteins so obtain two fractions, one rich in β -lg and the other rich in α -la. Were studied the effects of the types of salts used in training systems on the partition coefficient of the protein of interest. The systems formed by [C₄min] [BF₄], Li₂SO₄ and water, able to partition the proteins, where the highest concentration of α -la was detected in the lower phase (rich in ionic liquid). Already β -lg partitioned to saline phase (upper phase). For systems consisting of [C₄min] [BF₄], MnSO₄ and water, exclusively for both proteins separated to lower phase. However, during the experiments it was observed protein precipitation at

the interface systems. Systems already formed by copolymer (F68) $C_4H_4NaO_6$ and water, and copolymer (F68) $C_4H_4K_2O_6$ and water separated proteins of interest only for the saline phase (lower phase), in other words, the systems were not able to separate the proteins of interest in two distinct phases.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
ARTIGO 1	5
Resumo	5
1 Introdução	6
2 Materiais e Métodos	7
2.1 Materiais	7
2.2 Planejamento Experimental	8
2.3 Determinação dos Diagramas de Equilíbrio	8
2.3.1 Titulação Turbidimétrica	8
2.3.2 Determinação das linhas de amarração.....	9
2.3.3 Comprimento e inclinação da linha de amarração.....	10
2.4 Partição de proteínas puras em SAB.....	11
3 Resultados e Discussão	13
3.1 Diagramas de equilíbrio.....	13
3.2 Partição de proteínas puras em SAB.....	16
4 Conclusões	18
5 Referências Bibliográficas	19
ARTIGO 2	21
Resumo	21
1 Introdução	22
2 Materiais e Métodos	23
2.1 Materiais	23
2.2 Planejamento Experimental	24
2.3 Determinação dos Diagramas de Equilíbrio	24
2.3.1 Titulação Turbidimétrica	24
2.3.2 Determinação das linhas de amarração.....	25
2.3.3 Comprimento e inclinação da linha de amarração.....	26
2.4 Partição de proteínas puras em SAB.....	27
3 Resultados e Discussões	29

3.1 Diagramas de equilíbrio.....	29
3.2 Partição de proteínas puras em SAB.....	33
4 Conclusões.....	34
5 Referências Bibliográficas	35
CONCLUSÃO GERAL	37

INTRODUÇÃO GERAL

A extração líquido-líquido usando solventes orgânicos é uma tecnologia clássica e versátil que foi estabelecida como uma poderosa ferramenta na indústria farmacêutica. Esta técnica é utilizada há cerca de 60 anos, no entanto, apesar de suas vantagens, não conseguiu reconhecimento no campo da biotecnologia devido à baixa solubilidade e à possível desnaturação das proteínas em solventes orgânicos. A sua utilização no domínio da biotecnologia tem sido limitada à recuperação de produtos de baixa massa molecular como antibióticos e ácidos orgânicos a partir de caldos de fermentação.

Por outro lado, sistemas aquosos bifásicos (SAB) têm sido utilizados com grande sucesso em processos de separação, concentração e purificação de moléculas bioativas, visto que são uma variante da extração líquido-líquido convencional, que favorecem a estabilidade de moléculas com origem em sistemas biológicos, além do baixo custo para implementação da técnica e facilidade de aplicação em larga escala. 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 preservando, assim, a sua estabilidade molecular e evitando perdas das atividades biológicas. A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas. Esta técnica apresenta ainda vantagens aos métodos de separação tradicionais como rápida separação das fases, baixa tensão interfacial, segurança e uso de componentes não tóxicos.

Sistemas aquosos bifásicos poliméricos oferecem condições apropriadas para extração de proteínas e têm a vantagem de distinguir pequenas mudanças na hidrofobicidade da superfície e no tamanho da biomolécula. Os sistemas mais estudados são os formados por polietilenoglicol-dextrana (PEG-dextrana) e PEG-Sal. Um importante aspecto destes sistemas é a possibilidade de manipular a partição da biomolécula pela mudança da força iônica e pH das soluções utilizadas. Além dos aspectos físico-químicos, o rendimento da extração é

independente da escala do processo, ao contrário de outros métodos de biosseparação como a cromatografia.

Atualmente, novos tipos de SABs estão sendo desenvolvidos. Os líquidos iônicos (LI) têm recebido grande atenção pela sua utilização potencial como “solventes verdes” e eventual substituição de solventes orgânicos voláteis tradicionais em muitas aplicações. LI são sais com íons fracamente ligados e que se apresentam na forma líquida a temperaturas inferiores a 100°C. Estes compostos têm mostrado capacidade de formar duas fases aquosas, assim como os tradicionais sistemas formados por polímeros, no entanto, oferecendo vantagens adicionais como: baixa viscosidade, rápida separação de fases, alta eficiência na extração, biocompatibilidade e facilidade de reciclo, volatilidade desprezível e não inflamabilidade.

Uma classe de macromoléculas que também vem despertando interesse na área da pesquisa com SABs é a de copolímeros triblocos termossensíveis, que atuam como um componente formador das fases. Copolímeros triblocos são moléculas obtidas pela junção de três segmentos poliméricos, sendo a parte central diferente dos dois segmentos externos, estes últimos iguais entre si. Tais polímeros são representados como $(EO)_x(PO)_y(EO)_x$. Um tipo de copolímeros termossensíveis aplicados na partição aquosa bifásica é aquele composto por PEO-PPO-PEO (Polioxido etileno- Polioxido propileno - Polioxido etileno). O bloco intermediário (PPO) é mais hidrofóbico que os blocos das extremidades devido ao grupo metil extra na unidade PO. Esta diferença de hidrofobicidade entre os blocos permite o fenômeno de micelação e formação de gel em soluções aquosas. No entanto, estas propriedades podem ser modificadas dependendo das condições do meio aquoso, como temperatura, pH ou presença de sais (DE LEMOS et al, 2013).

Atendendo à significativa diferença de densidades entre as duas fases, a separação realiza-se mais rapidamente. Se o polímero for facilmente removido e reciclado sem que precise utilizar métodos como ultrafiltração ou cromatografia, o SAB terá um custo ainda menor. A indução por alteração da temperatura para formação das fases, combinada com os baixos custos desses sistemas, oferece uma solução simples para o problema da remoção e reciclagem do polímero.

Duas biomoléculas que estão sendo utilizadas para estudo de separação com sistemas aquosos são as proteínas do soro α -lactalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg). A primeira é uma proteína pequena, cuja massa molar é de $14,176 \text{ g.mol}^{-1}$. Possui em sua estrutura primária, 123 resíduos de aminoácidos, sendo o triptofano o mais abundante nessa proteína, aproximadamente, 6 %. É apropriada para a preparação e fortificação nutricional de alimentos, podendo ser utilizada em formulações especiais para crianças que tenham alergia ao leite de vaca (BRAMAUD *et al.*, 1997). Já a β -lg é uma proteína globular que possui massa molar de $18,283 \text{ g.mol}^{-1}$, contendo 162 resíduos de aminoácidos, principalmente os sulfurados, o que a confere um elevado valor biológico. Em valores de pH menores que 3,0 ou maiores que 8,0, a β -Lg apresenta-se na forma de monômeros. Em valores de pH entre 5,1 e 6,7, os monômeros se associam em dímeros e entre pH 3,8 e 5,1, em octâmeros, quando em baixa temperatura e elevadas concentrações (SGARBIERI, 1996). Na indústria de alimentos a β -lg pode ser utilizada em formulações que necessitem de agentes formadores de estrutura, alta capacidade de formação de gel e retenção de água.

Neste trabalho, objetivou-se, primeiramente, a obtenção de novos dados de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos formados por líquido iônico, sais e copolímeros. Posteriormente, estes novos dados foram empregados no estudo de partição das proteínas do soro α -lactalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg). Dessa forma, foram estudados os efeitos dos tipos de sais utilizados na formação dos sistemas sobre o coeficiente de partição das proteínas de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAMAUD, C.; AIMAR, P.; DAVEEE, G. **Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α -lactoalbumin under gentle heat treatment.** *Biotechnology and Bioengineering*, 56:391-397, 1997.

DE LEMOS, L. R.; CAMPOS, R. A.; RODRIGUES, G. D.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H. **Green separation of copper and zinc using triblock copolymer aqueous two-phase systems.** *Separation and Purification Technology*, 115, p. 107–113, 2013.

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. In: SGARBIERI, V. C. (Ed.). **Proteínas em alimentos protéicos: Propriedades - Degradações - Modificações.** São Paulo: Livraria Varela, p.149-155. 1996.

ARTIGO 1

Extração líquido-líquido de proteínas do soro de leite utilizando sistemas aquosos bifásicos constituídos por líquido iônico, sulfato de lítio e sulfato de manganês

Lilian Bozzi Zeferino^a, Luis Antonio Minim^a, Kelany Santiago do Nascimento^b, Valéria Paula Rodrigues Minim^a, Lucas Rocha Bernardes de Oliveira^a

^a Universidade Federal de Viçosa - Viçosa-MG

^b Universidade Federal do Ceará - Fortaleza-CE

Resumo

Neste estudo foram determinados dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos formados por líquido iônico [C₄min][BF₄], Li₂SO₄ e água; e líquido iônico [C₄min][BF₄], MnSO₄ e água. Foi avaliada a influência do cátion dos sistemas nos diagramas de equilíbrio e no fracionamento das proteínas do soro de leite α -lactalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg). Nos sistemas formados a concentração de sulfato foi maior na fase superior, independente do tipo de sal utilizado na formação do sistema. A fase inferior mostrou-se rica em [C₄min][BF₄]. Enquanto as frações mássicas da água são maiores na fase salina (fase superior). De uma forma geral, foi observado que ao mudar o cátion do sulfato adicionado ao sistema houve uma tendência do aumento da região bifásica para a curva do Li₂SO₄, em concentrações maiores de sal. Os sistemas formados por [C₄C₁min][BF₄], Li₂SO₄ e água foram capazes de particionar as proteínas, nos quais a maior concentração de α -la foi detectada na fase inferior (rica em líquido iônico). Já a β -lg particionou para a fase salina (fase superior). No caso dos sistemas constituídos por [C₄min][BF₄], MnSO₄ e água, ambas proteínas particionaram exclusivamente para a fase inferior. Entretanto, as concentrações de proteínas detectadas nas fases de ambos os sistemas estudados foram muito pequenas, e suas concentrações foram mascaradas pela região de ruído do sistema de detecção do HPLC. Durante os experimentos verificou-se precipitação de proteínas na interface dos sistemas.

Palavras-chave: sistemas aquoso bifásico, extração líquido-líquido, proteínas do soro, partição, líquido iônico.

1 Introdução

Os líquidos iônicos (LI) são sais com íons fracamente ligados e que se apresentam na forma líquida a temperaturas inferiores a 100 °C. A natureza iônica confere aos LIs excelentes propriedades como: volatilidade desprezível, alta condutividade iônica, não inflamabilidade, alta estabilidade térmica e química, boa condutividade elétrica e avançada capacidade de solvatação para uma grande variedade de compostos (MOURÃO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2012).

Esses compostos têm recebido grande atenção pelo seu potencial de uso como “solventes verdes” pela substituição de solventes orgânicos voláteis tradicionais em muitas aplicações. Em 2003, Gutowski e colaboradores relataram a pesquisa pioneira apontando para a possível criação de SAB com a adição de sais inorgânicos e soluções aquosas de líquidos iônicos. Estes SABs foram previstos como novas alternativas para reciclagem e concentração de líquidos iônicos a partir de soluções aquosas e como nova técnica de separação (GUTOWSKI et al., 2003). Desde então, um esforço considerável tem sido realizado com o intuito de utilizar líquidos iônicos como alternativas viáveis para as fases ricas em polímero e, mais recentemente, para as fases ricas em sal dos tradicionais sistemas de duas fases aquosas.

Segundo Almeida e colaboradores (2012), os LIs são compostos por íons e, como resultado, há um grande número de fluidos potenciais a serem sintetizados por simples rearranjos estruturais. Numa situação ideal, a combinação de íons diferentes aloca a adaptação das suas propriedades e características e permite-lhes serem fluidos específicos para determinadas aplicações. Além disso, essas soluções apresentam uma ampla faixa de temperatura na qual se encontram no estado líquido.

Estes compostos têm mostrado serem capazes de formar duas fases aquosas com polímeros (FREIRE et al., 2012a), sais (MOURÃO et al., 2012;

PASSOS et al., 2012), aminoácidos (ZHANG et al., 2007) e carboidratos (CHEN et al., 2010), sendo utilizados na separação e purificação de biomoléculas. Apresentam vantagens adicionais quando comparados aos sistemas formados por polímeros como: baixa viscosidade, rápida separação de fases, alta eficiência na extração, biocompatibilidade e facilidade de reciclo, redução de perdas de solventes orgânicos para a atmosfera e da contaminação de cursos de água (LI et al., 1998).

Sistemas aquosos à base de polímeros geralmente exibem duas fases hidrofóbicas e as diferenças de polaridades dependem essencialmente da quantidade de água em cada uma das fases. Por outro lado, SABs polímero-sal têm uma fase hidrofóbica constituída pelo polímero e uma fase hidrofílica tipicamente formada por sais de alta densidade de carga (FREIRE et al., 2012b). Ao lidar com líquidos iônicos hidrofóbicos, duas fases já existiam antes da adição de qualquer sal, sendo que uma das fases apresenta pouca quantidade de água devido à baixa solubilidade desses líquidos iônicos em água.

Neste trabalho, objetivou-se, primeiramente, a obtenção de novos dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos formados por [C₄min][BF₄], Li₂SO₄ e MnSO₄. Na etapa de fracionamento das proteínas do soro α -lactalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) buscou-se particionar as proteínas de forma que obtivesse duas frações, uma rica em β -lg e outra rica em α -la. Assim, foi estudado o efeito do tipo de sal sobre o coeficiente de partição dessas proteínas de interesse.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os reagentes utilizados na realização do experimento foram: líquido iônico Tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio [C₄min][BF₄] (Sigma Aldrich, EUA); sulfato de lítio e sulfato de manganês (Sigma Aldrich, EUA); acetonitrila (Sigma Aldrich, EUA). Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., EUA) e reagentes químicos de grau analítico ou

cromatográfico. As proteínas (α -la e β -lg) na forma pura foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

2.2 Planejamento Experimental

Primeiramente, foram determinados os dados de equilíbrio das fases formadas por líquido-iônico/sal a 25 °C. Os experimentos para obtenção dos diagramas de equilíbrio foram conduzidos no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com duas repetições e duplicata para cada repetição. Os valores obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. A partir dos resultados das linhas de amarração foram construídas as curvas binodais.

Posteriormente avaliou-se a influência do tipo de sal sobre o coeficiente de partição das proteínas (variável dependente). Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado. Os valores obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão.

As análises estatísticas necessárias foram realizadas no *software Statistical Analysis System*[®] (versão 9.0), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Determinação dos Diagramas de Equilíbrio

Os diagramas de equilíbrio foram obtidos pelo método de titulação turbidimétrica, para delimitação da região bifásica e subsequente determinação das linhas de amarração. Este método consiste em titular uma solução de polímero ou solução de sal com o líquido iônico até que a mistura final das soluções torne-se turva (ALBERTSSON, 1971).

2.3.1 Titulação Turbidimétrica

As curvas binodais foram construídas, a partir da mistura do líquido iônico com a solução de sal e água, na temperatura de 25 °C. Assim, prepararam-se soluções estoque de líquido iônico a 98% (m/m) e soluções de sal (Li_2SO_4 ou MnSO_4) com concentração total 18% e 13% (m/m), respectivamente. Inicialmente, transferiu-se para um tubo de vidro, aproximadamente 1g de solução de líquido iônico. Esse tubo foi fixado dentro de um banho termostático à temperatura de trabalho. Após atingir a temperatura desejada, alíquotas de 25 μL da solução de sal foram adicionadas ao tubo até ocorrer o turvamento da solução final. O sistema foi agitado com a ajuda de um agitador vortex e, em seguida, deixado em repouso durante alguns minutos, dentro do banho, até a formação das duas fases. Em seguida, adicionou-se uma quantidade de água suficiente (alíquotas de 100 μL) para que o sistema voltasse ao estado homogêneo. As quantidades de sal, líquido iônico e água adicionadas ao sistema foram anotadas em cada ponto de turvamento de forma a se obter as concentrações de líquido iônico, sal e água. Este processo de titulação foi repetido até a obtenção de pontos suficientes para a formação da curva binodal. A partir das curvas binodais selecionou-se pontos de mistura localizados na região bifásica para a determinação das linhas de amarração e para proceder à análise da composição das fases.

2.3.2 Determinação das linhas de amarração

Para a determinação das linhas de amarração (LA) escolheu-se pontos de composição global com concentração de cada componente, previamente determinada, que ao serem misturados, agitados manualmente e deixados em repouso em banho termostático, formaram duas fases.

Sistemas foram preparados para uma massa total de 9 g, em tubos graduados de centrífuga com volume de 15 mL. Todos os componentes do sistema foram completamente misturados com um agitador vortex e deixados em estufa B.O.D a 25 °C (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil) por 18 h para a separação de fases e, assim, para que o equilíbrio fosse atingido. A fim de assegurar a completa separação de fases, os sistemas foram centrifugados a

2000xg por 20 min à temperatura de 25 °C (Eppendorf, Alemanha) antes serem colocados na estufa B.O.D. Após 18hs retirou-se alíquotas destas para a quantificação dos componentes dos sistemas. A fase superior foi retirada com o auxílio de uma pipeta automática e a fase inferior com uma seringa com agulha.

A quantificação do $[C_4C_1min][BF_4]$ nas fases foi realizada por espectrofotometria utilizando-se espectrofotômetro (Spectrophotometer UV-Vis Biomate 3, Thermo Scientific, USA) em um comprimento de onda de 211 nm. Curvas analíticas foram previamente estabelecidas para soluções de líquido iônico em diferentes diluições. As concentrações de sais foram determinadas por espectroscopia de absorção atômica. A determinação foi feita de maneira indireta, pela quantificação do teor dos cátions lítio e manganês. Curvas analíticas foram construídas na extensão de 0,1 a 3,0 ($mg.kg^{-1}$) para o manganês e 0,1 a 2,5 ($mg.kg^{-1}$) para o lítio. As fases foram diluídas de modo que a concentração estivesse dentro da faixa de calibração. Cada fase foi analisada em duplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão. A quantidade de água presente nas fases foi determinada por diferença.

2. 3. 3 Comprimento e inclinação da linha de amarração

O comprimento das linhas de amarração (CLA), medida numérica de referência para a composição das fases, e a inclinação das linhas de amarração (ILA) também têm sido frequentemente abordados em estudos de diagramas de equilíbrio (FREIRE, 2012b). Esses parâmetros indicam como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química. Essas medidas são descritas pelas Equações 1 e 2,

$$CLA = \sqrt{(X_s - X_i)^2 + (Y_s - Y_i)^2} \quad (1)$$

$$ILA = \left| \frac{Y_s - Y_i}{X_s - X_i} \right| \quad (2)$$

onde s e i indicam fase superior e inferior, respectivamente, e X e Y representam as concentrações de sal e líquido iônico nas fases.

2.4 Partição de proteínas puras em SAB

Para a análise da capacidade de partição das proteínas α -la e β -lg pelos sistemas gerados, preparou-se uma solução de proteína (50 mg/mL) misturando-se α -la e β -lg (1:1) na sua forma pura.

Os experimentos de partição para os diferentes SABs foram conduzidos à temperatura de 25 °C em tubos graduados de centrífuga de 15 mL. O pH foi determinado pela mistura do $[C_4\text{min}][BF_4]$ com o sal. Preparou-se sistemas bifásicos com massa total de 5,0 g pela adição de quantidades conhecidas de solução estoque (concentrações em % de massa) de líquido iônico (98%) e de sal (13-18 %). Em todos os sistemas, previamente equilibrados, foram adicionados 50 μ L da solução de proteína anteriormente preparada. Os tubos foram fechados, agitados por 5 min e centrifugados (Eppendorf, Alemanha) durante 20 min a $2000\times g$. Os volumes de cada fase foram determinados pela leitura no próprio tubo. Em seguida, os sistemas foram deixados em repouso durante 18 horas, em estufa B.O.D. (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil) com temperatura controlada ($25\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$), para separação das fases. As fases superiores e inferiores foram coletadas com pipetas automáticas de 1 mL e seringas de 3 mL, respectivamente, e acondicionadas separadamente para determinação da concentração das proteínas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conduzida em cromatógrafo líquido (Shimadzu[®], Japão) provido de um detector de feixe de diodos, duas bombas de alta pressão, forno, auto-injetor de amostras e software de aquisição e análise de dados (Class-VP 6.0). As proteínas foram detectadas em um detector de feixe de diodos, com comprimento de onda fixo em 210 nm. O método utilizado foi: coluna de fase reversa (C18, Shimadzu) Shim-pack VP-ODS (250 x 4.6) mm termicamente controlada (40 °C), fases móveis compostas por solução aquosa de NaCl (0,15 mol/L, pH 2,5) e acetonitrila (grau HPLC, Sigma Aldrich, EUA) a uma vazão de 1 mL/min. As soluções aquosas de NaCl (A) e Acetonitrila (B)

foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose de 0.45 μm (MilliPore[®]) e membrana de nylon de 0.22 μm (MilliPore[®]), respectivamente e desgaseificadas. A programação do gradiente da fase móvel é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Programação do gradiente da fase móvel

Concentrações iniciais	Concentrações finais	Tempo de Duração (min.)
100% A, 0% de B	64% A, 36% B	3
64% A, 36% B	55% A, 45% B	18
55% A, 45% B	55% A, 45% B	2
55% A, 45% B	100% A, 0% B	10

Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana de 0.45 μm (MilliPore[®]), sendo injetado um volume de 20 μL com fluxo de 1 mL/min com tempo de corrida de 33 minutos.

Os resultados obtidos foram analisados primeiramente em termos de coeficiente de partição da proteína “*i*”, $K_{p,i}$, expresso pela Equação 3.

$$K_{p,i} \equiv \frac{C_{p,S}}{C_{p,I}} \quad (3)$$

em que $C_{p,S}$ e $C_{p,I}$ correspondem às concentrações de cada proteína na fase superior e na fase inferior, respectivamente.

Foram calculados os coeficientes de partição de cada proteína e, nos tratamentos envolvendo a mistura de α -la mais β -lg, o coeficiente de partição da proteína total, K_p . O parâmetro seletividade (S) foi então calculado de acordo com a Equação 4.

$$S = \frac{K_{p,i}}{K_p} \quad (4)$$

3 Resultados e Discussão

3.1 Diagramas de equilíbrio

As composições globais e de equilíbrio da fase superior e da fase inferior dos SAB's formados por $[C_4min][BF_4]$, Li_2SO_4 e água ou $[C_4min][BF_4]$, $MnSO_4$ e água são mostradas na Tabela 2. Para cada diagrama foram determinados dados para três linhas de amarração.

Tabela 2 – Porcentagem em massa para sistemas formados por sulfato (w_1), $[C_4min][BF_4]$ (w_2), água (w_3), com diferentes sulfatos

Linhas de amarração	Composição global			Fase Superior			Fase Inferior		
	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3
Sulfato de Lítio									
1	2,55	38,31	59,14	5,25	11,84	82,90	0,35	64,61	35,04
	\pm 0,0002	\pm 0,0259	\pm 0,0260	\pm 0,20	\pm 1,03	\pm 0,83	\pm 0,03	\pm 1,22	\pm 1,25
2	2,80	42,14	55,06	5,98	7,63	86,39	0,23	72,38	27,39
	\pm 0,0019	\pm 0,0024	\pm 0,0043	\pm 0,21	\pm 0,79	\pm 1,00	\pm 0,03	\pm 1,03	\pm 1,01
3	3,08	46,35	50,57	7,02	5,59	87,39	0,22	79,82	19,96
	\pm 0,0006	\pm 0,0461	\pm 0,0043	\pm 0,12	\pm 0,54	\pm 0,66	\pm 0,02	\pm 3,50	\pm 3,52
Sulfato de Manganês									
1	1,75	36,12	62,13	3,92	18,62	77,46	0,64	52,63	46,73
	\pm 0,0004	\pm 0,011	\pm 0,011	\pm 0,44	\pm 1,35	\pm 0,90	\pm 0,01	\pm 5,62	\pm 5,62
2	1,93	39,71	58,36	5,43	15,16	79,41	0,55	61,65	37,80
	\pm 0,0009	\pm 0,011	\pm 0,010	\pm 1,26	\pm 1,51	\pm 2,77	\pm 0,08	\pm 11,04	\pm 11,12
3	2,12	43,69	54,19	6,50	15,77	77,73	0,77	65,13	34,10
	\pm 0,0049	\pm 0,005	\pm 0,009	\pm 0,68	\pm 6,00	\pm 5,32	\pm 0,08	\pm 0,73	\pm 0,81

Pode ser observado na Tabela 2 que a fração mássica de sulfato é maior na fase superior, independente do tipo de sulfato utilizado na formação do sistema. A fase inferior é rica em líquido iônico, enquanto as frações mássicas da água são maiores na fase salina (fase superior).

Quando um sal é dissolvido numa solução aquosa, os seus íons estão cercados por uma camada de moléculas de água, fenômeno conhecido como a hidratação iônica. No presente caso, quando um sal inorgânico é adicionado a uma solução de um líquido iônico, essas moléculas competem entre si pelas moléculas de solvente (água). A competição é vencida pelos íons inorgânicos, uma vez que têm efeito cosmotrópico, aumentam a estruturação das moléculas de água ao seu redor. Dessa forma, ocorre uma transferência das moléculas de água distante dos íons do LI para os do sal inorgânico, que por sua vez, diminui a hidratação e, conseqüentemente, a solubilidade dos íons do LI ficando a fase mais hidrofóbica. Como consequência, uma fase rica em líquido iônico é separada do resto da solução. Isto significa que o efeito de *salting-out* está diretamente correlacionado com a força de hidratação dos diferentes íons de sal inorgânico (TRINDADE et al., 2007).

Na Figura 1 são apresentadas as curvas binodais para os sistemas formados por Li_2SO_4 ou MnSO_4 , líquido iônico, água. Analisando o comportamento das curvas binodais dos sistemas compostos por sulfato, líquido iônico, água frente aos diferentes tipos de sulfato, há uma tendência do aumento da região bifásica para a curva do Li_2SO_4 , em concentrações maiores de sal.

Qualquer conjunto de pontos que pertençam à região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores e inferiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, entre outras), no entanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc.) (ZASLAVSKY, 1995; DA SILVA e LOH, 2006).

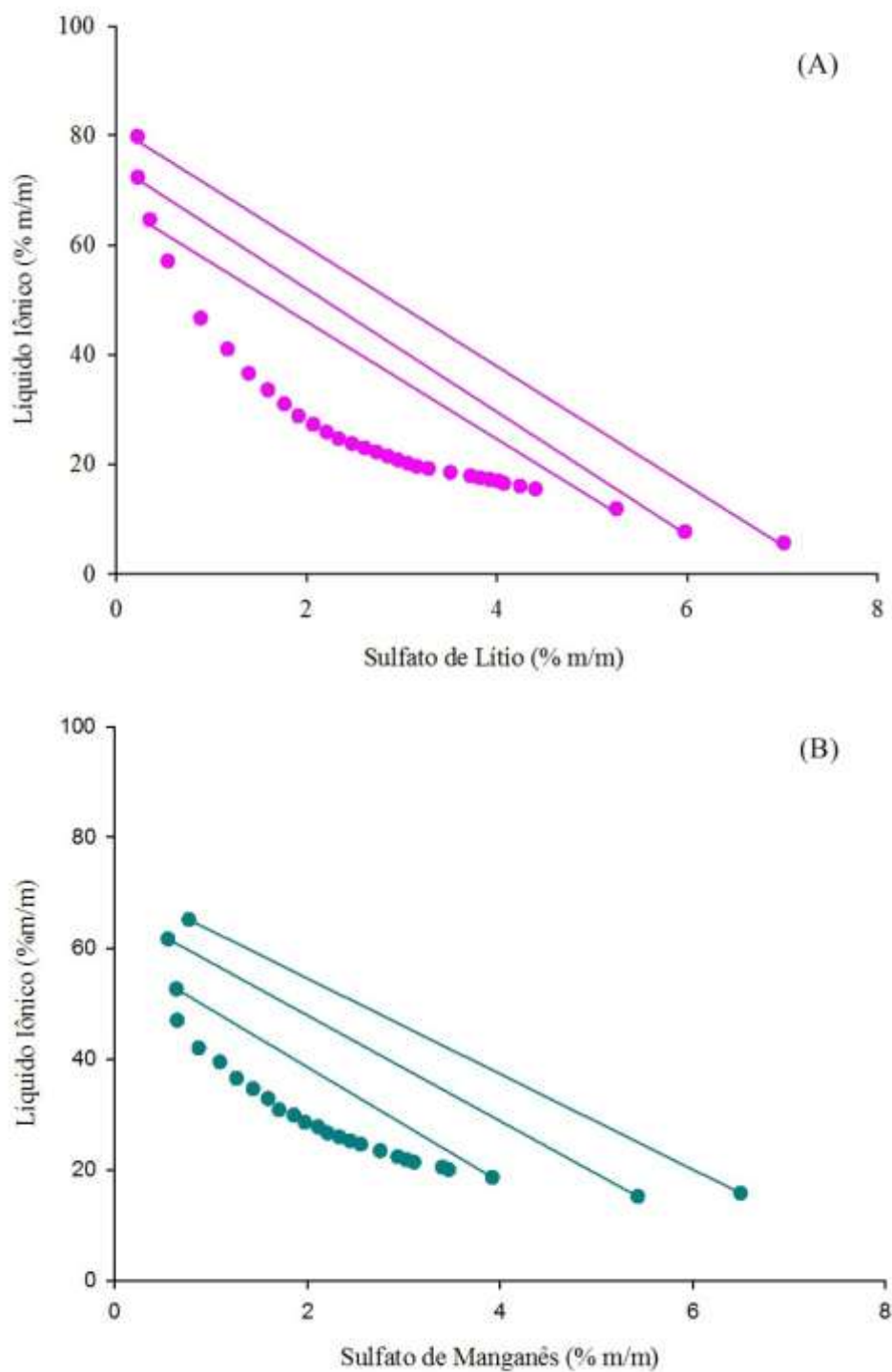


Figura 1 – Curvas binodais dos sistemas formados por: (A) sulfato de lítio, $[C_4min][BF_4]$ e água ; (B) sulfato de manganês, $[C_4min][BF_4]$ e água.

O comprimento das linhas de amarração para os sistemas compostos por $[C_4min][BF_4]$ + Li_2SO_4 são maiores e há um aumento da região bifásica deste

sistema (Tabela 3). Na Tabela 4 são apresentadas as medidas da ILA e observa-se que os valores podem ser considerados constantes indicando que as interações mudam proporcionalmente com a variação do CLA. Pode ser verificar que a ILA diminuiu com o aumento da linha de amarração isso corre devido ao aumento da hidrofobicidade da fase rica em LI.

Tabela 3 - Comprimento das linhas de amarração para os sistemas formados por $[C_4min][BF_4]$, sulfato (lítio ou manganês) e água

Linha de amarração	Sulfato			
	Lítio		Manganês	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	52,9935	0,1723	34,1747	4,2163
2	65,0088	0,2637	46,7405	9,5975
3	74,5343	4,0091	49,6934	6,7594

Tabela 4 - Inclinação das linhas de amarração para os sistemas formados por $[C_4C_1min][BF_4]$, sulfato (lítio ou manganês) e água

Linha de amarração	Sulfato			
	Lítio		Manganês	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	10,7774	0,5373	10,5537	2,6987
2	11,2694	0,4247	9,5784	0,3680
3	10,9335	0,8172	8,6059	0,2747

3.2 Partição de proteínas puras em SAB

Os dados de equilíbrio líquido-líquido dos SABs formados por $[C_4min][BF_4]$, Li_2SO_4 e água ou $[C_4min][BF_4]$, $MnSO_4$ e água foram aplicados para investigar o comportamento de partição das proteínas do soro α -la e β -lg.

Os sistemas formados por [C₄min][BF₄], Li₂SO₄ e água foram capazes de particionar as proteínas, nos quais a maior concentração de α-la foi detectada na fase inferior (rica em líquido iônico). Já a β-lg particionou para a fase salina (fase superior) (Tabela 5). No caso dos sistemas constituídos por [C₄min][BF₄], MnSO₄ e água, ambas proteínas particionaram exclusivamente para a fase inferior. Entretanto, as concentrações de proteínas detectadas nas fases de ambos sistemas estudados foram muito pequenas, possivelmente entraram na região de ruído do sistema de detecção do HPLC. Durante os experimentos verificou-se precipitação de proteínas na interface dos sistemas.

Novos estudos de partição deverão ser realizados visando minimizar a precipitação das proteínas na interface dos SABs, alterando o delineamento e as condições experimentais.

Na Tabela 6 observa-se os valores do parâmetro Seletividade para os sistemas estudados. Pode ser verificado que a seletividade foi maior para a proteína β-lg nos dois sistemas. Contudo, os valores foram maiores para os sistemas formados por [C₄min][BF₄] e Li₂SO₄, ou seja, o sistema conseguiu separar as proteínas de interesse em duas fases distintas.

Tabela 5 – Coeficiente de partição das proteínas α-la e β-lg nos SABs Líquido-iônico/ Sal

Coeficiente de partição	Li₂SO₄	MnSO₄
K_α	0,625 ± 0,029	0,018 ± 0,013
K_β	3,620 ± 0,436	0,439 ± 0,001

Tabela 6 – Seletividade dos sistemas às proteínas

Seletividade	Li ₂ SO ₄	MnSO ₄
α -la	0,4948 \pm 0,046	0,114 \pm 0,028
β -lg	2,8635 \pm 0,256	2,773 \pm 0,001

4 Conclusões

Neste trabalho foi analisado o efeito do tipo de sal (cátion) sobre o equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos formados por [C₄min][BF₄], sulfatos e água.

A concentração de sulfato foi maior na fase superior, independente do tipo de sulfato utilizado na formação do sistema. A fase inferior apresentou-se rica em líquido iônico, enquanto as frações mássicas da água foram maiores na fase salina (fase superior).

De uma forma geral, foi observado que ao mudar o cátion do sulfato adicionado ao sistema houve uma tendência do aumento da região bifásica para a curva do Li₂SO₄, em concentrações maiores de sal.

Na etapa de fracionamento das proteínas do soro α -la e β -lg, buscou-se particionar as proteínas de forma que obtivesse duas frações, uma rica em β -lg e outra rica em α -la. Foi estudado o efeito dos cátions (Li⁺ e Mn⁺²) sobre o coeficiente de partição das proteínas de interesse. Ambos os sistemas conseguiram particionar as proteínas sendo que nos ensaios com sistema [C₄min][BF₄] + Li₂SO₄ a maior concentração de α -la foi detectada na fase rica em líquido iônico (inferior). Já a β -lg particionou para a fase salina (superior). Entretanto, ao realizar o experimentos de partição com sistemas [C₄min][BF₄] + MnSO₄ ambas proteínas particionaram exclusivamente para a fase inferior. Ao quantificar as proteínas observou-se que nos dois sistemas estudados as concentrações foram muito pequenas, possivelmente entraram na região de ruído do sistema de detecção do HPLC.

Novos estudos de partição poderão ser realizados visando minimizar a precipitação das proteínas na interface dos SABs utilizados, alterando o delineamento e as condições experimentais.

5 Referências Bibliográficas

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. 2nd edition, Wiley, New York, 1971.

ALMEIDA, H. F. D.; TELES, A. R. R.; DA SILVA, J. A. L.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. **Influence of the anion on the surface tension of 1-ethyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids**. *J. Chem. Thermodynamics*, *in press* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2012.03.008>). 2012.

CHEN, Y.; MENG, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; LIU, X.; YANG, J. **Liquid-Liquid equilibria of aqueous biphasic systems composed of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate + sucrose/maltose + water**. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 55, n. 9, 55, p. 3612–3616, 2010.

DA SILVA, L. H. M., LOH, W. **Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas**. *Quimica Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

FREIRE, M. G.; PEREIRA, J. F. B.; FRANCISCO, M.; RODRÍGUEZ, H.; REBELO, L. P. N.; ROGERS, R. D.; COUTINHO, J. A. P. **Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol polymers and ionic liquids**. *Chem. Eur. J.*, 18, p. 1831 – 1839. (DOI: 10.1002/chem.201101780). 2012a.

FREIRE, M. G.; CLÁUDIO, A. F. M.; ARAÚJO, J. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M.; LOPESAC, J. N. C.; REBELO, L. P. N. **Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids**. *The Royal Society of Chemistry, Chem Soc Rev*, (doi: 10.1039/c2cs35151j). 2012b.

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**. *J. American Chemical Society*, 125, p. 6632-6633, 2003.

LI, M.; ZHU, Z. Q.; WU, Y. T.; LIN, D. Q. **Measurement of phase diagrams for new aqueous two-phase systems and prediction by a generalized multicomponent osmotic virial equation**. *Chem. Eng. Scien.*, v. 53, p. 2755-2767, 1998.

MOURÃO, T.; CLÁUDIO, A. F. M.; BOAL-PALHEIROS, I.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. **Evaluation of the impact of phosphate salts on the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems.** J. Chem. Thermodynamics. *in press* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2012.05.019>). 2012.

PASSOS, H.; FERREIRA, A. R.; CLÁUDIO, A. F. M.; COUTINHO, J. A. P.; FREIRE, M. G. **Characterization of aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and a citrate-based biodegradable salt.** Biochemical Engineering Journal, 67, p. 68–76. 2012.

TRINDADE, J. R.; VISAK, Z. P.; BLESIC, M.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P.; LOPES, J. N. C.; REBELO, L. P. N. **Salting-Out effects in aqueous ionic liquid solutions: cloud-point temperature shifts.** Journal of Physical Chemistry B, v. 111, n. 18, p. 4737-4741, 2007.

ZASLAVSKY, B.Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning.** New York: Marcel Decker, 1995. 696 p.

ZHANG, J.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, S. **Mutual coexistence curve measurement of aqueous biphasic systems composed of [bmim][BF₄] and glycine, L-serine, and L-proline, respectively.** Journal of Chemical and Engineering Data, Vol. 52, No. 6, p. 2488-2490. 2007.

ARTIGO 2

Extração líquido-líquido de proteínas do soro de leite utilizando sistemas aquosos bifásicos constituídos por copolímero tribloco, tartarato de sódio e tartarato de potássio

Lilian Bozzi Zeferino^a, Luis Antonio Minim^a, Kelany Santiago do Nascimento^b, Valéria Paula Rodrigues Minim^a, Lucas Rocha Bernardes de Oliveira^a

^a Universidade Federal de Viçosa - Viçosa-MG

^b Universidade Federal do Ceará - Fortaleza-CE

Resumo

Neste estudo foram determinados dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos formados por copolímero (F68), $C_4H_4NaO_6$ e água ou copolímero (F68), $C_4H_4K_2O_6$ e água. Aos dados obtidos para construção dos diagramas de equilíbrio foi ajustado um modelo exponencial decrescente de três parâmetros para obtenção das curvas binodais. Observou-se uma diferença entre as posições das curvas turbidimétrica e curvas bimodais, o que pode ser explicado pelo tempo disponibilizado para que os sistemas entrassem em equilíbrio. Durante a titulação turbidimétrica o tempo esperado foi de alguns minutos, o suficiente para que o sistema continuasse homogêneo após a adição de água. Já na preparação dos sistemas para análise dos constituintes das fases, o tempo foi de 24 horas. Analisando o comportamento das curvas binodais desses sistemas, houve deslocamento significativo da região bifásica. O sistema formado por $C_4H_4NaO_6$ apresentou maior região com formação de duas fases. A fração mássica de sal foi maior na fase inferior, tanto nos sistemas formados por $C_4H_4NaO_6$ como $C_4H_4K_2O_6$, enquanto a fase superior foi rica em copolímero. Verificou-se também que as frações mássicas da água foram maiores na fase salina. Os resultados para análise de fases podem ser considerados excelentes, visto que os desvios padrão foram baixos sendo inferiores a 1,34%. Verificou-se que em ambos os sistemas as proteínas particionaram exclusivamente para a fase salina (fase inferior) e para

esse parâmetro a seletividade foi maior para a proteína β -Ig nos dois sistemas. Contudo, os valores foram baixos tanto para os sistemas formados por F68 e $C_4H_4NaO_6$ quanto os formados por F68 e $C_4H_4K_2O_6$, ou seja, os sistemas não foram capazes de separar as proteínas de interesse em duas fases distintas.

Palavras-chave: sistemas aquoso bifásico, extração líquido-líquido, proteínas do soro, partição, copolímero tribloco.

1 Introdução

Sistemas aquosos bifásicos (SAB) têm sido utilizados com grande sucesso em processos de separação, concentração e purificação de moléculas bioativas, visto que são uma variante da extração líquido-líquido convencional, que favorecem a estabilidade de moléculas com origem em sistemas biológicos, além do baixo custo para implementação da técnica e facilidade de aplicação em larga escala. Como o solvente é a água em ambas as fases, estes sistemas fornecem um ambiente ameno para as biomoléculas preservando, assim, a sua estabilidade molecular e evitando perdas das atividades biológicas, o que possibilita o seu processamento neste meio (Da SILVA & LOH, 2006).

Atualmente, novos sistemas aquosos bifásicos estão sendo desenvolvidos. Uma classe de macromoléculas que vem despertando interesse na área da pesquisa com SABs é de copolímeros triblocos, que atuam como um componente formador das fases. São compostos por PEO-PPO-PEO (Polioxido etileno- Polioxido propileno - Polioxido etileno), sendo um dos tipos de polímeros termosensíveis aplicados na partição aquosa bifásica. O bloco intermediário (PPO) é mais hidrofóbico que os blocos das extremidades devido ao grupo metil extra na unidade PO. Esta diferença de hidrofobicidade entre os blocos permite o fenômeno de micelação e formação de gel dependendo da concentração e temperatura da solução de copolímero (DE LEMOS et al, 2013). Os SABs formados por estes copolímeros têm sido aplicados na partição de biomoléculas hidrofóbicas e hidrofílicas principalmente pelo fato de apresentarem baixas temperaturas de separação de fase (ALEXANDRIDIS et al., 1994).

A utilização de polímeros termossensíveis na extração de biomoléculas por SAB permite não só a reciclagem dos polímeros como também uma separação fácil das biomoléculas presentes na fase rica em polímero e este é um passo importante no processo em escala industrial e em laboratório. Atendendo à significativa diferença de densidades entre as duas fases, a separação realiza-se mais rapidamente. Se o polímero for facilmente removido e reciclado sem que precise utilizar métodos como ultrafiltração ou cromatografia, o SAB terá um custo ainda menor. A indução por alteração da temperatura para formação das fases, combinada com SABs baratos oferece uma solução simples para o problema da remoção e reciclagem do polímero (LI et al., 1998). Com isto, vem aumentando o interesse em se utilizar os copolímeros blocos como um dos componentes na formação de novos sistemas de duas fases aquosas.

Neste trabalho, objetivou-se, primeiramente, a obtenção de novos dados de equilíbrio líquido-líquido para sistemas aquosos bifásicos formados por copolímero tribloco $(EO)_{80}(PO)_{30}(EO)_{80}$ massa molar média 8400 g.mol^{-1} (F68), tartarato de sódio ($C_4H_4NaO_6$) ou tartarato de potássio ($C_4H_4K_2O_6$). Em seguida foi estudado o efeito do tipo de sal sobre os diagramas de equilíbrio. Os dados de equilíbrio obtidos foram empregados no fracionamento das proteínas do soro α -lactalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg) avaliando o efeito do tipo de sal sobre o coeficiente de partição dessas proteínas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os reagentes utilizados na realização do experimento foram: copolímero tribloco $(EO)_{80}(PO)_{30}(EO)_{80}$ massa molar média 8400 g.mol^{-1} (F68) (Sigma Aldrich, EUA); tartarato de sódio e tartarato de potássio (VETEC, Brasil). Nos experimentos foram empregados água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore Inc., EUA) e reagentes químicos de grau analítico.

2.2 Planejamento Experimental

Inicialmente, foram determinados os dados de equilíbrio das fases formadas por F68/tartarato de sódio e F68/tartarato de potássio. Os experimentos para obtenção dos diagramas de equilíbrio foram conduzidos no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com duas repetições em duplicata para cada repetição. Os valores obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. A partir dos resultados das linhas de amarração ajustou-se um modelo exponencial decrescente de três parâmetros para construção das curvas binodais.

As análises estatísticas foram realizadas no *software Statistical Analysis System*[®] (versão 9.0), licenciado para Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Determinação dos Diagramas de Equilíbrio

Os diagramas de equilíbrio foram obtidos pelo método de titulação turbidimétrica, para delimitação da região bifásica e subsequente determinação das linhas de amarração. Este método consiste em titular uma solução de polímero ou solução de sal com o copolímero até que a mistura final das soluções torne-se turva (ALBERTSSON, 1971).

2.3.1 Titulação Turbidimétrica

As curvas binodais foram construídas, a partir da mistura da solução de copolímero com a solução de sal e água, na temperatura de 25 °C. Assim, preparou-se soluções estoque de F68 a 30% (m/m) e ambas soluções de sal ($C_4H_4NaO_6$ e $C_4H_4K_2O_6$) com concentração total 30% (m/m). Inicialmente, transferiu-se para um tubo de vidro, aproximadamente 1 g de solução de copolímero. Esse tubo foi fixado dentro de um banho termostático à temperatura de trabalho. Após atingir a temperatura desejada, alíquotas de 25 µL

da solução de sal foram adicionadas ao tubo até ocorrer o turvamento da solução final. O sistema foi agitado com a ajuda de um agitador vortex e, em seguida, deixado em repouso durante alguns minutos, até a formação das duas fases. Em seguida, adicionou-se uma quantidade de água suficiente, alíquotas de 100 μL para que o sistema voltasse ao estado homogêneo. As quantidades da solução de sal, copolímero e água adicionadas ao sistema foram anotadas em cada ponto de turvamento de forma a se obter as concentrações dos três componentes. Este processo de titulação foi repetido até a obtenção de pontos suficientes para a formação da linha binodal. A partir das curvas binodais selecionou-se pontos de mistura localizados na região bifásica para a determinação das linhas de amarração. Esses pontos de composição global foram escolhidos a fim de se proceder à análise da composição das fases.

2. 3. 2 Determinação das linhas de amarração

Para a determinação das linhas de amarração (LA) escolheu-se pontos de composição global com concentração de cada componente, previamente determinada, que ao serem misturados, agitados manualmente e deixados em repouso em banho termostático, formaram duas fases.

Sistemas foram preparados para uma massa total de 11 g, em tubos graduados de centrífuga com volume de 15 mL. Todos os componentes do sistema foram completamente misturados com um agitador vortex e deixado em estufa B.O.D. (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil) por 24 h a 25 °C para a separação de fases e também para que o equilíbrio termodinâmico fosse atingido. A fim de assegurar a completa separação de fases, os sistemas foram centrifugados a 2000xg por 35 min à temperatura de 25 °C (Eppendorf, Alemanha) antes de serem colocados na B.O.D . Após 24horas retirou-se alíquotas destas para a quantificação dos componentes dos sistemas. A fase superior foi retirada com o auxílio de uma pipeta automática e a fase inferior com uma seringa com agulha.

Os sais foram determinados por condutividade elétrica utilizando-se condutivímetro (Hanna Instrument, Brasil), para as quais foi necessário diluir as fases 1200 vezes. A quantificação do F68 nas fases foi realizada utilizando medidas de índice de refração. O refratômetro utilizado foi o Abbe Refractometer da Analytik Jena (Konrak, Zwse, Jena) acoplado a um banho Thermo Haake 003-5007 (Karlsruhe, Alemanha). Neste caso, foram realizadas diluições de 1,5 de ambas as fases. Uma vez que o índice de refração das amostras apresentou-se como uma propriedade termodinâmica aditiva, o desconto foi realizado subtraindo a concentração total das fases (concentração referente ao copolímero mais o sal) obtida com o índice de refração pela concentração de sal quantificada pelo condutivímetro.

Cada fase foi analisada em duplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão. A quantidade de água presente nas fases foi determinada por diferença.

2.3.3 Comprimento e inclinação da linha de amarração

O comprimento das linhas de amarração (CLA), medida numérica de referência para a composição das fases, e a inclinação das linhas de amarração (ILA) também têm sido frequentemente abordados em estudos de diagramas de equilíbrio (FREIRE, 2012b). Esses parâmetros indicam como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química. Essas medidas são descritas pelas Equações 1 e 2,

$$CLA = \sqrt{(X_s - X_i)^2 + (Y_s - Y_i)^2} \quad (1)$$

$$ILA = \left| \frac{Y_s - Y_i}{X_s - X_i} \right| \quad (2)$$

onde s e i indicam fase superior e inferior, respectivamente, e X e Y representam as concentrações de sal e copolímero nas fases.

2.4 Partição de proteínas puras em SAB

Na etapa de partição das proteínas do soro α -la e β -lg preparou-se uma solução de proteína (50 mg/mL) misturando-se α -la e β -lg na proporção 1:1 ambas na sua forma pura.

Os experimentos de partição para os diferentes SABs foram conduzidos à temperatura de 25 °C em tubos graduados de centrífuga de 15 mL. O pH foi determinado pela mistura do copolímero com o sal. Preparou-se sistemas bifásicos com massa total de 5,0 g pela adição de quantidades conhecidas de solução estoque (concentrações em % de massa) de F68 (30%) e de sal (30%). Em todos os sistemas, previamente equilibrados, foram adicionados 50 μ L da solução de proteína anteriormente preparada. Os tubos foram fechados e agitados por 5 min e centrifugados (Eppendorf, Alemanha) durante 35 min a 2000 \times g. Os volumes de cada fase foram determinados pela leitura no próprio tubo. Em seguida, os sistemas foram deixados em repouso durante 24 horas a 25 °C, em estufa B.O.D. (Eletrolab, modelo 101M/3, Brasil) com temperatura controlada (25 °C \pm 0,5 °C), para separação das fases. As fases superiores e inferiores foram coletadas com pipetas automáticas de 1mL e seringas de 3mL, respectivamente, e acondicionadas separadamente para determinação da concentração das proteínas. Foi avaliado o efeito do sal ($C_4H_4K_2O_6$ e $C_4H_4NaO_6$).

A quantificação da concentração das proteínas do soro (α -la e β -lg) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conduzida em cromatógrafo líquido (Shimadzu[®], Japão) provido de um detector de feixe de diodos, duas bombas de alta pressão, forno, auto-injetor de amostras e software de aquisição e análise de dados (Class-VP 6.0). As proteínas foram detectadas em um detector de feixe de diodos, com comprimento de onda fixo em 210 nm. O método utilizado foi: coluna de fase reversa (C18, Shimadzu) Shim-pack VP-ODS (250 x 4.6) mm termicamente controlada (40 °C), fases móveis compostas por solução aquosa de NaCl (0,15 mol/L, pH 2,5) e acetonitrila (grau HPLC, Sigma Aldrich, EUA) a uma vazão de 1 mL/min. As soluções aquosas de NaCl (A) e Acetonitrila (B) foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose de 0.45 μ m (MilliPore[®]) e membrana de nylon de 0.22 μ m (MilliPore[®]), respectivamente e

desgaseificadas. A programação do gradiente da fase móvel é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Programação do gradiente da fase móvel

Concentrações iniciais	Concentrações finais	Tempo de Duração (min.)
100% A, 0% de B	64% A, 36% B	3
64% A, 36% B	55% A, 45% B	18
55% A, 45% B	55% A, 45% B	2
55% A, 45% B	100% A, 0% B	10

Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana de 0,45 µm (MilliPore®), sendo injetado um volume de 20 µL com fluxo de 1 mL/min com tempo de corrida de 33 minutos.

Os resultados obtidos foram analisados primeiramente em termos de coeficiente de partição da proteína “i”, $K_{P,i}$, expressos pela Equação 3.

$$K_{P,i} \equiv \frac{C_{P,S}}{C_{P,I}} \quad (3)$$

em que $C_{P,S}$ e $C_{P,I}$ correspondem às concentrações de proteína na fase superior e na fase inferior, respectivamente.

Foram calculados os coeficientes de partição de cada proteína e, no caso de ter trabalhado com uma mistura de α -la mais β -Ig, o coeficiente de partição da proteína total, K_P . O parâmetro seletividade (S) foi então calculado de acordo com a Equação 4.

$$S = \frac{K_{P,i}}{K_P} \quad (4)$$

3 Resultados e Discussões

3.1 Diagramas de equilíbrio

Na Figuras 1 é apresentada uma comparação dos resultados obtidos na titulação turbidimétrica com os da análise de fases para ambos os sistemas estudados.

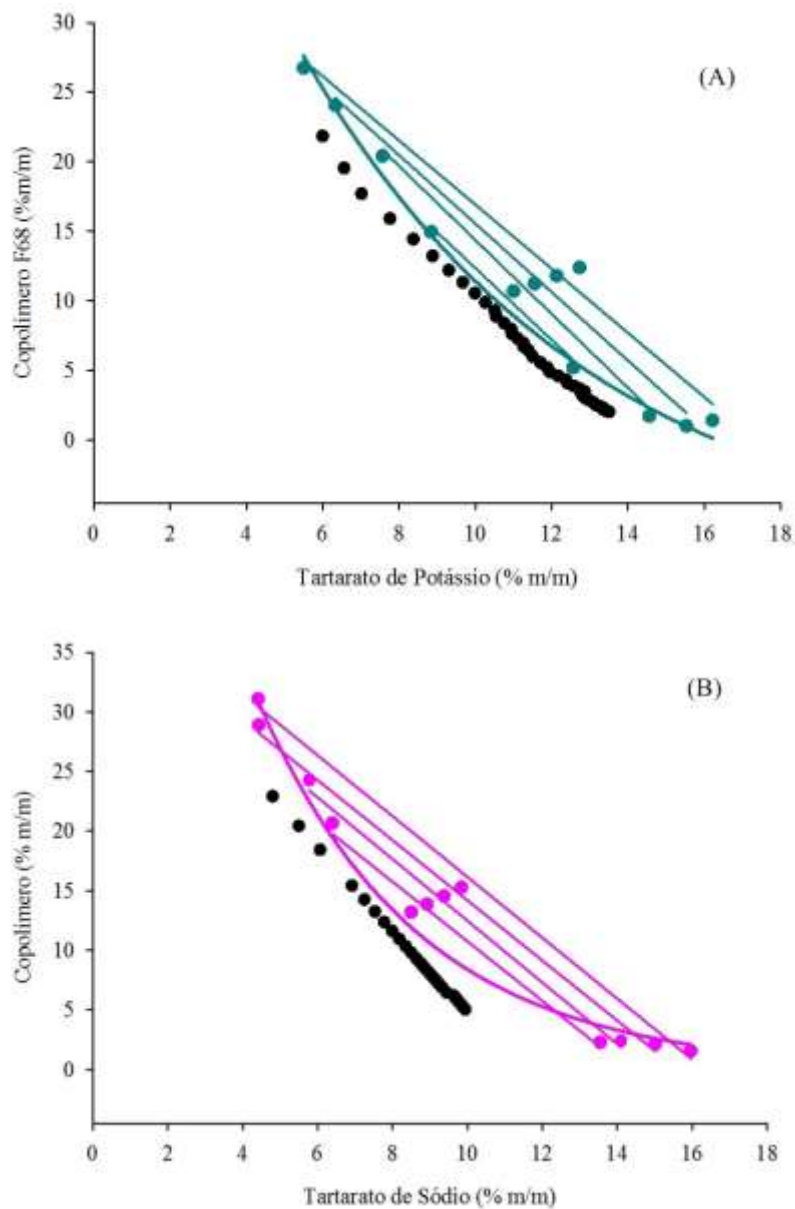


Figura 1 - Comparação dos resultados obtidos na titulação turbidimétrica com a análise de fases para os sistemas formados por: (A) F68, $C_4H_4K_2O_6$ e água; (B) F68, $C_4H_4NaO_6$ e água.

Percebe-se uma diferença entre as posições das curvas turbidimétrica e curvas binodais. Este comportamento pode ser explicado pelo tempo disponibilizado para que os sistemas entrem em equilíbrio. Durante a titulação turbidimétrica o tempo esperado foi de alguns minutos, o suficiente para que o sistema continuasse homogêneo após a adição de água. Já na preparação dos sistemas para análise dos constituintes das fases, o tempo foi de 24 horas. Um sistema que inicialmente apresenta duas fases, mas não atingiu o equilíbrio termodinâmico, poderá sofrer alterações em suas propriedades extensivas. Sabe-se que ao colocar diferentes componentes em contato, ocorrem processos de transporte como: interações entre estes, relaxação conformacional das macromoléculas e distribuição espacial dos componentes (TEIXEIRA, 2009). Beezer e colaboradores (1987), afirmam ser necessário um tempo de 18 horas para que toda dinâmica conformacional tenha sido efetuada.

Analisando o comportamento das curvas binodais dos sistemas compostos por sais, copolímero e água frente aos diferentes tipos de sais, houve deslocamento significativo da região bifásica em direção da região de menores concentrações dos constituintes quando o cátion Na^+ foi utilizado. Para este sistema a região com formação de duas fases foi maior.

A tendência de o íon sódio promover a separação de fase mais eficiente que o íon potássio pode ser devido à interação mais forte com grupos EO da cadeia do copolímero.

As composições globais e de equilíbrio da fase superior e da fase inferior dos SABS formados são mostradas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Para cada diagrama foram determinados dados para quatro linhas de amarração.

Tabela 2 – Porcentagem em massa para sistemas formados por $C_4H_4NaO_6$ (w_1), F68 (w_2) e água (w_3)

Linhas de amarração	Composição global			Fase Superior			Fase Inferior		
	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3
1	8,50	13,19	78,31	6,40	11,63	72,93	13,55	2,27	84,18
	\pm 0,007	\pm 0,005	\pm 0,003	\pm 0,08	\pm 0,13	\pm 0,21	\pm 0,17	\pm 0,32	\pm 0,08
2	8,93	13,85	77,22	5,78	24,27	69,96	14,10	2,40	83,50
	\pm 0,009	\pm 0,006	\pm 0,015	\pm 0,03	\pm 0,33	\pm 0,36	\pm 0,34	\pm 0,27	\pm 0,07
3	9,36	14,55	76,09	4,43	28,89	66,68	15,02	2,12	82,87
	\pm 0,005	\pm 0,006	\pm 0,001	\pm 0,48	\pm 0,14	\pm 0,34	\pm 0,18	\pm 0,18	\pm 0,00
4	9,84	15,26	74,90	4,41	31,08	64,51	15,96	1,54	82,50
	\pm 0,012	\pm 0,006	\pm 0,006	\pm 0,26	\pm 0,26	\pm 0,00	\pm 0,03	\pm 1,05	\pm 1,02

Tabela 3 – Porcentagem em massa para sistemas formados por $C_4H_4K_2O_6$ (w_1), F68 (w_2) e água (w_3)

Linhas de amarração	Composição global			Fase Superior			Fase Inferior		
	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3
1	11,00	10,70	78,30	8,84	14,95	76,21	12,57	5,21	82,22
	\pm 0,017	\pm 0,013	\pm 0,005	\pm 0,54	\pm 1,34	\pm 0,80	\pm 0,03	\pm 0,46	\pm 0,43
2	11,55	11,23	77,22	7,57	20,42	72,01	14,55	1,72	83,73
	\pm 0,005	\pm 0,003	\pm 0,007	\pm 1,08	\pm 1,05	\pm 0,03	\pm 0,30	\pm 0,20	\pm 0,10
3	12,12	11,77	76,11	6,33	24,04	69,63	15,53	1,02	83,45
	\pm 0,007	\pm 0,007	\pm 0,015	\pm 0,44	\pm 0,50	\pm 0,27	\pm 0,49	\pm 0,66	\pm 0,18
4	12,72	12,39	74,88	5,49	26,73	67,77	16,22	1,40	82,38
	\pm 0,000	\pm 0,008	\pm 0,008	\pm 0,01	\pm 0,29	\pm 0,30	\pm 0,11	\pm 0,24	\pm 0,13

Pode ser observado nas Tabelas 2 e 3 que a fração mássica de sal é maior na fase inferior, tanto nos sistemas formados por $C_4H_4NaO_6$ como $C_4H_4K_2O_6$. A

fase superior é rica em copolímero. Pode ser observado também que as frações mássicas da água são maiores na fase salina. Esses resultados também foram encontrados por Rodrigues e colaboradores (2010) que estudaram diagramas de equilíbrio para SABs formados por F68 e sais orgânicos em diferentes temperaturas. Os resultados para análise de fases podem ser considerados excelentes, visto que os desvios padrão foram baixos tendo o maior desvio igual a 1,34%.

Observa-se na Tabela 4 que o comprimento das linhas de amarração, para os sistemas compostos por F68 + $C_4H_4NaO_6$ são maiores, resultados que confirmam o aumento da região bifásica destes sistemas apresentada no diagrama de equilíbrio. Na Tabela 5 são apresentadas as medidas da inclinação das LAs, que para ambos os sistemas estudados apresentaram valores próximos. Os valores de inclinação das linhas de amarração encontrados para os sistemas constituídos por F68 e $C_4H_4NaO_6$ foram semelhantes aos de Rodrigues et al. (2010) para a temperatura de 25 °C.

Tabela 4 - Comprimento das linhas de amarração para os sistemas formados por F68, sal ($C_4H_4NaO_6$ e $C_4H_4K_2O_6$) e água

Linha de amarração	Sal			
	$C_4H_4NaO_6$		$C_4H_4K_2O_6$	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	19,7394	0,4840	10,4307	1,8924
2	23,3996	0,6737	19,9695	1,6513
3	28,7919	0,0797	24,7871	0,0260
4	31,7144	0,6501	27,5084	0,5318

Tabela 5 - Inclinação das linhas de amarração para os sistemas formados por F68, sal ($C_4H_4NaO_6$ e $C_4H_4K_2O_6$) e água

Linha de amarração	Sal			
	$C_4H_4NaO_6$		$C_4H_4K_2O_6$	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	2,5728	0,0043	2,6083	0,0806
2	2,6280	0,0240	2,7118	0,3570
3	2,5298	0,0764	2,5021	0,0171
4	2,5586	0,1193	2,3624	0,0283

3.2 Partição de proteínas puras em SAB

Os dados de equilíbrio líquido-líquido dos SABs formados por F68, $C_4H_4NaO_6$ e água; F68, $C_4H_4K_2O_6$ e água foram aplicados para investigar o comportamento de partição das proteínas do soro α -lactalbumina α -la e β -lg.

Em ambos os sistemas as proteínas particionaram exclusivamente para a fase salina (fase inferior) (Tabela 6). Observa-se na Tabela 7 que a seletividade foi maior para a proteína β -lg nos sistemas com $C_4H_4NaO_6$ na sua composição. Já os sistemas constituídos por copolímero + $C_4H_4K_2O_6$ apresentaram maior seletividade para a proteína α -la. Contudo, os valores foram baixos tanto para os sistemas formados por F68 e $C_4H_4NaO_6$ quanto os formados por F68 e $C_4H_4K_2O_6$, ou seja, os sistemas não foram capazes de separar as proteínas de interesse em duas fases distintas.

Tabela 6 – Coeficiente de partição das proteínas α -la e β -lg nos sistemas formados

Coeficiente de partição	C₄H₄NaO₆	C₄H₄K₂O₆
K_{α}	0,1112 \pm 0,1197	0,1942 \pm 0,0162
K_{β}	0,2046 \pm 0,0514	0,3583 \pm 0,0611

Tabela 7 – Seletividade dos sistemas formados

Seletividade	C₄H₄NaO₆	C₄H₄K₂O₆
α-la	0,3104 \pm 0,196	0,7861 \pm 0,038
β-lg	0,5712 \pm 0,056	0,4558 \pm 0,221

4 Conclusões

Neste trabalho foi analisado o efeito do tipo de sal sobre o equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos formados por F68, sal (C₄H₄NaO₆ ou C₄H₄K₂O₆) e água.

Analisando o comportamento das curvas binodais dos sistemas compostos por sais, copolímero e água frente aos diferentes tipos de sais, houve deslocamento significativo da região bifásica. Para o sistema no qual utilizou-se C₄H₄NaO₆ a região com formação de duas fases foi maior. A fração mássica de sal foi maior na fase inferior, tanto nos sistemas formados por C₄H₄NaO₆ como C₄H₄K₂O₆. A fase superior mostrou-se rica em copolímero, e verificou-se também que as frações mássicas da água são maiores na fase salina. Os resultados para análise de fases podem ser considerados excelentes, visto que os desvios padrão foram baixos sendo inferiores a 1,34%.

Na etapa de fracionamento das proteínas do soro α -la e β -lg verificou-se que em ambos os sistemas, as proteínas particionaram exclusivamente para a fase salina (fase inferior). A seletividade foi maior para a proteína β -lg nos dois sistemas, contudo, os valores foram baixos tanto para os sistemas formados por F68 e $C_4H_4NaO_6$ quanto os formados por F68 e $C_4H_4K_2O_6$, ou seja, os sistemas não foram capazes de separar as proteínas de interesse em duas fases distintas.

5 Referências Bibliográficas

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. 2nd edition, Wiley, New York. 1971.

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J.F.; HATTON, T. A. **Micellization of poly (ethylene oxide) – poly (propyleneoxide) – poly (ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: Thermodynamics of copolymer association**. *Macromolecules*, 27, p. 2414-2425. 1994.

BEEZER, A. E.; LIMA, M.C.P.; FOX, G.G.; ARRIAGE, P.; HUNTER, W. H.; SMITH, B.R. **Microcalorimetric measurement of the enthalpies of transfer of a series of ortho-alkoxyphenols and para-alkoxyphenols from water to octan-1-ol and from isotonic solution escherichia- coli cells**. *J. Chem. Soc. Farad. T.* 1, 83, p. 2705-2707, 1987.

DA SILVA, L. H. M., LOH, W. **Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas**. *Quimica Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

DE LEMOS, L. R.; CAMPOS, R. A.; RODRIGUES, G. D.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H. **Green separation of copper and zinc using triblock copolymer aqueous two-phase systems**. *Separation and Purification Technology*, 115, p. 107–113, 2013.

FREIRE, M. G.; CLÁUDIO, A. F. M.; ARAÚJO, J. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M.; LOPESAC, J. N. C.; REBELO, L. P. N. **Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids**. *The Royal Society of Chemistry, Chem Soc Rev*, (doi: 10.1039/c2cs35151j). 2012.

LI, M.; ZHU, Z. Q.; WU, Y. T.; LIN, D. Q. **Measurement of phase diagrams for new aqueous two-phase systems and prediction by a generalized multicomponent osmotic virial equation**. *Chem. Eng. Scien.*, v. 53, p. 2755-2767, 1998.

RODRIGUES, G. D.; TEIXEIRA, L. S.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; DE CARVALHO, R. M. M. **Phase diagrams of**

aqueous two-phase systems with organic salts and F68 triblock copolymer at different temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 55, n. 3, p. 1158-1165, 2010.

TEIXEIRA, L. DA SILVA. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sais em diferentes temperaturas.** 2009, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado.

CONCLUSÃO GERAL

Novos dados de equilíbrio foram obtidos para sistemas formados por líquido iônico $[C_4\text{min}][\text{BF}_4]$ + Li_2SO_4 + água; líquido iônico $[C_4\text{min}][\text{BF}_4]$ + MnSO_4 + água; copolímero (F68) + $\text{C}_4\text{H}_4\text{NaO}_6$ + água; e copolímero (F68) + $\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6$ + água. Esses novos dados foram empregados no estudo de partição das proteínas do soro α -lactalbumina (α -la) e β -lactoglobulina (β -lg).

Os sistemas formados por $[C_4\text{min}][\text{BF}_4]$, Li_2SO_4 e água conseguiram particionar as proteínas, onde a maior concentração de α -la foi detectada na fase inferior (rica em líquido iônico). Já a β -lg particionou para a fase salina (fase superior). No caso dos sistemas constituídos por $[C_4\text{min}][\text{BF}_4]$, MnSO_4 e água, ambas proteínas particionaram exclusivamente para a fase inferior. Entretanto, as concentrações de proteínas detectadas nas fases de ambos os sistemas estudados foram muito pequenas, possivelmente entraram na região de ruído do sistema de detecção do HPLC. Durante os experimentos verificou-se precipitação de proteínas na interface dos sistemas.

No caso dos sistemas formados por copolímero (F68), $\text{C}_4\text{H}_4\text{NaO}_6$ e água; e copolímero (F68), $\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6$ e água, verificou-se que em ambos os sistemas as proteínas particionaram exclusivamente para a fase salina (fase inferior) com maiores frações de água. Pode ser verificado que a seletividade foi maior para a proteína β -lg nos dois sistemas. Contudo, os valores foram baixos tanto para os sistemas formados por F68 e $\text{C}_4\text{H}_4\text{NaO}_6$ quanto os formados por F68 e $\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6$, ou seja, os sistemas não foram capazes de separar as proteínas de interesse em duas fases distintas.

Observa-se que os sistemas constituídos por líquido iônico e sal foram mais eficientes na partição das proteínas de interesse, visto que conseguiram separá-las em fases diferentes. No entanto, novos estudos são necessários a fim de averiguar condições que minimizem a precipitação de proteína na interface dos sistemas.

Esses e outros novos sistemas fornecem diretrizes que podem expandir o intervalo de aplicações da tecnologia de separação com sistemas aquosos bifásicos

e estabelecer escalas de hidrofobicidade mais amplas e mais precisas para proteínas.