

CAROLINA DE PAULA CARVALHO

**ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE FASES PARA SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLIETILENO GLICOL, SAIS E ÁGUA**

Tese 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
2004

CAROLINA DE PAULA CARVALHO

**ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE FASES PARA SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLIETILENO GLICOL, SAIS E ÁGUA**

Tese 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: 24 de Março de 2004.

Prof. Luis Antonio Minim
(Conselheiro)

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Conselheiro)

Prof. José Guilherme L. F. Alves

Prof. Efraim Lázaro Reis

Prof^ª Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

A Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades infindas de renovação e aprendizado. À minha querida mãe pelo seu amor incondicional. Ao meu pai e à minha avó Áurea pelo carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não seria possível.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela confiança, pela oportunidade e pela orientação.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva que, além de ter sido ótimo conselheiro colaborando para o desenvolvimento deste trabalho, muito contribuiu para o meu crescimento pessoal.

Ao professor Luis Antônio Minim, pela contribuição como conselheiro, não apenas durante este trabalho, mas desde o meu ingresso no Laboratório de Processos de Separação.

Ao professor José Guilherme Lembi Ferreira Alves, pelo carinho e atenção com os quais me recebia para resolver as dúvidas.

À minha família, pelo carinho.

À Fábria, pela companhia e por ter se revelado a melhor amiga de todos os momentos.

Ao Anderson, este grande amigo, pela generosidade, pelo exemplo de fé e tranqüilidade, por todas as conversas e pelas palavras de calma e incentivo nos momentos em que mais precisava.

À Isabele e à Rita, pela grande ajuda e boa vontade durante a realização dos experimentos.

Aos amigos e companheiros do laboratório Edwin, Rafael, Everaldo, Abraham, Edgard, Alice, Tarliane, Jackson, Renata, Ximena, Kelly, Roney e Fernanda.

Aos funcionários Mauro e Fernando pelo auxílio irrestrito.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, especialmente ao Nivaldo (Bilico) e ao Pio.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
NOMENCLATURA	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 1	4
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 Sistemas aquosos bifásicos	4
1.2 Equilíbrio de fases	5
1.3 Diagramas de equilíbrio.....	8
1.4 Componentes do sistema	10
1.4.1 Polietileno glicol (PEG).....	10
1.4.2 Sulfato de sódio, sulfato de lítio, citrato de sódio, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico.....	11
1.5 Proposta de um mecanismo molecular de formação de sistemas aquosos bifásicos	12
1.5.1 Efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases	16
1.5.2 Efeito da massa molar do polímero sobre o equilíbrio de fases	18
1.5.3 Efeito do tipo de sal sobre o equilíbrio de fases	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1 Reagentes.....	21
2.2 Equipamentos	21
2.3 Métodos	21
2.3.1 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos	21
2.3.2 Determinação dos dados de equilíbrio	22
2.3.2.1 Coleta das fases	22
2.3.2.2 Medida da densidade	22
2.3.2.3 Medida do volume das fases.....	23
2.3.2.4 Quantificação do teor de polietileno glicol.....	24
2.3.2.5 Quantificação do teor de água	24
2.3.2.6 Quantificação do teor de sal	24
3. BIBLIOGRAFIA:.....	26
CAPÍTULO 2	29

<i>INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TIPO DE SAL NO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR POLIETILENO GLICOL 4000, SAIS INORGÂNICOS E ÁGUA</i>	29
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4. CONCLUSÃO	38
5. BIBLIOGRAFIA.....	39
CAPÍTULO 3	41
<i>INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA MASSA MOLAR DO POLÍMERO NO EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR POLIETILENO GLICOL, FOSFATO DE POTÁSSIO E ÁGUA</i>	41
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4. CONCLUSÃO	50
5. BIBLIOGRAFIA.....	50
CAPÍTULO 4	52
<i>INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, DO TIPO DE SAL E DA MASSA MOLAR NO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR POLIETILENO GLICOL, SAIS INORGÂNICOS E ÁGUA</i>	52
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4. CONCLUSÃO	64
5. BIBLIOGRAFIA.....	65
CONCLUSÃO GERAL	66
APÊNDICE 1	67
<i>Quantificação de fosfato de potássio por espectrofotometria</i>	68

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	4
Figura 1: Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.....	10
Figura 2: Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.	12
CAPÍTULO 2	29
Figura 1: Dados de equilíbrio de fases para o sistema polietileno glicol 4000, fosfato de potássio e água, pH 7. (— —) T = 5 °C; (····) T = 25 °C; (— —) T = 35 °C, (····) T = 45 °C.	33
Figura 2: Dados de equilíbrio de fases para o sistema polietileno glicol 4000, sulfato de sódio e água, pH 7: (— —) T = 5 °C; (····) T = 25 °C; (— —) T = 35 °C, (····) T = 45 °C.....	34
Figura 3: Dados de equilíbrio de fases para o sistema polietileno glicol 4000, sulfato de lítio e água, pH 7: (— —) T = 5 °C; (····) T = 25 °C; (— —) T = 35 °C, (····) T = 45 °C.	34
Figura 4: Efeito do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol 4000, sulfato de sódio ou lítio e água, pH 7: (—○—) sulfato de lítio; (··▲··) sulfato de sódio. (a) T = 5 °C, (b) T = 25 °C, (c) T = 35 °C, (d) T = 45 °C.....	37
Figura 5: Efeito do tipo de sal sobre os dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol 4000, sal e água, pH 7: (··○··) sulfato de lítio; (··□··) sulfato de sódio, (—▼—) fosfato de potássio. (a) T = 5 °C, (b) T = 25 °C, (c) T = 35 °C, (d) T = 45 °C.....	38
CAPÍTULO 3	41
Figura 1: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietileno glicol 1500, fosfato de potássio e água, pH 7: (— —) T = 5 °C; (····) T = 25 °C; (— —) T = 35 °C, (····) T = 45 °C.....	46
Figura 2: Dados de equilíbrio de fases para o sistema polietileno glicol 4000, fosfato de potássio e água, pH 7. (— —) T = 5 °C; (····) T = 25 °C; (— —) T = 35 °C, (····) T = 45 °C.	33
Figura 3: Efeito da massa molar do polímero sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol, fosfato de potássio e água, pH 7: (—○—)PEG 1500 g/mol; (··▲··) PEG 4000 g/mol. (a) T = 5 °C, (b) T = 25 °C, (c) T = 35 °C, (d) T = 45 °C.....	49
CAPÍTULO 4	52
Figura 1: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, citrato de sódio e água, pH 7: (—●—)T = 5 °C; (··□··) T = 25 °C.....	58
Figura 2: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sulfato de sódio e água, pH 7: (—●—)T = 5 °C; (··□··) T = 25 °C.....	59
Figura 3: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sulfato de lítio e água, pH 7: (—●—)T = 5 °C; (··□··) T = 25 °C.	59

Figura 4: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 4000, sulfato de sódio e água, pH 7: (—●—) $T = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$; (—□—) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60

Figura 5: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sulfato de lítio e água, pH 7: (—●—) $T = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$; (—□—) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60

Figura 6: Efeito do tipo de ânion do sal sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sal e água, pH 7: (—●—) sulfato de sódio; (—△—) citrato de sódio. (a) $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, (b) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 62

Figura 7: Efeito do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sal e água, pH 7: (—▽—) sulfato de lítio; (—●—) sulfato de sódio. (a) $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, (b) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 63

Figura 8: Efeito do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol 4000, sal e água, pH 7: (—▽—) sulfato de lítio; (—●—) sulfato de sódio. (a) $T = 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, (b) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 63

Figura 9: Efeito da massa molar do polímero sobre os dados de equilíbrio para o sistema sulfato de lítio, PEG e água, pH 7: (—●—) PEG 1500 (—△—) PEG 4000. (a) $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, (b) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 64

Figura 10: Efeito da massa molar do polímero sobre os dados de equilíbrio para o sistema sulfato de sódio, PEG e água, pH 7: (—●—) PEG 1500 (—△—) PEG 4000. (a) $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, (b) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 64

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1 **4**

Tabela 1: Exemplos de sistemas aquosos bifásicos. 6

CAPÍTULO 2 **29**

Tabela 1: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, fosfato de potássio e água, pH 7. 32

Tabela 2: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, sulfato de sódio e água, pH 7. 33

Tabela 3: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, sulfato de lítio e água, pH 7. 34

Tabela 4: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 4000, fosfato de potássio e água. 33

Tabela 5: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 4000, sulfato de sódio e água. 34

Tabela 6: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 4000, sulfato de lítio e água. 34

CAPÍTULO 3 **41**

<i>Tabela 1: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, fosfato de potássio e água, pH 7.</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 2: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, fosfato de potássio e água, pH 7.</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 3: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 1500, fosfato de potássio e água.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 4: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 4000, fosfato de potássio e água.....</i>	<i>33</i>
CAPÍTULO 4.....	52
<i>Tabela 1: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, citrato de sódio e água, pH 7.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 2: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, sulfato de sódio e água, pH 7.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 3: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, sulfato de lítio e água, pH 7.</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 4: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, sulfato de sódio e água, pH 7.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 5: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, sulfato de lítio e água, pH 7.</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 6: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração para o sistema PEG 1500, sais e água. (A) sulfato de lítio, (B) sulfato de sódio, (C) citrato de sódio.</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 7: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração para o sistema PEG 4000, sais e água. (A) sulfato de lítio, (B) sulfato de sódio.....</i>	<i>61</i>

NOMENCLATURA

<i>F</i>	número de graus de liberdade
f_i	fugacidade da espécie <i>i</i>
<i>G</i>	energia livre de Gibbs
<i>H</i>	entalpia
<i>N</i>	número de espécies químicas
<i>P</i>	pressão
<i>S</i>	entropia
<i>T</i>	temperatura

x_i	fração molar do componente i
g_i	coeficiente de atividade da espécie i
m_i	potencial químico da espécie i
Δ	variação

Sobrescritos

<i>a</i> , <i>b</i> e <i>p</i>	fases do sistema
*	componente no seu estado puro

Subscritos

<i>sol.</i>	solução
<i>água</i>	água
<i>PEG</i>	polietileno glicol
<i>sal</i>	sal
<i>sol.</i>	solução
<i>a – a</i>	interação entre as moléculas de água
<i>p – p</i>	interação entre as moléculas de polímero
<i>s – s</i>	interação entre os íons do sal
<i>a – p</i>	interação entre a água e o polímero
<i>a – s</i>	interação entre a água e o sal
<i>p – s</i>	interação entre o polímero e o sal
<i>MIX</i>	mistura

RESUMO

CARVALHO, Carolina de Paula, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2004.
Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra.
Conselheiros: Luis Antonio Minim e Luis Henrique Mendes da Silva.

Neste trabalho foram determinados 22 diagramas de equilíbrio, com cinco linhas de amarração cada, para sistemas aquosos bifásicos compostos por polímeros de polietileno glicol (PEG), sais inorgânicos e água. As propriedades físico-químicas estudadas foram a temperatura do sistema, 5 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C, a massa molar do PEG, 1500 g/mol e 4000 g/mol e a natureza do eletrólito, fosfato de potássio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e citrato de sódio. Os dados de equilíbrio para os sistemas formados por PEG 4000 + fosfato de potássio + água, PEG 4000 + sulfato de sódio + água, PEG 4000 + sulfato de lítio + água e PEG 1500 + fosfato de potássio + água foram determinados nas quatro temperaturas avaliadas. Os sistemas compostos por PEG 1500 + sulfato de sódio + água, PEG 1500 + sulfato de lítio + água e PEG 1500 + citrato de sódio + água foram avaliados nas temperaturas de 5 °C e 25 °C. Os erros médios encontrados nos balanços de massa global, para o polímero, o sal e a água foram de 0,89 %, 6,80 %, 0,095 % e 3,26 % respectivamente. O teor de polímero nas fases foi quantificado usando medidas de índice de refração (desvio padrão médio de 0,13), o de sal por fotometria de chama (desvio padrão médio de 0,11) e a concentração da água por liofilização (desvio padrão médio de 0,34). Para a maioria dos sistemas foi observado o aumento da inclinação da linha de amarração com a elevação da temperatura. Para os sistemas PEG 4000 + sulfato de sódio + água, PEG 4000 + sulfato de lítio + água e PEG 1500 + fosfato de potássio + água, entre as temperaturas de 35 °C e 45 °C, não foi observada influência significativa da temperatura sobre os dados de equilíbrio. Quanto ao efeito da massa molar de polietileno glicol, a adição de um polímero de maior massa molar ao sistema levou a um aumento da região bifásica do diagrama de equilíbrio. Com relação à influência do tipo de sal, observou-se que os sistemas constituídos pelo sulfato de sódio possuem maior região bifásica do que aqueles formados por sulfato de lítio e citrato de sódio, sob as mesmas condições, isto é, o sulfato de sódio possui maior capacidade de induzir a separação de fases que o sulfato de lítio e o citrato de sódio.

ABSTRACT

CARVALHO, Carolina de Paula, M. S., Universidade Federal de Viçosa, March 2004. **Study of phase equilibria to aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol, salts and water.** Adviser: Jane Sélia dos reis Coimbra. Committee members: Luis Antonio Minim and Luis Henrique Mendes da Silva.

This study determined 22 equilibrium diagrams, with five tie lines each, for aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol (PEG) polymers, inorganic salts and water. The temperature of the system, 5 °C, 25 °C, 35 °C and 45 °C, the mass molar of PEG, 1500 g/mol and 4000 g/mol and the nature of the electrolyte, potassium phosphate, sodium sulfate, lithium sulfate and sodium citrate were studied. The equilibrium data for the systems formed by PEG 4000 + potassium phosphate + water, PEG 4000 + sodium sulfate + water, PEG 4000 + lithium sulfate + water and PEG 1500 + potassium phosphate + water were determined in the four studied temperatures. The systems formed by PEG 1500 + sodium sulfate + water, PEG 1500 + lithium sulfate + water and PEG 1500 + sodium citrate + water were determined at 5 °C and 25 °C. The averages of experimental errors found in the global mass balance, for the polymer, the salt and the water were about 0,89 %, 6,80 %, 0,095 % and 3,26 % respectively. The polymer grade in the phases was quantified using measures of refraction index (average standard deviation of 0,13), the salt was quantified by flame photometry (average standard deviation of 0,11) and the concentration of the water by liophilization (average standard deviation of 0,34). For the most part of the systems the increase of slope of tie line was observed with the elevation of the temperature of the system. For the systems PEG 4000 + sodium sulfate + water, PEG 4000 + lithium sulfate + water and PEG 1500 + potassium phosphate + water, between the temperatures of 35 °C and 45 °C, no significant influence of the temperature was observed on equilibrium data. As for the effect of the mass molar of polyethylene glycol, the addition of a polymer of larger molar mass to the system increases the two-phase area of the phase diagram. Regarding the influence of the type of salt, it was observed that the diagrams of systems constituted by sodium sulfate have larger two-phase area than those formed by lithium sulfate and sodium citrate, under the same conditions, that is, the sodium sulfate exhibited larger capacity to induce the phase splitting than lithium sulfate and sodium citrate.

INTRODUÇÃO

Sistemas aquosos bifásicos (SAB's) são formados através da mistura de três ou mais espécies químicas que, em determinadas faixas de composição, pH e temperatura separam-se em duas fases distintas, cujo componente majoritário, em termos globais, é a água.

Os primeiros SAB's foram relatados na literatura por Beijerinck em 1896 e foram formados a partir da mistura de soluções aquosas de gelatina e agar-agar ou gelatina e amido, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior em agar-agar ou amido (ALBERTSSON, 1960).

A utilização dos sistemas aquosos bifásicos na partição e purificação de materiais biológicos foi inicialmente proposta por Albertsson em meados da década de 50 (ALBERTSSON, 1960). Nestes casos, a extração através de SAB's é adequada para substituir a extração convencional por solventes orgânicos pois, pelo fato da água ser o solvente, estes sistemas são ambientalmente seguros e permitem a separação de partículas sensíveis à desnaturação em outros solventes (GUSTAFSSON et al., 1986).

Os SAB's utilizados na extração líquido-líquido são formados sobretudo por polímero-polímero-água ou polímero-sal-água, sendo que o último possui maiores vantagens como baixo custo, menor viscosidade e, portanto, menor tempo de separação de fases (WU et al., 1996; SALABAT, 2001).

Para otimizar o emprego dos sistemas aquosos bifásicos na partição de biocompostos é necessário o estudo do comportamento destes sistemas em diferentes composições e em variadas condições de temperatura e pH. Assim, desde 1960 diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de encontrar os SAB's mais adequados e as melhores condições para a partição e/ou concentração de células animais ou vegetais, enzimas, proteínas, ácidos nucléicos, vírus, metais, entre outros.

A base da partição em SAB's é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Esta distribuição é governada pela minimização da energia livre de Gibbs, e indiretamente por um grande número de fatores, como por exemplo: natureza e tamanho da partícula alvo; constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza do eletrólito e pH do sistema bifásico (ALBERTSSON, 1960). Por isto, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos é uma difícil tarefa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um

determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001). Daí a importância de estudar diferentes SAB's, ampliando e facilitando a utilização dos mesmos na extração líquido-líquido.

O emprego, em larga escala, dos SAB's para a extração de biomateriais não é muito difundido, apesar desta técnica oferecer grandes vantagens, como alto rendimento, rápido alcance do equilíbrio e fácil aumento da escala de trabalho, além de permitir a produção em série (KULA, 1990).

Assim sendo, este trabalho visa estudar e compreender a influência de diferentes propriedades físico-químicas no comportamento de sistemas aquosos bifásicos do tipo polímero-sal-água, além de gerar dados experimentais para a utilização, por exemplo, em estudos de predição de equilíbrio e partição de biomoléculas.

OBJETIVOS

1. Determinar dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol 4000 g/mol, fosfato de potássio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e água, em temperaturas de 5 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C.
2. Determinar dados de equilíbrio para sistemas compostos por polietileno glicol 1500 g/mol, fosfato de potássio e água, em temperaturas de 5 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C.
3. Determinar dados de equilíbrio para sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, sulfato de sódio, sulfato de lítio, citrato de sódio e água, em temperaturas de 5 °C e 25 °C.
4. Analisar os dados termodinamicamente.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Sistemas aquosos bifásicos

Em 1896, Beijerinck observou que quando soluções aquosas de amido e gelatina ou agar-agar e gelatina eram misturadas formava-se um sistema composto por duas fases líquidas onde a fase inferior era enriquecida em amido (ou agar-agar) e a fase superior em gelatina. Posteriormente, os estudos de Ostwald & Hertel (1929) com amidos de diferentes fontes mostraram que para a ocorrência da separação de fases era necessário misturar os diferentes amidos em concentrações distintas. Em 1947, Dobry & Boyer-Kawenoki testaram grande número de pares de polímeros, observando a separação de fases na maioria deles (ALBERTSSON, 1960).

Entretanto, Albertsson, em 1958, é que foi o pioneiro na utilização dos chamados sistemas aquosos bifásicos (SAB's) em processos de bioseparação (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987). Albertsson usou SAB's compostos por soluções aquosas de polietileno glicol e dextrana para a separação de diferentes biomoléculas (ALBERTSSON, 1960).

Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB's importante ferramenta na partição e/ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).

Os SAB's são, então, sistemas formados por duas fases líquidas que se encontram em equilíbrio termodinâmico. As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração, pressão, temperatura e composição. Mas como as duas fases dos SAB's estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria e energia entre as fases.

Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio.

A característica que confere ao SAB larga utilização na partição de biomateriais é a baixa tensão interfacial, quando comparada àquela existente entre uma fase aquosa e outra não aquosa. Isto ocorre pois o componente majoritário do sistema aquoso bifásico é a água. A água está em maior quantidade nas três regiões do SAB (fase superior, interface e fase inferior). Desta forma, a composição destas regiões é muito parecida, resultando em pequena diferença entre a energia livre de Gibbs das mesmas, e conseqüentemente pequeno valor de tensão interfacial.

Os sistemas aquosos bifásicos podem ser classificados em dois tipos principais, os que contêm dois polímeros diferentes e os que contêm apenas um polímero. Alguns exemplos de SAB's estão listados na Tabela 1.

Para que ocorra a separação de fases entre duas soluções aquosas de polímeros é necessário que a energia livre de Gibbs do sistema, quando os polímeros estão em fases distintas, seja minimizada. Desta forma, os dois polímeros serão coletados em duas fases distintas. Neste caso, a interação entre as moléculas dos dois polímeros distintos é de caráter repulsivo, estando o sistema em um estado energeticamente favorável quando as moléculas dos mesmos encontram-se separadas (ALBERTSSON, 1960).

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

1.2 Equilíbrio de fases

Pode-se dizer que um sistema se encontra em equilíbrio termodinâmico, quando isolado, nenhuma de suas propriedades variar em uma dimensão temporal. Caso o sistema não esteja isolado, e suas propriedades estiverem variando, este sistema não está em equilíbrio. O estado meta-estável é caracterizado por um sistema que mesmo inicialmente não isolado suas características não variam, mas após ser isolado, suas propriedades se alteram.

A variação das propriedades termodinâmicas pode ser provocada por diferentes tipos de forças motrizes. Forças mecânicas tendem a causar a transferência de energia na forma de trabalho, diferenças de temperaturas tendem a provocar transferência de energia na forma de calor, diferentes potenciais químicos tendem a acarretar reações

químicas ou transferência de substâncias de uma fase para a outra. Em um sistema em equilíbrio todas estas forças estão equilibradas (SMITH et al., 2000).

Inicialmente, pode-se concluir que este estado de equilíbrio raramente ocorre, considerando o grau de restrição das suas características. Entretanto, o equilíbrio sempre ocorrerá, em um tempo suficiente, como estado final de um sistema fechado ao fluxo de matéria, calor e trabalho através de suas superfícies (SANDLER, 1989).

Tabela 1: Exemplos de sistemas aquosos bifásicos.

Polímero	Polímero
Polipropileno glicol	Polietileno glicol (PEG) Dextrana (Dx) Polivinil álcool (PVA) Maltodextrina (MD)
Polietileno glicol	Dextrana (Dx) Ficoll Hidroxiopropil-amido (HPS) Polivinil alcohol (PVA) Polivinil pirrolidona (PVP) Maltodextrina (MD)
Polímero	Componente de baixa massa molar
Polietileno glicol e copolímeros	Sais inorgânicos: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$, Na_2HPO_4 , K_2CO_3 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4 , Na_3Cit
Polietileno glicol	Glicose, maltose
Polipropileno glicol	Sais inorgânicos: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 Glicerol

Fonte: ZASLAVSKY, 1995.

O critério termodinâmico fundamental para o equilíbrio de fases é a igualdade dos potenciais químicos ou eletroquímicos dos componentes em todas as fases do sistema (SMITH et al., 2000; LEVINE, 1995). Desta forma:

$$m_i^a = m_i^b = \dots = m_i^p \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (1)$$

sendo m_i^a , m_i^b , m_i^p os potenciais químicos da espécie i nas fases a , b até a fase p . Contudo, existem outras funções auxiliares empregadas tanto experimentalmente quanto na modelagem (CABEZAS, 1996).

Para que este critério termodinâmico seja válido para fins práticos deve-se introduzir a fugacidade na Equação 1. A fugacidade representa a pressão corrigida (na solução), e sua relação com a energia livre de Gibbs a torna útil nos cálculos de equilíbrio de fases (SANDLER, 1989):

$$\hat{f}_i^a(T, P, x_i^a) = \hat{f}_i^b(T, P, x_i^b) \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (2)$$

em que \hat{f}_i^a e \hat{f}_i^b são as fugacidades da espécie i na solução nas fases a e b .

Introduzindo o conceito de coeficiente de atividade na Equação 2, tem-se que:

$$x_i^a \times g_i^a(T, P, x_i^a) \times f_{i(T,P)} = x_i^b \times g_i^b(T, P, x_i^b) \times f_{i(T,P)} \quad (3)$$

Reduzida para:

$$x_i^a \times g_i^a(T, P, x_i^a) = x_i^b \times g_i^b(T, P, x_i^b) \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (4)$$

com i (número de componentes do sistema) variando entre 1 e N, em que x_i é a fração molar do componente i na fase especificada e g_i é o coeficiente de atividade. Como pode ser observado, a fugacidade de um componente i em uma fase líquida pode ser relacionada com o coeficiente de atividade g_i através da composição daquela fase (REID et al., 1988).

A Equação (4) pode ser utilizada com dados experimentais de equilíbrio de fases para calcular o coeficiente de atividade de um componente numa fase a partir do coeficiente conhecido do mesmo componente na outra fase (SANDLER, 1989).

Em um sistema líquido-líquido contendo N espécies químicas:

$$g_i^a = g_i(x_1^a, x_2^a, \dots, x_{N-1}^a, T, P) \quad (5)$$

$$g_i^b = g_i(x_1^b, x_2^b, \dots, x_{N-1}^b, T, P) \quad (6)$$

pode-se escrever N equações de equilíbrio com 2 N variáveis intensivas (T, P e N-1 frações molares independentes em cada fase). Conseqüentemente, a resolução das equações de equilíbrio para o ELL requer a especificação anterior dos valores numéricos de N das variáveis intensivas (SMITH et al., 2000).

Assim, para se determinar o número de variáveis necessárias para definir o estado de equilíbrio de um sistema multicomponente e multifásico, utiliza-se a Regra das Fases de Gibbs, na qual F é o número de graus de liberdade, ou seja, o número de variáveis que devem ser especificadas de forma a fixar o seu estado termodinâmico intensivo (CALLEN, 1985):

$$F = 2 - p + N \quad (7)$$

em que p é o número de fases e N é o número de espécies químicas independentes componentes do sistema. Em um sistema aquoso bifásico ($p = 2$), o número de variáveis a serem especificadas será igual ao número de espécies químicas independentes presentes no sistema.

Para descrever teoricamente o equilíbrio líquido-líquido de SAB's contendo polímeros e/ou eletrólitos as relações demonstradas nas Equações 4, 5 e 6 devem ser modificadas de acordo com a base termodinâmica desejada. Existem na literatura dois tipos principais de modelos para descrever o comportamento de fases dos SAB's, um deles é fundamentado na expansão osmótica de Virial e o outro na teoria de "lattice" (ZAFARANI-MOATTAR & GASEMI, 2002).

Muitos modelos têm sido desenvolvidos para descrever o mecanismo de separação de fases na ausência de dados experimentais. Esta tentativa visa facilitar a compreensão das interações que governam a partição de solutos e partículas em sistemas aquosos bifásicos (ZASLAVSKY, 1995).

1.3 Diagramas de equilíbrio

Os dados de equilíbrio líquido-líquido são comumente apresentados usando diagramas de fases ou diagramas de equilíbrio que são representações gráficas descritivas do comportamento do sistema em diferentes composições. Os diagramas de equilíbrio

podem ser construídos empregando tanto o sistema de coordenadas triangulares quanto retangulares (gráfico cartesiano), sendo que neste último, a concentração do solvente está implícita.

Neste trabalho será utilizada a representação cartesiana (Figura 1), que é comumente utilizada na literatura existente sobre SAB's (ZASLAVSKY, 1995).

Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. Na Figura 1, a curva que separa a região cuja composição global leva à formação de duas fases da região de composição que leva à formação de uma mistura homogênea é chamada de binodal (curva B-Pc-C). Os diagramas também contêm as linhas de amarração, que unem as composições das duas fases em equilíbrio (reta B-C). Os pontos de mistura (A, A', A'') distribuídos sobre uma mesma linha de amarração levam no equilíbrio à mesma composição nas duas fases; no entanto, as propriedades extensivas, como por exemplo o volume, de cada fase é diferente em cada ponto (ALBERTSSON, 1960).

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

$$ILA = \frac{\left[\begin{matrix} P^S \\ S^S \end{matrix} \right] - \left[\begin{matrix} P^I \\ S^I \end{matrix} \right]}{\left[\begin{matrix} P^S \\ S^S \end{matrix} \right] - \left[\begin{matrix} P^I \\ S^I \end{matrix} \right]} \quad (8)$$

sendo [P] e [S] as concentrações de polímero e sal, respectivamente. O sobrescritos S representa a fase superior e I a fase inferior.

Outra particularidade de um diagrama de fases é o ponto crítico (Pc). O ponto crítico é aquele no qual as propriedades físico-químicas (composição e volume, dentre outras) das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1960).

Como em sistemas aquosos ternários uma mudança na composição das duas fases é também resultado de uma alteração do ponto de mistura (composição global do sistema), uma maneira simples de construção de um diagrama de fases é através da determinação da composição das fases em equilíbrio para uma série de sistemas com pontos de mistura em linhas de amarração diferenciadas (ZASLAVSKY, 1995).

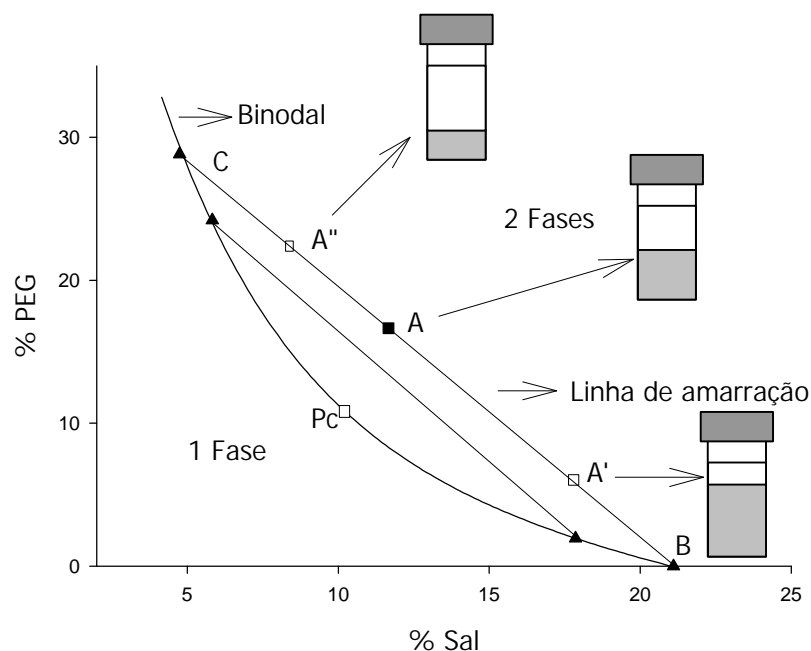


Figura 1: Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.

1.4 Componentes do sistema

1.4.1 Polietileno glicol (PEG)

O polietileno glicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico e juntamente com outros polímeros sintéticos, constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes (MURRELL & JENKINS, 1994).

Devido ao seu caráter não tóxico, pode também ser utilizado em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. Na indústria de alimentos, é regulamentada a sua utilização como veículo em adoçantes de mesa (Portaria nº 38, de 13 de janeiro de 1998) e em suplementos vitamínicos e ou minerais (Resolução - RDC nº 2, de 2 de janeiro de 2001).

Pode ser empregado na separação de macromoléculas biológicas por meio da extração líquido-líquido e da precipitação. Pode ser considerado o melhor agente precipitante na produção de cristais de proteínas, etapa decisiva na determinação da estrutura molecular das mesmas (ANNUNZIATA et al., 2002).

A maioria dos polímeros sintéticos é composta por moléculas que contêm centenas ou milhares de grupos de átomos interligados chamados de unidades. A macromolécula de

PEG é formada por apenas um tipo de unidade repetida e por isto é chamado de homopolímero. Quando esta é formada por mais de um tipo de unidade repetida é chamada de copolímero (MURRELL & JENKINS, 1994). Em seu estado cristalino, a cadeia de polietileno glicol apresenta conformação helicoidal contendo sete unidades químicas (-CH₂CH₂-O-) e duas rotações em torno da cadeia a cada 19,3 Å (URBAN, 1993).

1.4.2 Sulfato de sódio, sulfato de lítio, citrato de sódio, fosfato de potássio monobásico e fosfato de potássio dibásico

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

O sulfato de lítio (Li₂SO₄) possui solubilidade de 35,64 g/100 mL em água a 18 °C. É um componente de interesse tecnológico com aplicações na detecção de radiação a laser, como um elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência e na indústria farmacêutica. Em elevadas temperaturas, apresenta altos valores de condutividade iônica, o que torna possível a sua aplicação na armazenagem de energia e em sistemas de conversão (TABOADA, 2002).

O sulfato de lítio pode ser recuperado de soluções através da adição de agentes precipitantes (como anti-solventes), sendo esta, uma alternativa para a técnica de cristalização por congelamento e evaporação (TABOADA, 2002).

O citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇) apresenta-se na forma de cristais brancos, inodoros e estáveis em ar. Apresenta solubilidade de 42,5 g/100 mL em água a 25 °C. Possui pH entre 7,5 e 9,5 a 20 °C quando em solução de 50 g/L de citrato trissódico dihidratado em água (MERCK, 2004).

O fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) é branco, higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina (pH entre 8,7 e 9,3 quando em solução de 50 g/L d'água). Possui solubilidade em água igual a 160 g/100 mL a 20 °C (SIGMA-ALDRICH, 2001).

O fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) também possui a cor branca e é granulado. Apresenta solubilidade em água igual a 22,2 g/100 mL a 20 °C. É insolúvel em

álcool. Possui o pH entre 4,4 e 4,7 quando em solução de 50 g/L d'água (SIGMA-ALDRICH, 2001).

1.5 Proposta de um mecanismo molecular de formação de sistemas aquosos bifásicos

O mecanismo molecular para a formação dos sistemas aquosos bifásicos descrito a seguir foi proposto por DA SILVA & LOH (2000) para sistemas formados por PEG 3350, sulfato de lítio ou sulfato de sódio e água. Este modelo é fundamentado em dados calorimétricos e em dados de equilíbrio.

Para uma melhor compreensão do mecanismo proposto, deve-se conhecer a estrutura molecular do polímero, no caso do presente trabalho, o PEG [HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H]. O polietileno glicol, (Figura 2), é formado por unidades de óxido de etileno, em que cada unidade contém sítios ativos (oxigênios portadores de pares de elétrons livres), onde são formadas as interações com as moléculas de água e com os íons dissociados do sal (cátions e ânions).

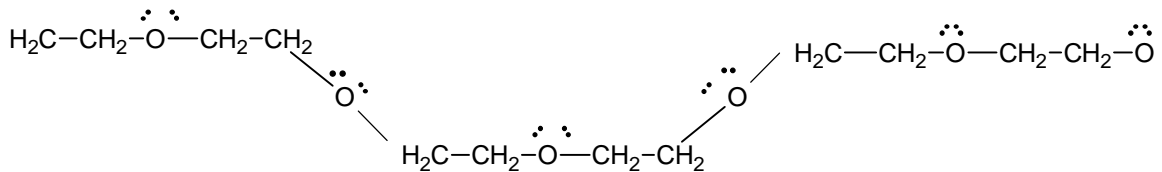


Figura 2: Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.

Quando inicialmente, PEG, sal e água são misturados, uma solução é formada em decorrência da energia livre de Gibbs (G) da solução ser menor do que o somatório das energias livres de Gibbs dos componentes puros, como relacionado pela Equação 9:

$$G_{sol.} < G_{PEG}^* + G_{sal}^* + G_{água}^* \quad (9)$$

sendo $G_{sol.}$ a energia livre de Gibbs da solução, o asterisco corresponde à cada componente no seu estado puro.

Quando em determinada proporção os três componentes são misturados, forma-se um sistema aquoso bifásico. As duas fases líquidas serão formadas após o tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido. A formação do SAB ocorre pois o somatório

da energia livre de Gibbs de cada fase é menor do que a G do sistema homogêneo naquelas concentrações de polímero e de sal (Equação 10).

$$G^a + G^b < G_{sol}. \quad (10)$$

sendo a e b as fases do sistema aquoso bifásico.

Desta forma, pode-se dizer que os SAB's são formados para diminuir a G de uma solução aquosa de PEG, sal e água, pois em determinadas proporções destes componentes, o sistema formado por duas fases separadas apresenta menor nível energético, sendo mais favorável do que a solução.

Sabendo-se que G é função da entalpia e da entropia, pode-se concluir que são estas duas propriedades termodinâmicas que determinam a separação das fases em sistemas aquosos bifásicos. Os SAB's são formados a partir da compensação dos fatores entálpicos e entrópicos de forma que se minimize a energia livre de Gibbs, à temperatura e pressão constantes.

Para que a análise entálpica de SAB's compostos por polímero-sal-água seja feita, deve-se comparar os tipos e magnitudes das interações intermoleculares antes e depois da separação das fases. Primeiramente, para que ocorra a mistura dos componentes puros, é necessário o rompimento das interações entre as moléculas de água (água-água), assim como das interações entre as moléculas do polímero (PEG-PEG) e do sal (íon-íon). Para romper estas interações, deve-se fornecer energia ao sistema. E, à medida que estas interações são quebradas outras interações são formadas, com liberação de energia, como as interações PEG-água, íon-água e PEG-íon. Desta forma:

$$\Delta_{sol}H = \underbrace{\Delta_{a-a}H + \Delta_{p-p}H + \Delta_{s-s}H}_{\text{endotérmicas}} + \underbrace{\Delta_{a-p}H + \Delta_{a-s}H + \Delta_{p-s}H}_{\text{exotérmicas}} \quad (11)$$

sendo ΔH a variação da entalpia. O subscrito a-a corresponde às interações entre as moléculas de água, p-p entre as moléculas do polímero, s-s entre as moléculas do sal, a-p entre a água e o polímero, a-s entre a água e o sal e p-s entre o polímero e o sal.

E, segundo dados experimentais de entalpia de solução, a dissolução de eletrólitos em solução aquosa de PEG é um processo exotérmico (DA SILVA & LOH, 2000). Isto

significa que na formação de uma solução aquosa de PEG e sal a liberação de energia na formação das interações (PEG-água, íon-água e PEG-íon) é maior do que a quantidade de energia absorvida na quebra das interações entre os componentes puros.

Para avaliar o efeito entrópico, deve-se analisar a entropia de duas maneiras: em relação à configuração (número de formas diferentes de se arranjar as moléculas na solução) e em relação à conformação (estrutura molecular).

Quando se mistura PEG, sal e água, aumenta-se a entropia configuracional do sistema em relação aos componentes nos estados puros, pois o aumento do tipo e da quantidade de substâncias aumenta o número de formas diferentes de se arranjar as mesmas na solução. No entanto, as interações PEG-água são caracterizadas pela formação de camadas de solvatação ao redor das moléculas de PEG, diminuindo a entropia translacional das moléculas de água. O mesmo é válido quando as interações íon-água são estabelecidas, ou seja, o grau de liberdade translacional das moléculas de água diminui devido à solvatação dos íons do sal. Mas, como ao mesmo tempo são formadas interações íon-PEG, a entropia configuracional do sistema aumenta, ou seja, para que os íons se aproximem da cadeia do polímero, as moléculas de água que antes solvatavam os íons e o PEG devem ser afastadas (quebrando as camadas de solvatação e liberando as moléculas de água no meio) possibilitando a aproximação do sal com o polímero e a interação íon-PEG. À medida que as moléculas de água são liberadas das camadas de solvatação, o grau de liberdade translacional das mesmas aumenta, com conseqüente aumento da entropia configuracional do sistema.

A entropia conformacional do polímero irá variar com a sua concentração na solução. Em soluções diluídas do polímero, as ligações carbono-carbono estão na forma TRANS, devido à sua interação com as moléculas de água, tornando a cadeia da macromolécula linear. Ao concentrar uma solução polimérica, a conformação muda espontaneamente para a forma CIS, pois as ligações passam da forma TRANS para a CIS (enovelada e mais energética) aumentando a entropia do sistema.

A partir da definição da energia livre de Gibbs pode-se vincular os efeitos entálpicos e entrópicos:

$$\Delta_{MIX} G = \Delta_{MIX} H - T\Delta_{MIX} S \quad (12)$$

sendo H a entalpia, S entropia, T a temperatura e o subscrito MIX relativo à mistura.

Desta forma, a variação da entalpia de solução na formação da solução aquosa de PEG e sal é exotérmica, ou seja, negativa e favorável para a minimização de G , mas ainda não se sabe se a entropia do sistema é positiva ou negativa. Então, se pode dizer apenas que para que ocorra a formação da solução aquosa de PEG e sal é necessário que a compensação dos fatores entálpicos e entrópicos resulte na minimização da G .

Para que ocorra a separação de fases na solução deve-se aumentar a concentração do sal até que ocorra a saturação do polímero pelo sal. Esta saturação não implica que todos os sítios do PEG estejam ocupados pelos íons do sal, mas sim que o sistema atingiu um estado energético no qual a formação de mais interações PEG-sal não é favorável. O ponto de saturação é aquele em que a densidade de cargas elétricas (dos cátions e ânions) ao longo da cadeia do polímero atingiu um ponto máximo. Este estado energético desfavorável, que leva à saturação do polímero, pode ser explicado pelo surgimento de forças de caráter repulsivo devido à aproximação de cargas de mesmo sinal ou devido a mudanças na estrutura molecular da macromolécula. As variações na estrutura molecular do polímero, e então na entropia conformacional do mesmo, podem ser provocadas por alterações na concentração da solução.

A adição de sal ao sistema saturado faz com que os íons fiquem livres na solução e voltem a ser solvatados pelas moléculas de água provocando a diminuição da entropia do sistema, com conseqüente aumento da G . Neste ponto, o estado energético da solução aquosa de PEG e sal não é mais favorável. O sistema, então, divide-se em duas fases, formando o SAB, sendo cada fase uma solução aquosa de polímero e sal. Na maioria dos sistemas formados, o componente em maior quantidade nas duas fases é a água, estando na sua maioria livre na solução, aumentando a entropia do sistema. As moléculas de água foram liberadas das camadas de solvatação ao redor do PEG e do sal para que novas interações, principalmente do tipo PEG-PEG na fase superior e íon-íon na fase inferior, pudessem ser formadas, o que aumenta a entropia do sistema.

Como foi citado anteriormente, a dissolução de eletrólitos em solução aquosa de PEG é um processo exotérmico, entretanto no momento em que ocorre a saturação do PEG pelo sal ocorre um aumento da entalpia, caracterizado por uma descontinuidade (ou seja, um salto) na curva que representa a entalpia de dissolução do sal em uma solução de PEG (DA SILVA & LOH, 2000). Por conseguinte, para minimizar a G e formar o SAB, considerando que a variação da entalpia neste processo é positiva e desfavorável, pode-se

dizer que a variação da entropia deve ser positiva (Equação 13). Por conseguinte, a formação de SAB's é governada por fatores entrópicos.

A mesma análise pode ser feita para a adição de PEG ao sistema, considerando que a proporção PEG/sal necessária à saturação é a mesma nos dois casos.

A soma de G da fase superior com a G da fase inferior, e ainda com a G da interface (onde existe um excesso de energia em relação às duas fases) é ainda menor do que a energia livre de Gibbs da solução.

1.5.1 Efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases

O efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases também será analisado quanto às propriedades termodinâmicas entalpia e entropia.

Para a análise entálpica deste processo, deve-se inicialmente considerar o efeito da temperatura na constante de equilíbrio (K) da reação de formação da interação sal-PEG após a saturação do polímero (Equação 13). Segundo DA SILVA & LOH (2000), a interação entre os íons do sal e o polímero, na formação do SAB, ocorre com absorção de energia, ou seja, esta interação é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura favorece a formação dos produtos e aumenta a intensidade da interação sal-PEG.



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

Desta forma, o favorecimento da interação sal-PEG levaria ao aumento na quantidade de sal a ser adicionado ao sistema para que ocorresse a formação do sistema aquoso bifásico. Entretanto, o aumento da temperatura leva à diminuição da quantidade de sal e conseqüente aumento da região bifásica do diagrama de equilíbrio. Assim, deve-se analisar a influência da temperatura quanto à entropia.

Quando energia na forma de calor é fornecida ao sistema e sua temperatura aumenta, a energia interna aumenta, elevando a energia cinética média das moléculas. Deste modo, as moléculas estão mais livres para se movimentarem na solução, aumentando também a sua entropia configuracional.

Ao mesmo tempo, a entropia conformacional do polímero aumenta pois o aumento da temperatura provoca o enovelamento da cadeia do polietileno glicol. Isto ocorre devido à transição das ligações carbono-carbono da forma TRANS (caracterizada pela conformação linear da macromolécula em decorrência das suas interações com as moléculas de água) para a forma CIS (enovelada) diminuindo o número de sítios ativos disponíveis para as interações com os íons do sal. Desta forma, a quantidade de sal necessária à saturação energética da cadeia do polímero e, conseqüentemente, à formação do sistema aquoso bifásico diminui, deslocando a binodal para regiões mais próximas aos eixos do diagrama de equilíbrio.

Estudos do efeito da temperatura em SAB's compostos por polímero-polímero-água mostraram que a influência da temperatura pode não ser simétrica em sistemas PEG-dextrana-água. Em alguns casos, apesar do aumento da temperatura diminuir a região bifásica (e o comprimento da linha de amarração), a concentração de dextrana variou, enquanto a concentração de PEG permaneceu praticamente constante (FORCINITI et al., 1991).

ANANTHAPADMANABHAM & GODDARD (1987) estudaram o efeito da variação da temperatura em sistemas formados por PEG 3350- Na_2SO_4 -água, a 20 °C, 40 °C e 60 °C verificando que o aumento da temperatura favoreceu a formação do sistema aquoso bifásico. A mesma conclusão foi obtida por HAMMER et al (1994) com sistemas PEG 3000-sulfato de sódio-água, em pH 5,8, a 20 °C, 30 °C e 40 °C; DA SILVA et al. (1997), com os sistemas PEG 1000-fosfato de potássio dibásico-água, em pH 7 e temperaturas de 4 °C, 25 °C e 40 °C e ZAFARANI-MOATTAR & GASEMI (2002) para sistemas PEG 6000-fosfato de amônia-água a 25 °C, 35 °C e 45 °C.

VOROS et al. (1993) avaliaram a influência da temperatura em sistemas PEG 2000- Na_2CO_3 -água a 15 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C. Os autores observaram que o aumento da temperatura levou ao aumento tanto do comprimento quanto da inclinação da linha de amarração pois, para um mesmo ponto de mistura, a concentração do polímero aumentava na fase superior, enquanto que a concentração do sal diminuía na fase inferior. MISHIMA et al. (1995) estudou os sistemas PEG 6000-fosfato de potássio dibásico-água a 15 °C, 25 °C e 35 °C e SÉ & AZNAR (2002), através do estudo do sistema PEG 4000-fosfato de potássio dibásico-água a 10 °C, 15 °C, 20 °C e 30 °C, também

concluíram que o aumento da temperatura aumentou a inclinação e o comprimento da linha de amarração.

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

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

1.5.2 Efeito da massa molar do polímero sobre o equilíbrio de fases

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

Para avaliar este comportamento, a Equação 13 será novamente analisada. Através da reação de equilíbrio, pode-se dizer que aumento da quantidade de PEG ou a adição de PEG de maior massa molar resulta no favorecimento da interação Sal-PEG e conseqüente aumento da quantidade de sal a ser adicionada ao sistema para que ocorra a separação de fases.

Por outro lado, o aumento da cadeia do polietileno glicol diminui o grau de liberdade da molécula, diminuindo a entropia configuracional e, conseqüentemente, a entropia de mistura do sistema. Simultaneamente, o aumento do tamanho da molécula do polímero ou a concentração da solução provocam o enovelamento da cadeia da macromolécula, aumentando a entropia conformacional. As ligações carbono-carbono no polímero passam da forma TRANS para a CIS (mais energética) aumentando a sua entropia. Este processo de enovelamento resulta na diminuição do número de sítios disponíveis às interações, o que contribui para que a cadeia do polímero sature com menor quantidade de sal.

Em outros trabalhos como os de ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD (1987), LEI et al. (1990), FORCINIT et al. (1991), VOROS et al. (1993), DA SILVA et al. (1997), DA SILVA & MEIRELLES (2001) e ZAFARANI-MOATTAR & SADEGHI (2001) foi também observado o mesmo comportamento, ou seja, aumento da região bifásica como consequência da maior massa molar do polímero constituinte do sistema.

1.5.3 Efeito do tipo de sal sobre o equilíbrio de fases

ALBERTSSON (1960) observou que a separação de fases em misturas contendo polieletrólitos depende fortemente da força iônica e do tipo de íon presente no sistema. Mais especificamente, verificou que a concentração de PEG necessária à separação de fases no sistema, PEG-sulfato de dextrana-água adicionado de sais, dependia do tipo de sal usado. E ainda, que se uma quantidade suficiente de sal fosse adicionada, não era necessário adicionar PEG ao sistema para que ocorresse a separação das fases. Desta forma, surgiram os primeiros SAB's do tipo polímero-sal-água.

ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD (1987) avaliaram as características dos SAB's formados por água, PEG 3350, diferentes ânions em sais de sódio ou diferentes metais em sais de sulfato. Concluíram que, em relação à indução para formação de SAB, os ânions dos sais de sódio são classificados na ordem decrescente: PO_4^{3-} > $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ > SO_4^{2-} > CO_3^{2-} > OH^- . Deste modo, quanto maior for a valência do ânion, menor será a quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico. E quanto à tendência dos sais de sulfato de formarem SAB, a ordem decrescente é: Al > Na > Mg > Fe > Zn > NH_4 > Li .

ZAFARANI-MOATTAR & GASEMI (2002) relacionaram o tamanho da região bifásica com o tamanho do cátion de sais de fosfato em sistemas formados por PEG 6000-sal-água. Concluíram então, que quanto maior o tamanho do cátion, maior a região bifásica, classificando-os na seguinte ordem decrescente: Na > K > NH_4 .

Segundo HATTI-KAUL (2001), a contribuição do ânion é mais importante do que a do cátion na indução da formação de fases e, os ânions polivalentes, como HPO_4^{-2} e SO_4^{-2} , são ainda mais efetivos na indução da separação de fases com o polietileno glicol.

Este comportamento pode ser analisado considerando dois cátions (ou dois ânions) de mesma valência. Considerando dois íons de diferentes raios e portanto diferentes densidades de carga, o íon de menor raio (e maior densidade de carga) irá interagir com o

PEG em maior proporção, favorecendo a interação Sal-PEG, resultando na maior quantidade de sal necessária à saturação da cadeia do polímero e na diminuição da região bifásica.

Além da densidade de carga, o tipo e a magnitude das interações intermoleculares são importantes na influência do eletrólito no comportamento dos sistemas aquosos bifásicos. Desta forma, em cada sistema deve-se fazer uma análise particular para a correta elucidação do efeito do tipo de sal utilizado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

- ❖ Polietileno glicol 1500 g/mol (ISO FAR, Brasil)
- ❖ Polietileno glicol 4000 g/mol (ISO FAR, Brasil)
- ❖ Fosfato de potássio monobásico e dibásico (VETEC, Brasil)
- ❖ Sulfato de sódio (VETEC, Brasil)
- ❖ Sulfato de lítio (VETEC, Brasil)
- ❖ Citrato de sódio (VETEC, Brasil)

2.2 Equipamentos

- ❖ Balança analítica M-310 (Denver Instrument, USA)
- ❖ Banho de aquecimento TE-184 (TECNAL, Brasil)
- ❖ Banho de aquecimento C10-B3 (HAAKE, Alemanha)
- ❖ Centrífuga 5804 (Eppendorf, Alemanha)
- ❖ Agitadores magnéticos (FISATON, Brasil)
- ❖ Refratômetro (AnalytikJena, Alemanha)
- ❖ Fotômetro de chama FC-180 (CELM, Brasil)
- ❖ Liofilizador (Edwards do Brasil, Brasil)

2.3 Métodos

2.3.1 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Os sistemas aquosos bifásicos compostos de PEG-sal-água foram obtidos partindo da mistura de sal, água e solução estoque de PEG 50 % m/m. A solução foi agitada magneticamente durante aproximadamente uma hora.

Os valores de pH das soluções salinas de sulfato de sódio, sulfato de lítio e citrato de sódio eram próximos de 7, não necessitando de ajustes.

Para as soluções aquosas de fosfato de potássio, o pH 7 foi obtido adicionando fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) na proporção de 1:1,82, respectivamente.

Os SAB's foram formados adicionando quantidades adequadas de PEG, sal e água em uma célula de equilíbrio, para uma massa total do sistema de 40 g. A mistura foi agitada manualmente e então centrifugada a 2000 g por 20 minutos para acelerar a formação das duas fases. Foi mantida em repouso durante 24 horas em banho termostático na temperatura desejada.

A titulação turbidimétrica foi a técnica usada preliminarmente para definir as quantidades necessárias de PEG, sal e água, para os diagramas de PEG 4000 g/mol, fosfato de potássio, 25 °C e PEG 4000, sulfato de sódio, 25 °C, para que ocorresse a separação de fases. As quantidades necessárias dos três componentes para os outros diagramas foram determinadas com base nestas duas titulações.

Todas as soluções e diluições foram preparadas cuidadosamente e usando a balança analítica na pesagem dos reagentes para que o balanço de massa fosse feito corretamente.

2.3.2 Determinação dos dados de equilíbrio

2.3.2.1 Coleta das fases

Após ser atingido o equilíbrio, e as duas fases límpidas serem observadas, uma alíquota da fase superior foi coletada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur até que restasse uma camada desta fase de aproximadamente 5 milímetros acima da interface. Este procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada.

Depois da coleta da fase superior, foi inserida, cuidadosamente, uma seringa (com agulha longa) na célula de equilíbrio, perturbando a interface o mínimo possível. Após uma hora em repouso, o equilíbrio foi restabelecido e o êmbolo da seringa foi puxado vagarosamente até que permanecesse na célula uma camada de 5 a 10 milímetros de fase inferior. As fases foram coletadas em recipientes com tampa e armazenadas sob refrigeração até que todas as análises fossem realizadas. Os componentes do sistema foram quantificados em cada fase e os diagramas de equilíbrio foram construídos.

2.3.2.2 Medida da densidade

A densidade foi determinada através do método do picnômetro, utilizando um picnômetro de 10 mL. A temperatura ambiente foi anotada para que a densidade da água,

naquela temperatura, pudesse ser conhecida. Este dado foi usado para a calibração do volume do picnômetro, que foi inicialmente pesado vazio e seco, e depois com água deionizada. A Equação 14 foi então empregada para calcular o volume do picnômetro (V). Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, amostras de cada fase foram transferidas do banho termostático (na temperatura de equilíbrio em que foi construído o sistema aquoso bifásico) para o picnômetro, fazendo o ambiente e pesando o picnômetro com a amostra da fase. Todas as massas pesadas foram anotadas, e a Equação 15 foi usada para o cálculo da densidade da fase (\mathbf{r}_{FASE}).

$$V = \frac{m_{PIC.+H_2O} - m_{PIC.}}{\mathbf{r}_{H_2O}} \quad (14)$$

$$\mathbf{r}_{FASE} = \frac{m_{PIC.+AM.} - m_{PIC.}}{V} \quad (15)$$

sendo m a massa, o subscrito $PIC.$ relativo ao picnômetro vazio, $PIC. + H_2O$ ao picnômetro com água e $PIC. + AM.$ relativo ao picnômetro com a amostra da fase.

2.3.2.3 Medida do volume das fases

Para cada tubo (ou célula de equilíbrio) foi obtida uma relação entre a massa de água e a altura da coluna de água atingida por esta massa. A partir da densidade da água, na temperatura ambiente, e da relação $\mathbf{r} = \frac{m}{V}$, a curva analítica foi construída em função do volume de água e da altura da coluna de água. Desta forma, antes da retirada das alíquotas das fases, a altura de cada fase foi medida com régua e o volume calculado. A altura da fase inferior foi lida a partir do fundo do tubo até a interface e a altura da fase superior foi calculada subtraindo a altura total (medida do fundo do tubo até a superfície da fase superior) da altura da fase inferior.

2.3.2.4 Quantificação do teor de polietileno glicol

A concentração de PEG em cada fase constituinte dos SAB's foi determinada usando medidas de índice de refração. Foi utilizado um refratômetro AnalitikJena (Alemanha) conectado a um banho termostático com temperatura controlada a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inicialmente foram preparadas soluções com concentrações conhecidas de sal (entre 5 % e 25 %) e PEG (entre 30 % e 50 %) para a construção da curva analítica, relacionando a concentração (entre zero e 50 %) com o índice de refração. Foi feita uma curva para cada par polímero-sal testado nos experimentos. A concentração do polímero foi calculada subtraindo a concentração do sal (obtida pelo método da fotometria de chama) da concentração total (obtida pelo índice de refração). Esta análise foi feita em triplicata e o desvio padrão foi calculado.

2.3.2.5 Quantificação do teor de água

A determinação do teor de água foi feita por meio da liofilização. Este método consiste basicamente na pesagem da amostra antes e após a secagem, em condições controladas e padronizadas, e parte da premissa de que toda perda de água é devido à umidade.

Foram utilizados tubos de vidro de 3 cm de diâmetro e 4 cm de altura previamente pesados sem tampa. Aproximadamente um grama de cada fase foi pesado anotando-se a massa obtida. Os tubos foram mantidos no congelador, a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas e levados ao liofilizador Edwards do Brasil (Brasil), à temperatura de $-52\text{ }^{\circ}\text{C}$ e à pressão de 12 N/m^2 , para a secagem das amostras, por 24 horas. Os tubos foram novamente pesados para o cálculo da diferença da massa correspondente à água evaporada. Esta análise foi feita em duplicata e o desvio padrão foi calculado.

2.3.2.6 Quantificação do teor de sal

A determinação do conteúdo dos sais foi feita por fotometria de chama de forma indireta, ou seja, a quantidade dos sais, nas fases, foi calculada a partir da quantificação dos respectivos cátions. Este método baseia-se no princípio de que quando um elemento é aquecido em uma chama seus elétrons são levados a um estado alto de energia, e o

retorno destes elétrons ao nível inicial de energia emite radiações características de cada elemento.

Inicialmente foi feita uma curva analítica para cada elemento (K, Li e Na). Para tal, os sais foram secos em estufa durante 2 horas, a 105 °C. Foram preparadas soluções aquosas com a concentração dos cátions variando entre 5 e 50 ppm. Construiu-se então uma curva analítica para cada elemento relacionando a leitura no fotômetro CELM FC-180 (Brasil) e a concentração do cátion. As fases foram diluídas de forma que a concentração dos cátions estivesse localizada entre as concentrações limite da curva analítica. As leituras foram feitas em triplicata e o desvio padrão foi calculado. Novas curvas analíticas eram construídas periodicamente.

3. BIBLIOGRAFIA:

ALBERTSSON, P-Å. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. Stockolm: Almquist & Wiksells, 1960. 231 p.

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

ANNUNZIATA, O.; LOMAKIN, A.; PANDE, J.; OGUN, O.; BENEDEK, G. B. Effect of polyethylene glycol on the liquid-liquid phase transition in aqueous protein solutions. *Biophysics*, v. 99, n. 22, p. 14165-14170, 2002.

CABEZAS, H. JR. Theory of Phase Formation in Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chromatography B*, v. 680, p. 3-30, 1996.

CALLEN, H. B. Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics. 3rd Ed. John Willey & Sons, Inc., 1985. 493 p.

SIGMA-ALDRICH. Catálogo de 2001.

DA SILVA, L. H. M.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Equilibrium Phase Behavior of Poly (ethylene glycol) + Potassium Phosphate + Water Two-Phase Systems at Various pH and Temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, v. 42, p. 398-401, 1997.

DA SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning *J. Chem. Eng. Data*, v. 46, p. 251-255, 2001.

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

FORCINITI, D.; HALL, C. K.; KULA, M. R. Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v. 61, p. 243-262, 1991.

GUSTAFSSON, A.; WENNERSTRUM, H.; TJERNELD, F. Aqueous polymer two-phase systems in biotechnology. *Fluid Phase Equilibria*, v. 29, p. 365-371, 1986.

HAMMER, S.; PFENNIG, A.; STUMPF, M. Liquid-Liquid and Vapor-Liquid Equilibria in Water + Poly (ethylene glycol) + Sodium Sulfate. *J. Chem. Eng. Data*, v. 39, p. 409-413, 1994.

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

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

LEI, X.; DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Equilibrium Phase Behavior of the Poly (ethylene glycol)/Potassium Phosphate/Water Two-Phase System at 4 °C. *J. Chem. Eng. Data*, v. 35, p. 420-423, 1990.

LEVINE, I. N. *Physical Chemistry*. 4th Ed. New York: McGraw-Hill, 1995. 901 p.

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

MERCK. Disponível em: <<http://chemdat.merck.de>>. Acesso em: 10/01/2004.

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

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

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. *The Properties of Gases & Liquids*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1988. 741 p.

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*, v. 187-188, p. 489-498, 2001.

SANDLER, S. I. *Chemical Engineering Thermodynamics*. 2 th ed. New York: Wiley series in chemical engineering, 1989. 622 p.

SÉ, R. A. G.; AZNAR, M. Liquid-Liquid Equilibrium of the Aqueous Two-Phase System Water + PEG 4000 + Potassium Phosphate at Four Temperatures: Experimental Determination and Thermodynamic Modeling. *J. Chem. Eng. Data*, v. 47, p. 1401-1405, 2002.

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

TABOADA, M. E. Liquid-liquid and solid-liquid equilibrium of the 1-propanol + lithium sulfate + water system at 25, 35 and 45 °C. *Fluid Phase Equilibria*, v. 5111, p. 1-11. 2002.

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

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.

WU, Y-T; LIN, D-Q; ZHU, Z-Q; MEI, L-H. Prediction of liquid-liquid equilibria of polymer-salt aqueous two-phase systems by a modified Ptizer's virial equation. *Fluid Phase Equilibria*, v. 124, p. 67-79, 1996.

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

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase 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.

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

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TIPO DE SAL NO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR POLIETILENO GLICOL 4000, SAIS INORGÂNICOS E ÁGUA

RESUMO

Neste estudo foram determinados dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol (PEG) 4000 + sulfato de sódio + água, PEG 4000 + sulfato de lítio + água, PEG 4000 + fosfato de potássio + água a 5 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C , em pH 7. De uma forma geral, foi observado que o aumento da temperatura foi acompanhado pela elevação da inclinação da linha de amarração e pela redução da quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico. Quanto ao efeito do tipo de eletrólito, a capacidade para indução da formação de fases em ordem decrescente foi sulfato de sódio > fosfato de potássio > sulfato de lítio. O erro percentual médio do balanço de massa global após a determinação da concentração dos três componentes nas duas fases em equilíbrio foi de 0,69 %. Os resultados analíticos foram analisados de acordo com o modelo termodinâmico proposto por DA SILVA & LOH, 2000.

Palavras-chave: equilíbrio de fases, polietileno glicol 4000 g/mol, fosfato de potássio, sulfato de sódio, sulfato de lítio, temperatura.

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) são formados por espécies químicas que, quando misturadas em determinadas faixas de composição e temperatura dividem-se em duas fases com composições diferentes. O componente majoritário destes sistemas é a água. Soluções aquosas de polímeros formam sistemas bifásicos com sais inorgânicos, ou com outros polímeros hidrofílicos estruturalmente diferentes, possuindo assim um grande emprego em biotecnologia para separação e purificação de biomateriais (ZAFARANI-MOATTAR & SADEGHI, 2001).

Para empregar os SAB's na partição de biocompostos é necessária a avaliação do comportamento destes sistemas em diferentes composições e em variadas condições de

temperatura e pH. Assim, desde 1960, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de encontrar os SAB's mais adequados, e as melhores condições para a partição e/ou concentração de células animais ou vegetais, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).

Existem dois tipos principais de SAB's, aqueles compostos por polímero-polímero-água e os formados por polímero-sal-água. Estes apresentam maiores vantagens como menor viscosidade, e portanto menor tempo de separação das fases, e baixo custo quando comparados com sistemas polímero-polímero-água (WU et al., 1996; SALABAT, 2001).

Dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água são os que estão disponíveis em maior número na literatura (ALBERTSSON, 1960; LEI et al., 1990; SNYDER et al., 1992; PENG et al., 1994; MISHIMA et al., 1995; GROSSMANN et al., 1995; DA SILVA et al., 1997; MISHIMA et al., 1998; DA SILVA & MEIRELLES, 2001; SÉ & AZNAR, 2002). Entretanto, estes tipos de dados são escassos para SAB's constituídos por PEG, água e sulfato de sódio (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987; SNYDER et al., 1992; HAMMER et al., 1997; SALABAT, 2001) ou para PEG, água e sulfato de lítio (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987; DA SILVA & LOH, 2000). Em adição, não foram encontradas referências comparando o comportamento de SAB's formados por fosfato de potássio, sulfato de sódio e sulfato de lítio a 5 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C.

A base da partição em SAB's é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Esta distribuição é governada por: natureza e tamanho da partícula alvo; constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza do eletrólito e pH do sistema bifásico (ALBERTSSON, 1960). Assim, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos é uma difícil tarefa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001). Daí a importância de estudar diferentes SAB's, ampliando e facilitando a utilização dos mesmos na extração líquido-líquido.

Este trabalho visa disponibilizar novos dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol, diferentes sais inorgânicos e água, em pH 7, e a

quatro temperaturas, analisando termodinamicamente os efeitos da temperatura e do tipo de sal no equilíbrio de fases.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: O polietileno glicol, de massa molar média de 4000 g/mol foi adquirido da ISOFAR (Brasil), o fosfato de potássio mono e dibásico, o sulfato de sódio e o sulfato de lítio da VETEC (Brasil), todos de grau analítico.

Preparo dos SAB's: Os sistemas PEG-sal-água foram formados a partir da mistura de sal, água e solução estoque de PEG 50 % m/m em uma célula de equilíbrio, com massa total do sistema de 40 g. Os valores de pH das soluções salinas de sulfato de sódio, sulfato de lítio e citrato de sódio eram próximos de 7, não necessitando de ajustes. Para as soluções aquosas de fosfato de potássio, o pH 7 foi obtido adicionando fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) na proporção de 1:1,82, respectivamente. A mistura foi agitada manualmente e então centrifugada (Eppendorf, 5804, Alemanha) a 2000 g por 20 minutos para acelerar a separação das duas fases. Em seguida, o sistema foi mantido em repouso durante 24 horas em um banho termostático (TECNAL, TE-184, Brasil) na temperatura desejada $\pm 0,1$ °C. Todas as soluções e diluições foram preparadas cuidadosamente, usando uma balança analítica (Denver Instrument, M-310, USA) com sensibilidade de 0,1 mg, na pesagem dos reagentes, para que o balanço de massa fosse feito corretamente. A densidade foi determinada através do método do picnômetro.

Quantificação dos teores de PEG, sal e água: A concentração de PEG em cada fase constituinte dos SAB's foi determinada usando medidas de índice de refração. Foi utilizado um refratômetro (AnalytikJena, Alemanha) conectado a um banho termostático (HAAKE, C10-B3, Alemanha) com temperatura controlada a 30 °C $\pm 1,0$ °C. A determinação do teor de água foi feita por meio de liofilização (Edwards do Brasil, Brasil). As amostras foram mantidas em congelador, a -12 °C, durante 24 horas e em seguida liofilizadas (temperatura de -52 °C e pressão de 12 N/m²) para a secagem das amostras, por 24 horas. A determinação do conteúdo dos sais foi feita por fotometria de chama (CELM, FC-180, Brasil) de forma indireta, ou seja, a quantidade dos sais, nas fases, foi calculada a partir da quantificação dos respectivos cátions. Os dados de concentração dos

componentes, juntamente com o valor de densidade e do volume de cada fase, foram utilizados para os cálculos dos balanços de massa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As composições de equilíbrio dos SAB's compostos por PEG 4000 + sulfato de sódio + água, PEG 4000 + sulfato de lítio + água, PEG 4000 + fosfato de potássio + água estão apresentadas nas Tabelas 1, 2 e 3. Foram determinadas cinco linhas de amarração em cada diagrama. Os desvios padrões encontrados para as análises foram de 0,15 para a quantificação do PEG, 0,20 para o sal e 0,44 na quantificação da água.

Tabela 1: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, fosfato de potássio e água, pH 7.

<i>TOTAL</i>			<i>FASE SUPERIOR</i>			<i>FASE INFERIOR</i>		
<i>PEG</i>	<i>Sal</i>	<i>Água</i>	<i>PEG</i>	<i>Sal</i>	<i>Água</i>	<i>PEG</i>	<i>Sal</i>	<i>Água</i>
5 °C								
17,31	9,50	73,19	28,17	4,09	67,99	0,00	20,23	78,57
19,31	10,36	70,34	31,74	3,73	65,13	0,00	22,92	75,20
21,48	11,60	66,93	36,25	2,98	61,47	0,00	27,52	68,55
23,52	12,81	63,67	40,17	2,61	57,76	0,00	29,10	67,72
25,21	13,77	61,02	43,39	2,32	54,66	0,00	34,69	64,89
25 °C								
17,56	9,49	72,95	30,17	3,77	66,97	0,00	18,59	81,23
20,17	10,67	69,16	36,95	2,18	61,99	0,00	22,20	76,64
21,90	11,54	66,57	40,39	1,45	59,24	0,00	24,66	74,13
23,34	12,49	64,17	41,99	1,27	56,92	0,00	27,38	71,86
25,52	13,65	60,83	46,76	0,55	52,90	0,00	30,32	67,36
35 °C								
17,26	9,17	73,56	31,52	2,55	66,67	0,00	17,85	82,33
19,10	10,07	70,83	35,72	1,95	63,09	0,65	19,28	79,10
21,10	11,13	67,77	39,70	1,83	59,40	0,50	22,04	75,90
23,60	12,21	64,19	44,15	1,43	55,70	1,75	24,05	72,45
25,25	13,70	61,05	47,77	1,56	52,40	1,48	27,58	68,16
45 °C								
16,65	8,65	74,69	30,87	2,93	66,51	1,05	15,64	81,05
18,60	9,84	71,56	36,66	2,41	61,88	1,08	18,21	76,95
20,54	10,63	68,83	39,19	2,04	59,84	0,00	21,69	74,35
23,11	12,01	64,88	43,61	1,60	55,08	1,22	23,92	69,55
24,50	12,52	62,98	46,92	1,41	53,90	0,11	26,71	69,75

Tabela 2: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, sulfato de sódio e água, pH 7.

<i>TOTAL</i>			<i>FASE SUPERIOR</i>			<i>FASE INFERIOR</i>		
PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água
5 °C								
8,61	8,02	83,38	16,91	4,96	76,98	0,78	12,33	89,43
11,27	9,02	79,71	24,73	3,20	70,47	0,00	15,14	88,93
12,37	9,99	77,63	29,12	2,26	67,24	0,00	17,42	86,33
14,86	10,95	74,19	33,69	1,76	61,67	0,00	19,35	82,30
17,17	11,81	71,02	37,30	1,50	60,45	0,00	22,30	79,75
25 °C								
8,74	7,65	83,62	16,38	4,96	78,54	1,14	10,33	88,06
11,13	9,12	79,75	27,71	2,96	68,31	0,00	14,16	86,48
12,80	10,05	77,16	32,38	2,04	64,65	0,00	15,15	84,72
14,98	10,40	74,62	34,59	1,55	61,63	0,00	17,48	83,37
17,23	11,08	71,69	40,50	1,00	57,41	0,19	19,04	80,40
35 °C								
8,64	7,95	83,41	20,67	3,95	74,35	1,43	10,19	88,09
11,19	9,01	79,80	29,25	2,57	67,11	0,00	13,16	86,74
12,81	9,97	77,22	34,33	1,90	63,10	0,01	14,63	84,85
15,20	10,68	74,12	38,10	1,54	59,13	0,00	16,75	82,93
16,90	10,80	72,30	37,90	1,45	58,09	0,00	17,70	81,94
45 °C								
19,28	6,60	74,12	27,78	2,89	67,86	0,00	13,02	87,81
22,43	7,33	70,25	34,15	2,09	62,91	0,00	14,22	86,02
24,90	7,87	67,23	37,26	1,92	58,74	0,00	16,48	84,06
28,14	8,58	63,28	42,34	1,35	55,56	0,00	18,57	81,41
33,31	9,89	56,80	48,32	0,95	48,97	0,00	22,65	77,22

Os balanços de massa apresentam erro percentual médio relativo de 0,69 % para o balanço de massa global, de 1,94 % para o PEG, de 0,57 % para o sal e de 0,12 % para a água.

Nas Tabelas 1 e 2, os valores negativos de frações mássicas foram substituídos por zero. Os valores negativos encontrados estavam dentro do erro experimental.

Tabela 3: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, sulfato de lítio e água, pH 7.

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

A influência da temperatura sobre os dados de equilíbrio pode ser observada nos diagramas de fases nas Figuras 1 a 3. Para auxiliar a análise deste efeito serão utilizados os valores da inclinação da linha de amarração (ILA) para os três sistemas que estão listados nas Tabelas 4, 5 e 6.

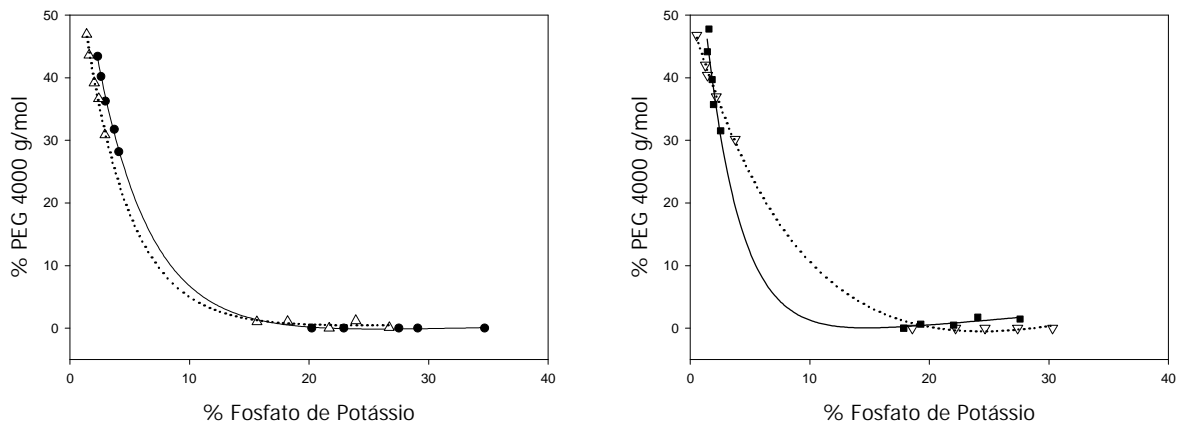


Figura 1: Dados de equilíbrio de fases para o sistema polietileno glicol 4000, fosfato de potássio e água, pH 7. (—●—) T = 5 °C; (·····△·····) T = 25 °C; (---□---) T = 35 °C, (-·-·-) T = 45 °C.

Tabela 4: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 4000, fosfato de potássio e água.

LINHAS DE AMARRAÇÃO	TEMPERATURAS			
	5 °C	25 °C	35 °C	45 °C
1	1,746	2,035	2,059	2,346
2	1,654	1,846	2,023	2,251
3	1,477	1,741	1,940	1,993
4	1,516	1,609	1,874	1,900
5	1,340	1,571	1,779	1,850

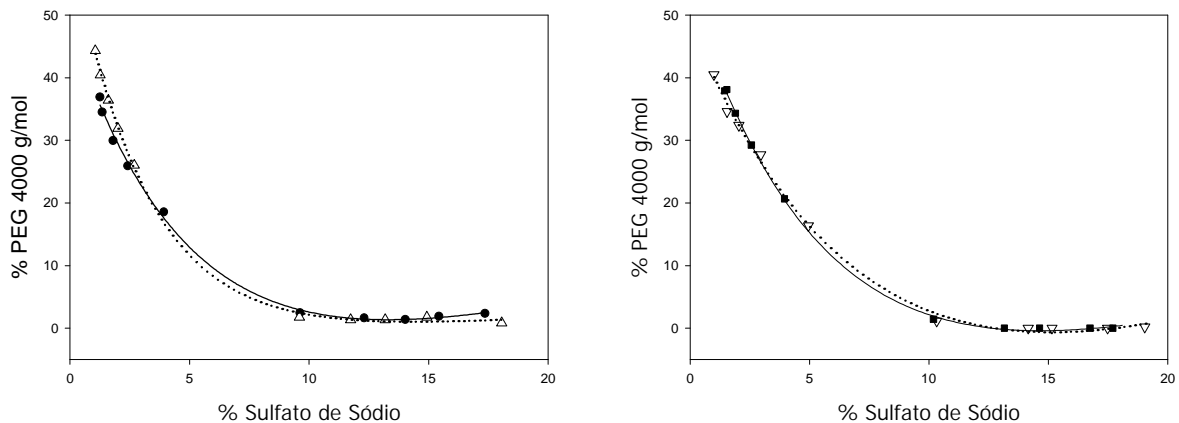


Figura 2: Dados de equilíbrio de fases para o sistema polietileno glicol 4000, sulfato de sódio e água, pH 7: (—●—) T = 5 °C; (—△—) T = 25 °C; (—□—) T = 35 °C, (—▽—) T = 45 °C.

Tabela 5: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 4000, sulfato de sódio e água.

LINHAS DE AMARRAÇÃO	TEMPERATURAS			
	5 °C	25 °C	35 °C	45 °C
1	2,188	2,836	3,083	2,821
2	2,071	2,474	2,761	2,913
3	1,921	2,470	2,694	2,611
4	1,914	2,171	2,506	2,506
5	1,794	2,235	2,332	2,283

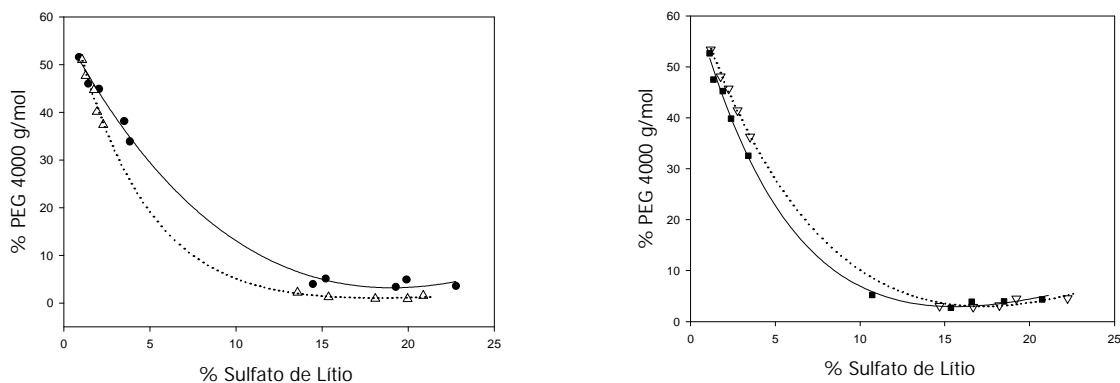


Figura 3: Dados de equilíbrio de fases para o sistema polietileno glicol 4000, sulfato de lítio e água, pH 7: (—●—) T = 5 °C; (·····) T = 25 °C; (---□---) T = 35 °C, (-.-.-◇-.-.-) T = 45 °C.

Tabela 6: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 4000, sulfato de lítio e água.

LINHAS DE AMARRAÇÃO	TEMPERATURAS			
	5 °C	25 °C	35 °C	45 °C
1	2,810	2,977	3,746	3,117
2	2,822	2,782	2,866	2,890
3	2,408	2,669	2,822	2,677
4	2,222	2,501	2,542	2,500
5	2,191	2,324	2,468	2,495

Na Tabela 4, relativa ao sistema PEG 4000 + fosfato + água, pode-se observar, para cada linha de amarração, o aumento da inclinação da linha de amarração (ILA) com a elevação da temperatura. Esta variação é mais acentuada quando a diferença de temperatura é maior. Assim, quando a temperatura aumenta de 5 °C para 25 °C a inclinação aumenta 13,8 %, entretanto quando aumenta de 25 °C para 35 °C, assim como de 35 °C para 45 °C, os aumentos das ILA's são de 9,9 % e 6,9 %, respectivamente.

Para os sistemas formados por PEG 4000 + sulfato de sódio + água e PEG 4000 + sulfato de lítio + água observa-se que o aumento da ILA com a temperatura é crescente entre 5 °C e 35 °C (Tabelas 5 e 6). Entre 5 °C e 25 °C o aumento é de 14,8 % e entre 25 °C e 35 °C é de 9,4 %. Porém, quando a temperatura varia de 35 °C para 45 °C a ILA sofre um decréscimo. Considerando que a variação da inclinação neste intervalo de temperaturas é pequena (-3,56 %) em relação ao aumento da mesma nos outros

intervalos estudados, pode-se dizer que o comportamento destes SAB's não é significativamente influenciado pela variação da temperatura na faixa de 35 °C a 45 °C.

A ILA é uma medida de como as composições das fases variam com a modificação de propriedades do sistema. O valor da inclinação é calculado pela relação entre a variação da quantidade de polímero e a variação da quantidade de sal nas duas fases em equilíbrio ($\Delta P / \Delta S$). O aumento da ILA ocorre devido à diminuição da quantidade de sal na fase inferior e/ou ao aumento da quantidade de polímero na fase superior.

Para que ocorra a variação da concentração de PEG e de sal nas fases superior e inferior, respectivamente, é necessário que ocorra a transferência da água de uma fase para a outra. Neste caso, como pode ser observado nas Tabelas 1, 2 e 3, o aumento da ILA com a elevação da temperatura acontece devido à transferência de água da fase superior para a fase inferior, resultando na diminuição da concentração de sal na fase inferior e aumento da concentração de PEG na fase superior.

Quanto à entalpia, pode-se dizer que o aumento da temperatura desloca o equilíbrio da reação de formação do complexo sal-PEG, favorecendo esta interação, pois segundo DA SILVA & LOH (2000), a interação entre os íons do sal e o polímero, na formação do SAB, ocorre com absorção de energia, ou seja, esta interação é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura desloca o equilíbrio para os produtos da reação, favorecendo a interação sal-PEG, o que aumentaria a quantidade de sal necessária à formação do SAB. Desta forma, deve-se fazer a análise entrópica do comportamento do sistema.

Com o aumento da temperatura, a entropia conformacional do polímero aumenta devido ao processo de enovelamento da cadeia e conseqüente diminuição da solubilidade do mesmo em água. Desta forma, ocorre uma transferência de água da fase superior para a fase inferior, reduzindo a concentração de sal na fase inferior e aumentando a ILA. Assim, confirma-se a predominância da influência da entropia sobre a entalpia no comportamento dos SAB's.

A Figura 4 ilustra o efeito do tipo de cátion em sais de sulfato nas temperaturas avaliadas. Foi observado o mesmo comportamento nas quatro temperaturas: o sistema constituído por sulfato de sódio possui maior capacidade de indução à separação de fases, ou seja, de formação do sistema aquoso bifásico do que o sulfato de lítio, sob as mesmas condições. Este comportamento pode ser explicado pelo fato do átomo de lítio possuir

menor raio e maior densidade de carga do que o átomo de sódio, desta forma, o sal irá interagir com o PEG em maior proporção, aumentando a quantidade de sal necessária à saturação da cadeia do polímero e conseqüente formação do SAB. Desta forma, a região bifásica do diagrama de equilíbrio do sistema PEG, sulfato de lítio, água é menor do que a do sistema PEG, sulfato de sódio, água.

Entretanto, como pode ser observado nas Tabelas 5 e 6, o sistema formado por sulfato de lítio apresenta linhas de amarração mais inclinadas do que aquele formado por sulfato de sódio. Assim, a diminuição do raio iônico do sal aumenta a inclinação da linha de amarração enquanto diminui a região bifásica. Isto indica que o aumento da concentração de PEG na fase superior é maior do que o aumento da concentração de sal na fase inferior, o que também pode ser explicado pela transferência de água da FS para a FI, resultando no aumento da ILA.

Ao mesmo tempo, a Figura 4 evidencia a diminuição da diferença da capacidade indutora dos sais de lítio e sódio com o aumento da temperatura. Isto ocorre pois, a interação sal-PEG na formação dos SAB's é endotérmica, ou seja, a formação dos SAB é favorecida pelo aumento da temperatura, cuja influência se sobrepõe à dos eletrólitos.

Na Figura 5 verifica-se que o diagrama de fases formado pelo fosfato de potássio apresenta maior região bifásica que o do sulfato de lítio e menor região bifásica quando comparado com o do sulfato de sódio. Apesar do fosfato de potássio não possuir o cátion ou o ânion semelhante aos outros dois sais, apresentou um comportamento similar ao sulfato de potássio, como foi descrito por ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD (1987). Sabendo que a capacidade indutiva do fosfato à formação de fases é maior do que a do sulfato, assim como a do sódio é maior do que a do potássio, pode-se dizer que a capacidade indutiva do cátion sódio (do sulfato de sódio) é predominante sobre a capacidade do ânion fosfato (do fosfato de potássio) ao comparar o sulfato de sódio com o fosfato de potássio. E que a capacidade indutiva de formação de SAB's tanto do ânion fosfato quanto do cátion potássio (do fosfato de potássio) são maiores do que a do ânion sulfato e do cátion lítio (do sulfato de lítio).

Os cátions e ânions, dos sais constituintes dos SAB's, exercem a mesma influência sobre o comportamento dos diagramas de fases. O cátion (ou o ânion) de menor raio possui maior densidade de carga e portanto, a sua interação com o polímero ocorre em

maior proporção, resultando na maior quantidade de sal necessária à saturação da cadeia da macromolécula.

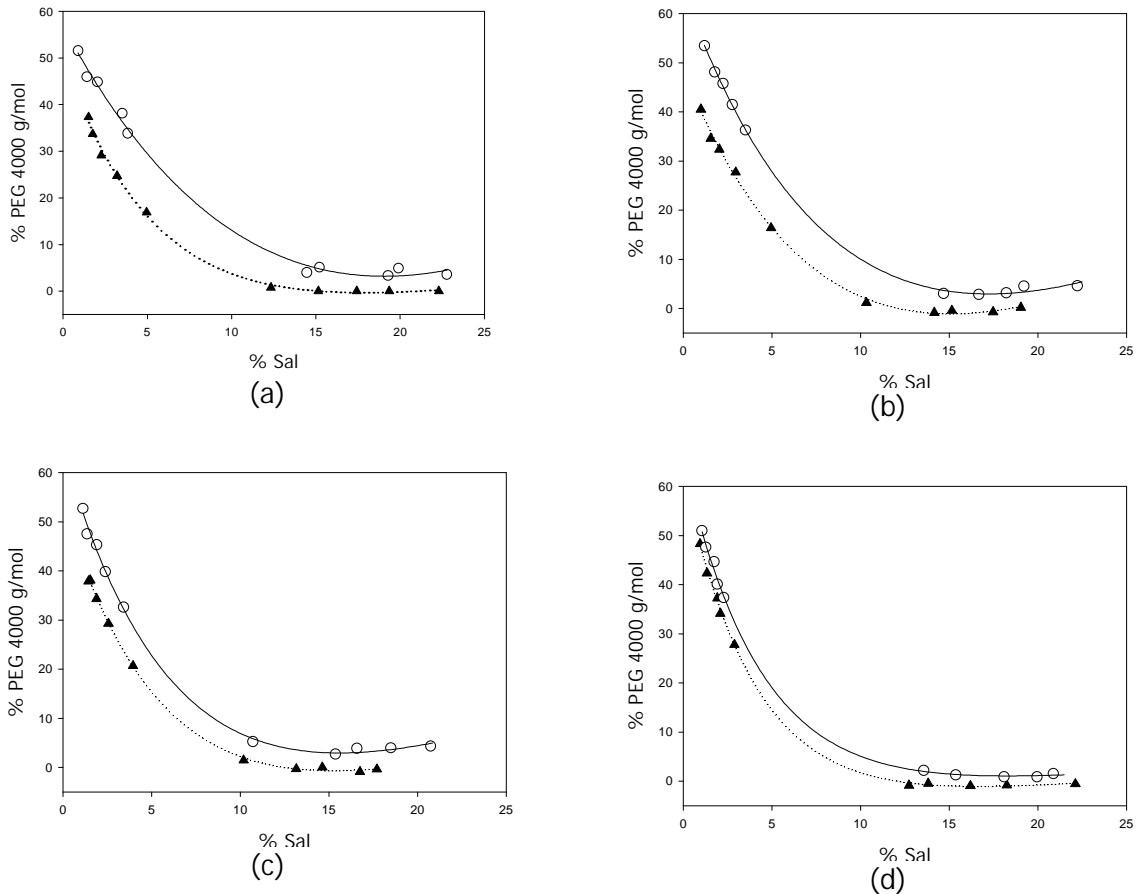


Figura 4: Efeito do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol 4000, sulfato de sódio ou lítio e água, pH 7: (—○—) sulfato de lítio; (···▲···) sulfato de sódio. (a) T = 5 °C, (b) T = 25 °C, (c) T = 35 °C, (d) T = 45 °C.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura existente: SÉ & AZNAR (2002), ZAFARANI-MOATTAR & GASEMI (2002), FORCINITI et al. (1991), MISHIMA et al. (1995), HAMMER et al (1994), VOROS et al. (1993), ANANTHAPADMANAHAM & GODDARD (1987) são alguns autores que estudaram a influência da temperatura e ZAFARANI-MOATTAR & GASEMI, (2002); ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, (1987) avaliaram a influência do sal obtendo resultados similares.

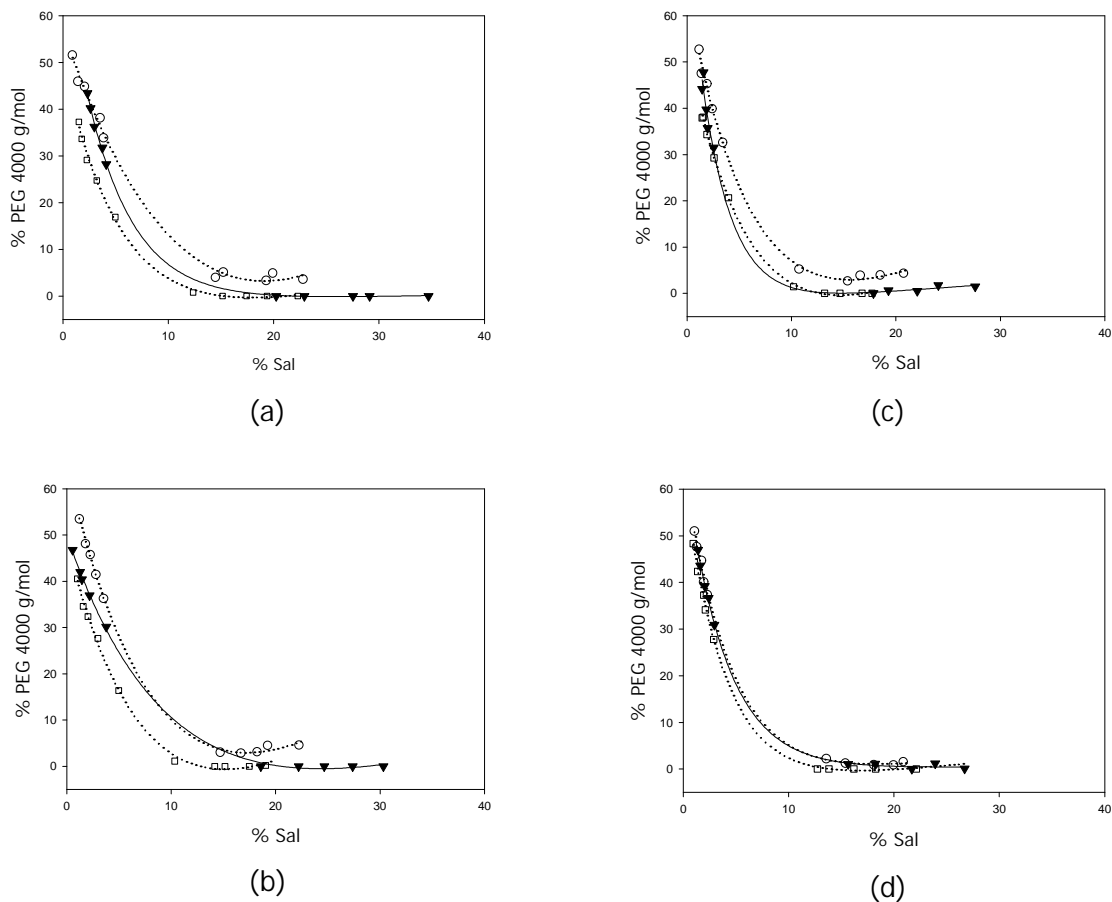


Figura 5: Efeito do tipo de sal sobre os dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol 4000, sal e água, pH 7: (○) sulfato de lítio; (□) sulfato de sódio, (▼) fosfato de potássio. (a) T = 5 °C, (b) T = 25 °C, (c) T = 35 °C, (d) T = 45 °C.

4. CONCLUSÃO

As influências da temperatura e da natureza do sal sobre o equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos formados por polímero, sal e água foram analisadas. Observou-se, de uma forma geral, uma redução da quantidade de sal necessária à formação do sistema bifásico quando a temperatura é aumentada. Este comportamento foi verificado através do aumento da região bifásica e da inclinação da linha de amarração.

A influência do tipo de sal é dependente do tamanho do raio do cátion e do ânion. Ao comparar o tamanho do cátion, empregando o sulfato de lítio e o sulfato de sódio,

verificou-se que o sulfato de sódio possui maior capacidade de induzir a formação do SAB do que o sulfato de lítio, produzindo um diagrama com maior região bifásica.

Pôde-se observar que o fosfato de potássio apresentou comportamento similar ao sulfato de potássio, ou seja, maior capacidade de indução de separação de fases do que o sulfato de lítio e menor do que o sulfato de sódio.

5. BIBLIOGRAFIA

ALBERTSSON, P-Å. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. First Edition. Stockolm: Almquist & Wiksells, 1960. 231 p.

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

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

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

DA SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning *J. Chem. Eng. Data*, v. 46, p. 251-255, 2001.

FORCINITI, D.; HALL, C. K.; KULA, M. R. Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v. 61, p. 243-262, 1991.

GROSSMANN, C.; TINTINGER, R.; ZHU, J.; MAURER, G. Aqueous two-phase systems of poly (ethylene glycol) and di-potassium hydrogen phosphate with and without partitioning biomolecules - Experimental results and modeling of thermodynamic properties. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, v. 99, n. 5, p. 700-712, 1995.

HAMMER, S.; PFENNIG, A.; STUMPF, M. Liquid-Liquid and Vapor-Liquid Equilibria in Water + Poly (ethylene glycol) + Sodium Sulfate. *J. Chem. Eng. Data*, v. 39, p. 409-413, 1994.

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

LEI, X.; DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Equilibrium Phase Behavior of the Poly (ethylene glycol)/Potassium Phosphate/Water Two-Phase System at 4 °C. *J. Chem. Eng. Data*, v. 35, p. 420-423, 1990.

MISHIMA, K.; MATSUYAMA, K.; EZAWA, M.; TARUTA, Y.; TAKARABE, S.; NAGATANI, M. Interfacial tension of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) and dipotassium hydrogenphosphate. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 313–318, 1998.

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

PENG, Q.; LI, Z.; LI, Y. Thermodynamics of potassium hydrogen phosphate potassium dihydrogen phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v. 95, p. 341-357, 1994.

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*, v. 187-188, p. 489-498, 2001.

SÉ, R. A. G.; AZNAR, M. Liquid-Liquid Equilibrium of the Aqueous Two-Phase System Water + PEG 4000 + Potassium Phosphate at Four Temperatures: Experimental Determination and Thermodynamic Modeling. *J. Chem. Eng. Data*, v. 47, p. 1401-1405, 2002.

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

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.

WU, Y-T; LING, D-Q; ZHU, Z-Q; MEI, L-H. Prediction of liquid-liquid equilibria of polymer-salt aqueous two-phase systems by a modified Ptizer's virial equation. *Fluid Phase Equilibria*, v. 124, p. 67-79, 1996.

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

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

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA MASSA MOLAR DO POLÍMERO NO EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR POLIETILENO GLICOL, FOSFATO DE POTÁSSIO E ÁGUA

RESUMO

Neste estudo foram determinados dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1500 + fosfato de potássio + água e PEG 4000 + fosfato de potássio + água nas temperaturas de 5 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C, em pH 7. Em linhas gerais, foi observado que o aumento da temperatura provocou o aumento da inclinação da linha de amarração. A adição de um polímero de maior massa molar ao sistema desloca a linha binodal para a região mais próxima aos eixos do diagrama, diminuindo a quantidade de sal necessária à formação do SAB (e/ou aumentando a quantidade de PEG), aumentando a região bifásica. O erro médio do balanço de massa global após a determinação da concentração dos três componentes nas duas fases em equilíbrio foi de 2,25 %. Os resultados analíticos foram analisados de acordo com o modelo termodinâmico proposto por DA SILVA & LOH, 2000.

Palavras-chave: equilíbrio de fases, polietileno glicol, fosfato de potássio, massa molar, temperatura.

1. INTRODUÇÃO

Em 1896, Beijerinck observou que quando soluções aquosas de amido e gelatina e agar-agar e gelatina eram misturadas formava-se um sistema composto por duas fases líquidas onde a fase inferior era enriquecida, na sua maioria, em amido (ou agar-agar) e a fase superior em gelatina. Posteriormente os estudos de Ostwald & Hertel (1929) com estes sistemas, mostraram que para a ocorrência da separação de fases era necessário misturar os diferentes tipos de amido em concentrações distintas. Em 1947, Dobry & Boyer-Kawenoki testaram grande número de pares de polímeros, observando a separação de fases na maioria deles (ALBERTSSON, 1960).

Entretanto, Albertsson, em 1958, foi pioneiro na utilização dos chamados sistemas aquosos bifásicos (SAB's) em processos de bioseparação (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987). Albertsson usou SAB's compostos por soluções aquosas de polietileno glicol e dextrana para a separação de diferentes biomoléculas (ALBERTSSON, 1960).

Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SAB's importante ferramenta na partição e/ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).

A característica que confere ao SAB larga utilização na partição de biomateriais é a baixa tensão interfacial, quando comparada à tensão interfacial existente entre uma fase aquosa e outra não aquosa. Isto ocorre pois o componente majoritário do sistema aquoso bifásico é a água. A água está em maior quantidade nas três regiões do SAB (fase superior, interface e fase inferior). Desta forma, a composição destas regiões é muito parecida, resultando em pequena diferença entre a energia livre de Gibbs das mesmas, e conseqüentemente pequeno valor de tensão interfacial.

Dados de equilíbrio para sistemas polietileno glicol, fosfato de potássio e água são os que estão disponíveis em maior número na literatura (ALBERTSSON, 1960; LEI et al., 1990; SNYDER et al., 1992; PENG et al., 1994; MISHIMA et al., 1995; GROSSMANN et al., 1995; DA SILVA et al., 1997; MISHIMA et al., 1998; DA SILVA & MEIRELLES, 2001; SÉ & AZNAR, 2002).

Entretanto, um desafio em termodinâmica aplicada é a predição do comportamento de sistemas aquosos bifásicos sem a necessidade de dados experimentais (SUM & SANDLER, 1999). Por isto, têm-se buscado prever, com pequena margem de erro, o equilíbrio de fases em SAB's (PENG et al., 1994; GROSSMANN et al., 1995; MISHIMA et al., 1995; WU et al., 1998; SÉ & AZNAR, 2002; GAO & LONEY, 2002).

E, apesar do relato de vários estudos da partição de biomoléculas em SAB's, a utilização destes em grande escala ainda é limitada. Neste trabalho, foram determinados dados de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol, fosfato de potássio e água, que são necessários nos estudos de projeto de equipamentos e otimização de processos de separação usando a extração líquido-líquido.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: O polietileno glicol, de massa molar média de 4000 g/mol foi adquirido da ISOFAR (Brasil), o fosfato de potássio mono e dibásico da VETEC (Brasil) todos de grau analítico.

Preparo dos SAB's: Os sistemas PEG-sal-água foram formados a partir da mistura de sal, água e solução estoque de PEG 50 % m/m em uma célula de equilíbrio, com massa total do sistema de 40 g. Para as soluções aquosas de fosfato de potássio, o pH 7 foi obtido adicionando fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4) na proporção de 1:1,82, respectivamente. A mistura foi agitada manualmente e então centrifugada (Eppendorf, 5804, Alemanha) a 2000 g por 20 minutos para acelerar a separação das duas fases. O sistema foi mantido em repouso durante 24 horas em um banho termostático (TECNAL, TE-184, Brasil) na temperatura desejada $\pm 0,1$ °C. Todas as soluções e diluições foram preparadas cuidadosamente e usando a balança analítica (Denver Instrument, M-310, USA), com sensibilidade de 0,1 mg, na pesagem dos reagentes, para que o balanço de massa fosse feito corretamente. A densidade foi determinada através do método do picnômetro.

Quantificação dos teores de PEG, sal e água: A concentração de PEG em cada fase constituinte dos SAB's foi determinada usando medidas de índice de refração. Foi utilizado um refratômetro (AnalytikJena, Alemanha) conectado a um banho termostático (HAAKE, C10-B3, Alemanha) com temperatura controlada a 30 °C $\pm 1,0$ °C.. A determinação do teor de água foi feita por meio da liofilização (Edwards do Brasil, Brasil). As amostras foram mantidas no congelador, a -12 °C, durante 24 horas e em seguida liofilizadas (temperatura de -52 °C e pressão de 12 N/m²), para a secagem das amostras, por 24 horas. A determinação do conteúdo do fosfato de potássio foi feita por fotometria de chama (CELM, FC-180, Brasil) de forma indireta, ou seja, a quantidade do sal, nas fases, foi calculada a partir da quantificação do íon K^+ . Os dados de concentração, de densidade e do volume de cada fase foram utilizados nos cálculos dos balanços de massa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As composições de equilíbrio dos SAB's formados por PEG 4000 + fosfato de potássio + água, PEG 1500 + fosfato de potássio + água, estão listadas nas Tabelas 1 e 2. Foram determinadas cinco linhas de amarração em cada diagrama. Os desvios padrões encontrados para as análises foram de 0,10 para a quantificação do PEG, de 0,17 do sal e de 2,20 na quantificação da água.

Tabela 1: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, fosfato de potássio e água, pH 7.

<i>TOTAL</i>			<i>FASE SUPERIOR</i>			<i>FASE INFERIOR</i>		
<i>PEG</i>	<i>Sal</i>	<i>Água</i>	<i>PEG</i>	<i>Sal</i>	<i>Água</i>	<i>PEG</i>	<i>Sal</i>	<i>Água</i>
5 °C								
15,85	10,60	73,55	24,39	6,23	69,64	1,05	19,59	75,74
17,11	12,07	70,81	29,86	4,57	65,97	0,01	23,21	68,82
17,86	13,19	68,95	32,79	3,88	63,75	1,29	23,76	67,46
19,60	14,85	65,55	37,39	2,99	59,84	0,68	27,61	65,39
20,84	16,39	62,77	41,84	1,99	56,92	0,00	32,68	65,22
25 °C								
15,02	9,95	75,03	20,60	6,82	71,81	3,44	16,43	76,52
15,97	11,27	72,76	27,36	4,99	67,23	0,00	20,71	73,95
16,96	11,97	71,07	30,35	4,50	64,38	0,00	21,65	72,72
17,96	13,01	69,03	34,32	3,68	61,81	0,00	24,65	71,57
19,32	14,00	66,68	37,30	3,23	58,64	0,00	27,33	59,91
35 °C								
14,49	11,14	74,37	22,78	6,22	70,38	1,44	18,36	77,69
15,82	10,65	73,53	24,19	5,83	69,08	1,94	17,86	77,43
16,65	11,66	71,69	28,83	4,75	64,42	0,00	21,10	76,02
17,33	12,51	70,16	33,14	4,00	60,71	0,00	23,19	71,98
18,68	12,87	68,45	38,40	3,42	59,82	0,00	26,47	67,54
45 °C								
15,44	10,70	73,86	30,37	4,21	65,02	0,00	22,42	75,97
16,32	11,52	72,16	34,41	3,59	71,80	0,00	24,24	64,00
17,55	12,50	69,94	38,18	3,17	47,66	0,00	25,22	68,82
18,69	13,71	67,60	41,92	2,72	48,72	0,00	28,45	71,77
19,67	16,12	64,21	39,57	2,99	49,99	0,00	26,63	74,05

Tabela 2: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, fosfato de potássio e água, pH 7.

TOTAL			FASE SUPERIOR			FASE INFERIOR		
PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água
5 °C								
17,31	9,50	73,19	28,17	4,09	67,99	0,00	20,23	78,57
19,31	10,36	70,34	31,74	3,73	65,13	0,00	22,92	75,20
21,48	11,60	66,93	36,25	2,98	61,47	0,00	27,52	68,55
23,52	12,81	63,67	40,17	2,61	57,76	0,00	29,10	67,72
25,21	13,77	61,02	43,39	2,32	54,66	0,00	34,69	64,89
25 °C								
17,56	9,49	72,95	30,17	3,77	66,97	0,00	18,59	81,23
20,17	10,67	69,16	36,95	2,18	61,99	0,00	22,20	76,64
21,90	11,54	66,57	40,39	1,45	59,24	0,00	24,66	74,13
23,34	12,49	64,17	41,99	1,27	56,92	0,00	27,38	71,86
25,52	13,65	60,83	46,76	0,55	52,90	0,00	30,32	67,36
35 °C								
17,26	9,17	73,56	31,52	2,55	66,67	0,00	17,85	82,33
19,10	10,07	70,83	35,72	1,95	63,09	0,65	19,28	79,10
21,10	11,13	67,77	39,70	1,83	59,40	0,50	22,04	75,90
23,60	12,21	64,19	44,15	1,43	55,70	1,75	24,05	72,45
25,25	13,70	61,05	47,77	1,56	52,40	1,48	27,58	68,16
45 °C								
16,65	8,65	74,69	30,87	2,93	66,51	1,05	15,64	81,05
18,60	9,84	71,56	36,66	2,41	61,88	1,08	18,21	76,95
20,54	10,63	68,83	39,19	2,04	59,84	0,00	21,69	74,35
23,11	12,01	64,88	43,61	1,60	55,08	1,22	23,92	69,55
24,50	12,52	62,98	46,92	1,41	53,90	0,11	26,71	69,75

Os balanços de massa apresentaram erro médio relativo de 2,25 % para o balanço de massa global, de 1,67 % para o PEG, de 0,38 % para o sal e de 4,69 % para a água.

Nas Tabelas 1 e 2, os valores negativos de frações mássicas foram substituídos por zero. Os valores negativos encontrados estavam dentro do erro experimental.

A influência da temperatura sobre os dados de equilíbrio pode ser observada nos diagramas de fases nas Figuras 1 e 2. Para auxiliar a análise deste efeito serão utilizados os valores da inclinação da linha de amarração (ILA) para os três sistemas, Tabelas 3 e 4.

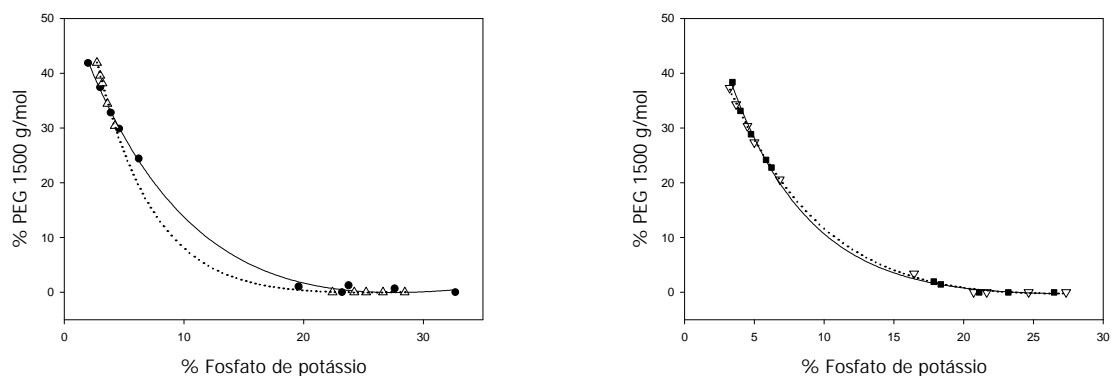


Figura 1: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por polietileno glicol 1500, fosfato de potássio e água, pH 7: (— —) T = 5 °C; (····) T = 25 °C; (—p—) T = 35 °C, (····) T = 45 °C.

Tabela 3: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 1500, fosfato de potássio e água.

LINHAS DE AMARRAÇÃO	TEMPERATURAS			
	5 °C	25 °C	35 °C	45 °C
1	1,747	1,786	1,758	1,668
2	1,601	1,741	1,850	1,667
3	1,585	1,769	1,763	1,732
4	1,491	1,637	1,726	1,629
5	1,363	1,548	1,665	1,673

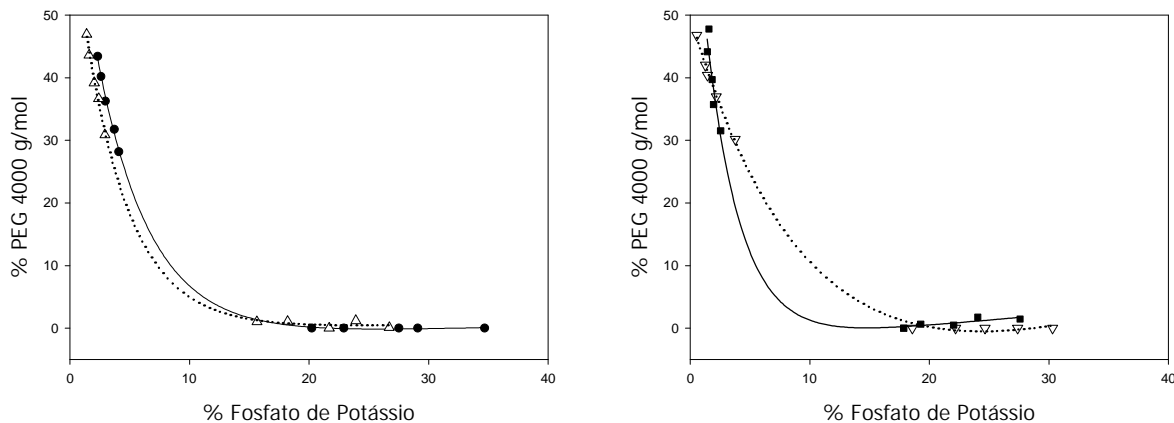


Figura 2: Dados de equilíbrio de fases para o sistema polietileno glicol 4000, fosfato de potássio e água, pH 7. (—●—) T = 5 °C; (·····△·····) T = 25 °C; (---□---) T = 35 °C, (-.-.-◇-.-.-) T = 45 °C.

Tabela 4: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 4000, fosfato de potássio e água.

LINHAS DE AMARRAÇÃO	TEMPERATURAS			
	5 °C	25 °C	35 °C	45 °C
1	1,746	2,035	2,059	2,346
2	1,654	1,846	2,023	2,251
3	1,477	1,741	1,940	1,993
4	1,516	1,609	1,874	1,900
5	1,340	1,571	1,779	1,850

Para os sistemas PEG 1500 + fosfato + água observa-se que o aumento da ILA com a temperatura é crescente entre 5 °C e 35 °C (Tabela 3). Entre 5 °C e 25 °C o aumento é de 8,9 % e entre 25 °C e 35 °C é de 3,3 %. Porém, quando a temperatura varia de 35 °C para 45 °C, a ILA decresce. Considerando que a variação da inclinação neste intervalo de temperaturas é pequena (4,49 %) em relação ao aumento da mesma nos outros intervalos estudados, provavelmente este SAB não sofre influência da temperatura quando esta varia entre 35 °C e 45 °C.

Na Tabela 4, para o sistema PEG 4000 + fosfato + água, pode-se observar o aumento da inclinação da linha de amarração (ILA) com o aumento da temperatura. Esta variação é mais acentuada quando a diferença de temperatura é maior, ou seja, quando a temperatura passa de 5 °C para 25 °C a inclinação aumenta 13,8 %, entretanto de 25 °C

para 35 °C, assim como de 35 °C para 45 °C o aumento da inclinação é de apenas 9,9 % e 6,9 % respectivamente.

A ILA é uma medida de como as composições das fases variam com a modificação de propriedades do sistema. O valor da inclinação é calculado pela relação entre a variação da quantidade de polímero e a variação da quantidade de sal nas duas fases em equilíbrio ($\Delta P / \Delta S$). O aumento da ILA ocorre devido à diminuição da quantidade de sal na fase inferior ou ao aumento da quantidade de polímero na fase superior.

Quanto à entalpia, pode-se dizer que o aumento da temperatura desloca o equilíbrio da reação de formação do complexo sal-PEG, favorecendo esta interação, pois segundo DA SILVA & LOH (2000), a interação entre os íons do sal e o polímero, na formação do SAB, é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura desloca o equilíbrio para os produtos da reação, favorecendo a interação sal-PEG, o que aumentaria a quantidade de sal necessária à formação dos SAB's.

Na análise entrópica, o aumento da temperatura leva ao enovelamento da macromolécula, diminuindo a sua solubilidade em água e liberando as moléculas de água das camadas de solvatação. O que resulta na transferência de moléculas de água da fase superior para a fase inferior, diminuindo a concentração de sal na fase inferior, aumentando a ILA. Desta forma, o balanço entalpia-entropia evidencia a predominância da entropia no comportamento dos Sistemas Aquosos Bifásicos.

A Figura 3 relaciona os diagramas de fases formados por polietileno glicol 1500 g/mol e 4000 g/mol, fosfato de potássio e água nas temperaturas estudadas. Observou-se o aumento da região bifásica nos diagramas formados por polímero de maior massa molar.

Quanto à influência da massa molar do polímero, considera-se que o aumento do tamanho da molécula do polímero diminui seu grau de liberdade, diminuindo a entropia configuracional e, conseqüentemente, a entropia de mistura do sistema. Simultaneamente, provoca o enovelamento da cadeia da macromolécula. As ligações carbono-carbono no polímero passam da forma TRANS para a CIS (mais energética) aumentando a sua entropia conformacional. Este processo de enovelamento resulta na diminuição do número de sítios disponíveis às interações, diminuindo a sua solubilidade, liberando moléculas de água das camadas de solvatação e provocando a transferência das mesmas da fase superior para a fase inferior. A migração das moléculas de água da FS

para a FI resulta na diminuição da concentração de sal na FI e conseqüente aumento da ILA e da região bifásica do diagrama de equilíbrio.

Ao mesmo tempo, a Figura 3 evidencia a diminuição da diferença da capacidade indutora dos polietilenos glicois de diferentes massas molares com o aumento da temperatura. Isto ocorre pois, a interação sal-PEG na formação dos SAB's é endotérmica, ou seja, a formação dos SAB é favorecida pelo aumento da temperatura, cuja influência se sobrepõe à da massa molar do polímero.

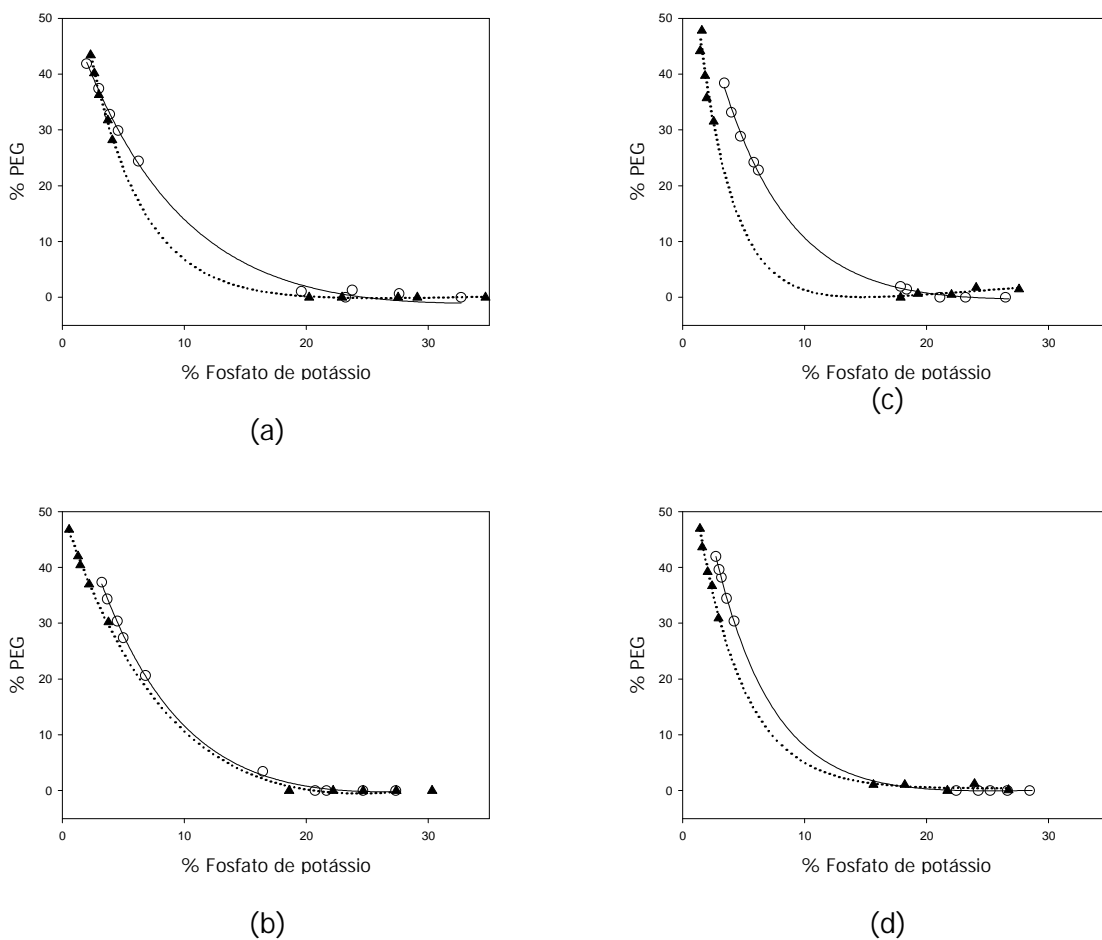


Figura 3: Efeito da massa molar do polímero sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol, fosfato de potássio e água, pH 7: (—○—) PEG 1500 g/mol; (···▲···) PEG 4000 g/mol. (a) T = 5 °C, (b) T = 25 °C, (c) T = 35 °C, (d) T = 45 °C.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram analisados os efeitos da temperatura e da massa molar do polímero sobre o comportamento de sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol, sal e água.

De forma geral, o aumento da temperatura provocou o aumento da inclinação da linha de amarração. Os dados para o sistema composto por PEG 1500 comportaram-se de modo contrário entre as temperaturas de 35 °C e 45 °C, resultando na diminuição da ILA. Entretanto, como este efeito foi pequeno pode-se inferir que entre 35 °C e 45 °C o comportamento deste sistema não é significativamente influenciado por alterações na temperatura. O aumento da temperatura leva à transferência de água da fase superior para a fase inferior e conseqüente aumento da região bifásica e da ILA.

Os diagramas formados por PEG 4000 apresentaram maior região bifásica em relação aos diagramas formados por PEG 1500. Este comportamento era o esperado pois quanto maior a massa molar do polímero, menor é a quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico.

5. BIBLIOGRAFIA

ALBERTSSON, P-Å. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. First Edition. Stockolm: Almquist & Wiksells, 1960. 231 p.

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

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

DA SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning *J. Chem. Eng. Data*, v. 46, p. 251-255, 2001.

GAO, LI; LONEY, N. W. New Hybrid Neural Network Model for Prediction of Phase Equilibrium in a Two-Phase Extraction System. *Ind. Chem. Res.*, v. 41, p. 112-119, 2002.

GROSSMANN, C.; TINTINGER, R.; ZHU, J.; MAURER, G. Aqueous two-phase systems of poly (ethylene glycol) and di-potassium hydrogen phosphate with and without partitioning biomolecules- Experimental results and modeling of thermodynamic properties. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, v. 99, n. 5, p. 700-712, 1995.

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

LEI, X.; DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Equilibrium Phase Behavior of the Poly(ethylene glycol)/Potassium Phosphate/Water Two-Phase System at 4 °C. *J. Chem. Eng. Data*, v. 35, p. 420-423, 1990.

MISHIMA, K.; MATSUYAMA, K.; EZAWA, M.; TARUTA, Y.; TAKARABE, S.; NAGATANI, M. Interfacial tension of aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and dipotassium hydrogenphosphate. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 313-318, 1998.

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

PENG, Q.; LI, Z.; LI, Y. Thermodynamics of potassium hydrogen phosphate potassium dihydrogen phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v. 95, p. 341-357, 1994.

SEˆ, R. A. G.; AZNAR, M. Liquid-Liquid Equilibrium of the Aqueous Two-Phase System Water + PEG 4000 + Potassium Phosphate at Four Temperatures: Experimental Determination and Thermodynamic Modeling. *J. Chem. Eng. Data*, v. 47, p. 1401-1405, 2002.

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

SUM, A. K.; SANDLER, S. I. Use of *ab initio* methods to make phase equilibria predictions using activity coefficient models. *Fluid Phase Equilibria*, v. 158-160, p. 375-380, 1999.

WU, Y-T; LIN, D-Q; ZHU, Z-Q. Thermodynamics of aqueous two-phase systems-the effect of polymer molecular weight on liquid-liquid equilibrium phase diagrams by the modified NRTL model. *Fluid Phase Equilibria*, v. 147, p. 25-43, 1998.

CAPÍTULO 4

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, DO TIPO DE SAL E DA MASSA MOLAR NO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR POLIETILENO GLICOL, SAIS INORGÂNICOS E ÁGUA

RESUMO

Os efeitos da temperatura, da natureza do sal e da massa molar do polímero no equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol (PEG) 1500 + sulfato de sódio + água, PEG 1500 + sulfato de lítio + água, PEG 1500 + citrato de sódio + água, PEG 4000 + sulfato de sódio + água e PEG 4000 + sulfato de lítio + água a 5 °C e 25 °C, em pH 7, foram analisados. O aumento da temperatura foi acompanhado pela elevação da inclinação da linha de amarração e pela redução da quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico. Da mesma forma, a adição de um polímero de maior massa molar ao sistema desloca a linha binodal para a região mais próxima aos eixos do diagrama reduzindo a quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico. Quanto ao efeito do tipo de eletrólito, a capacidade para indução da formação de fases em ordem decrescente foi sulfato de sódio > sulfato de lítio > citrato de sódio. Para os diagramas estudados, o erro médio do balanço de massa global após a determinação da concentração dos três componentes nas duas fases em equilíbrio foi de 0,942 %. Os resultados analíticos foram analisados de acordo com o modelo termodinâmico proposto por DA SILVA & LOH, 2000.

Palavras-chave: equilíbrio de fases, polietileno glicol, sulfato de sódio, citrato de sódio, sulfato de lítio, temperatura, massa molar.

1. INTRODUÇÃO

Uma solução aquosa de polietileno glicol quando misturada com outra solução aquosa de um sal inorgânico (ou de dextrana) resulta em um sistema formado por duas fases aquosas, denominado sistema aquoso bifásico (SAB). As duas fases formadas possuem pequena diferença de densidade entre elas assim como um baixo valor de tensão interfacial (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987).

O primeiro autor a relatar este fenômeno foi Beijerinck em 1896 ao detectar a formação de duas fases a partir da mistura de agar-agar (ou amido) e gelatina em água. A fase superior foi enriquecida em gelatina e a inferior em agar-agar (ou amido). Entretanto, apenas em 1956 Albertsson iniciou estudos sobre a partição de compostos de origem biológica em SAB's (ALBERTSSON, 1960). Uma grande vantagem da utilização destes sistemas é a possibilidade de separar partículas e macromoléculas biológicas sensíveis à desnaturação em outros solventes, como por exemplo células animais ou vegetais, microorganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (GUSTAFSSON et al., 1986).

Dados de equilíbrio de fases para SAB's formados por polietileno glicol, água e sulfato de sódio (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987; SNYDER et al., 1992; HAMMER et al., 1997; SALABAT, 2001); ou por polietileno glicol, água e sulfato de lítio (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987; DA SILVA & LOH, 2000); ou por polietileno glicol, água e citrato de sódio (ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987; ALVES, 2002) são escassos na literatura. Em adição, não foram encontradas referências comparando o comportamento de SAB's formados por citrato de sódio, sulfato de sódio e sulfato de lítio a 5 °C e 25 °C.

Além de ser uma ferramenta para a compreensão do comportamento de SAB, dados de equilíbrio de fases são importantes no design de equipamentos e na otimização de processos de separação em larga escala na indústria de biosseparação (MISHIMA et al., 1998).

Assim, o presente trabalho determinou dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos formados por polietileno glicol 1500 g/mol e 4000 g/mol, três tipos de sal e água, em pH 7 e duas temperaturas, analisando termodinamicamente os efeitos da temperatura, da natureza do eletrólito e da massa molar do polímero no equilíbrio de fases.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: O polietileno glicol, de massas molares médias de 1500 g/mol e 4000 g/mol foram adquiridos da ISOFAR (Brasil), o sulfato de sódio, o sulfato de lítio e o citrato de sódio da VETEC (Brasil), todos de grau analítico.

Preparo dos SAB's: Os sistemas PEG-sal-água foram formados a partir da mistura de sal, água e solução estoque de PEG 50 % m/m em uma célula de equilíbrio, com massa total do sistema de 40 g. Os valores de pH das soluções salinas de sulfato de sódio, sulfato de lítio e citrato de sódio eram próximos de 7, não necessitando de ajustes. A mistura foi agitada manualmente e então centrifugada (Eppendorf, 5804, Alemanha) a 2000 g por 20 minutos para acelerar a separação das duas fases. O sistema foi mantido em repouso durante 24 horas em um banho termostático (TECNAL, TE-184, Brasil) na temperatura desejada $\pm 0,1$ °C. Todas as soluções e diluições foram preparadas cuidadosamente e usando a balança analítica (Denver Instrument, M-310, USA), com sensibilidade de 0,1 mg, na pesagem dos reagentes, para que o balanço de massa fosse feito corretamente. A densidade foi determinada através do método do picnômetro.

Quantificação dos teores de PEG, sal e água: A concentração de PEG em cada fase constituinte dos SAB's foi determinada usando medidas de índice de refração. Foi utilizado um refratômetro (AnalytikJena, Alemanha) conectado a um banho termostático (HAAKE, C10-B3, Alemanha) com temperatura controlada a 30 °C $\pm 1,0$ °C.. A determinação do teor de água foi feita por meio da liofilização (Edwards do Brasil, Brasil). As amostras foram mantidas no congelador, a -12 °C, durante 24 horas e em seguida liofilizadas (temperatura de -52 °C e pressão de 12 N/m²) para a secagem das amostras, por 24 horas. A determinação do conteúdo dos sais foi feita por fotometria de chama (CELM, FC-180, Brasil) de forma indireta, ou seja, a quantidade dos sais, nas fases, foi calculada a partir da quantificação dos respectivos cátions. Os dados de concentração dos componentes, juntamente com o valor de densidade e do volume de cada fase foram utilizados para os cálculos dos balanços de massa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As composições de equilíbrio dos SAB's compostos por PEG 1500 + citrato de sódio + água, PEG 1500 + sulfato de sódio + água, PEG 1500 + sulfato de lítio + água, PEG 4000 + sulfato de sódio + água e PEG 4000 + sulfato de lítio + água estão apresentadas nas Tabelas 1 a 5. Foram determinadas cinco linhas de amarração em cada diagrama. Os desvios padrões encontrados para as análises foram de 0,149 para a quantificação do PEG, de 0,086 para o sal e de 0,390 na quantificação da água.

Os balanços de massa apresentaram erro médio relativo de 0,942 % para o balanço de massa global, de 9,077 % para o PEG, de 0,192 % para o sal e de 3,679 % para a água.

Tabela 1: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, citrato de sódio e água, pH 7.

<i>TOTAL</i>			<i>FASE SUPERIOR</i>			<i>FASE INFERIOR</i>		
PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água
5 °C								
18,34	10,68	70,98	27,71	5,48	63,96	8,08	17,73	69,08
20,39	11,57	68,03	32,54	4,53	60,43	6,51	22,28	65,56
22,45	12,55	65,00	37,90	2,91	56,50	6,47	25,72	61,58
24,52	13,45	62,03	43,03	1,92	55,77	8,07	27,26	58,63
26,26	14,17	59,57	45,81	1,90	53,18	8,73	29,27	57,04
25 °C								
18,33	12,01	69,67	29,25	5,73	75,25	4,55	20,76	83,04
20,24	12,99	66,77	35,26	3,86	68,45	2,30	25,11	83,81
22,26	14,01	63,73	39,68	3,32	68,55	4,42	26,41	83,89
24,25	14,97	60,78	44,00	2,42	64,17	5,89	28,11	82,51
26,34	16,02	57,64	47,77	2,18	58,59	8,09	29,29	80,65

Tabela 2: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, sulfato de sódio e água, pH 7.

<i>TOTAL</i>			<i>FASE SUPERIOR</i>			<i>FASE INFERIOR</i>		
PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água
5 °C								
11,07	8,99	79,94	19,98	5,19	74,41	4,44	13,01	90,58
11,65	9,25	79,11	23,43	3,95	71,73	3,96	12,33	83,53
12,26	9,50	78,24	24,24	4,07	70,40	1,11	15,39	84,71
12,77	9,77	77,46	27,28	3,01	69,19	0,74	15,92	83,33
13,49	9,99	76,52	28,06	2,96	68,29	0,61	16,58	82,88
25 °C								
9,98	9,58	80,44	25,59	1,74	75,25	1,60	13,67	83,04
11,28	10,48	78,24	28,89	1,80	68,45	1,78	14,02	83,81
12,48	11,58	75,94	33,76	1,35	68,55	1,58	15,42	83,89
13,79	12,88	73,33	36,45	1,26	64,17	1,63	17,35	82,51
15,01	13,59	71,40	38,85	1,75	57,94	0,00	22,96	79,21

Tabela 3: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 1500 g/mol, sulfato de lítio e água, pH 7.

<i>TOTAL</i>			<i>FASE SUPERIOR</i>			<i>FASE INFERIOR</i>		
PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água
5 °C								
20,77	9,17	68,56	34,09	4,81	60,60	5,08	16,02	78,90
21,54	9,75	67,11	37,89	4,02	56,99	4,87	17,08	75,30
23,34	10,73	64,17	44,78	2,96	52,87	3,70	20,23	76,48
24,28	11,69	62,12	47,99	2,29	50,08	3,90	22,00	76,68
25,80	12,53	59,62	52,51	2,06	46,77	5,66	22,17	72,67
25 °C								
19,96	9,14	69,40	34,13	4,68	62,64	6,45	14,45	79,54
21,93	9,61	66,88	40,96	3,64	57,35	5,78	16,84	78,08
22,21	10,76	65,26	45,24	2,88	53,60	5,15	17,85	77,82
23,44	11,61	63,05	50,39	2,21	49,62	5,12	19,40	75,47
24,56	12,41	61,00	54,03	1,83	46,46	5,60	20,40	77,90

Tabela 4: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, sulfato de sódio e água, pH 7.

<i>TOTAL</i>			<i>FASE SUPERIOR</i>			<i>FASE INFERIOR</i>		
PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água
5 °C								
8,61	8,02	83,38	16,91	4,96	76,98	0,78	12,33	89,43
11,27	9,02	79,71	24,73	3,20	70,47	0,00	15,14	88,93
12,37	9,99	77,63	29,12	2,26	67,24	0,00	17,42	86,33
14,86	10,95	74,19	33,69	1,76	61,67	0,00	19,35	82,30
17,17	11,81	71,02	37,30	1,50	60,45	0,00	22,30	79,75
25 °C								
8,74	7,65	83,62	16,38	4,96	78,54	1,14	10,33	88,06
11,13	9,12	79,75	27,71	2,96	68,31	0,00	14,16	86,48
12,80	10,05	77,16	32,38	2,04	64,65	0,00	15,15	84,72
14,98	10,40	74,62	34,59	1,55	61,63	0,00	17,48	83,37
17,23	11,08	71,69	40,50	1,00	57,41	0,19	19,04	80,40

Nas Tabelas 2 e 4, os valores negativos de frações mássicas foram substituídos por zero. Os valores negativos encontrados estavam dentro do erro experimental.

Tabela 5: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por polietileno glicol 4000 g/mol, sulfato de lítio e água, pH 7.

<i>TOTAL</i>			<i>FASE SUPERIOR</i>			<i>FASE INFERIOR</i>		
PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água	PEG	Sal	Água
5 °C								
23,73	7,45	68,82	33,85	3,84	63,34	3,98	14,47	81,99
24,86	8,25	66,90	38,12	3,51	59,44	5,10	15,22	80,97
27,29	9,21	63,50	44,85	2,05	53,68	3,33	19,29	77,26
29,57	10,02	60,41	45,96	1,42	49,04	4,89	19,91	76,85
31,30	11,12	57,58	51,55	0,89	41,57	3,58	22,78	73,63
25 °C								
23,05	7,36	68,38	36,28	3,52	60,52	3,02	14,69	82,68
24,65	8,15	65,87	41,48	2,78	56,20	2,84	16,67	80,63
26,99	9,00	62,54	45,78	2,25	52,27	3,13	18,22	78,54
28,85	9,92	59,60	48,12	1,79	47,79	4,51	19,22	76,43
32,58	10,71	54,96	53,48	1,20	42,77	4,59	22,23	73,43

A ILA é uma medida de como as composições das fases variam com a modificação de propriedades do sistema. O valor da inclinação é calculado pela relação entre a variação da quantidade de polímero e a variação da quantidade de sal nas duas fases em equilíbrio ($\Delta P / \Delta S$). O aumento da ILA ocorre devido à diminuição da quantidade de sal na fase inferior e/ou ao aumento da quantidade de polímero na fase superior.

Nos sistemas estudados o aumento da temperatura provocou o aumento da inclinação da linha de amarração, como pode ser observado nas Figuras 1 a 5 e nas Tabelas 6, 7 e 8. Este comportamento deve ser analisado através da entalpia e da entropia do sistema.

O aumento da temperatura desloca o equilíbrio da reação de formação do complexo sal-PEG, favorecendo esta interação, pois segundo DA SILVA & LOH (2000), a interação entre os íons do sal e o polímero, na formação do SAB, ocorre com absorção de energia, ou seja, esta interação é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura desloca o equilíbrio para os produtos da reação, favorecendo a interação sal-PEG, o que aumentaria a quantidade de sal necessária à formação dos SAB's.

Na análise entrópica, o aumento da temperatura leva ao enovelamento da macromolécula, diminuindo a sua solubilidade em água e liberando as moléculas de água das camadas de solvatação, resultando na transferência de moléculas de água da fase superior para a fase inferior, diminuindo a concentração de sal na fase inferior,

aumentando a ILA. Desta forma, o balanço entalpia-entropia evidencia a predominância da entropia no comportamento dos Sistemas Aquosos Bifásicos.

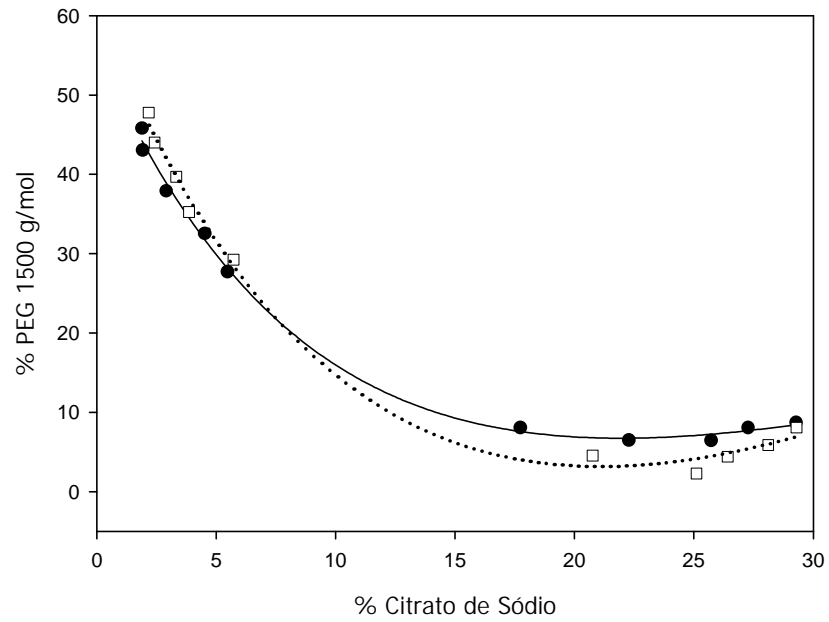


Figura 1: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, citrato de sódio e água, pH 7: (—●—) T = 5 °C; (---□---) T = 25 °C.

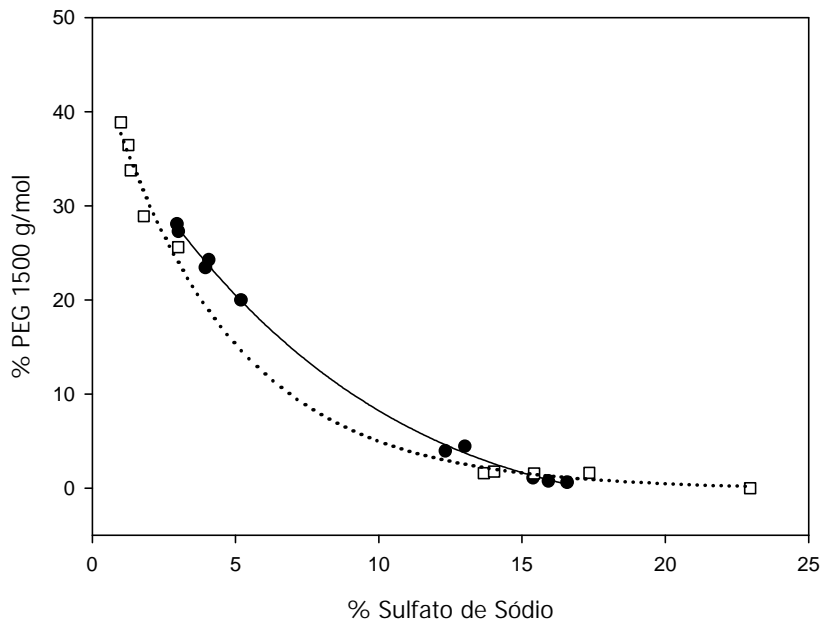


Figura 2: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sulfato de sódio e água, pH 7: (—●—) T = 5 °C; (---□---) T = 25 °C.

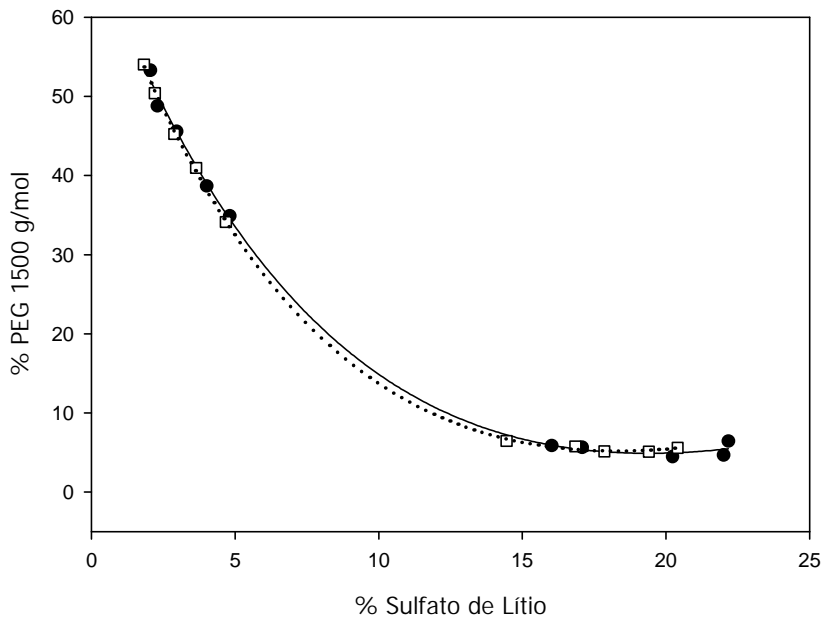


Figura 3: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sulfato de lítio e água, pH 7: (—●—) T = 5 °C; (---□---) T = 25 °C.

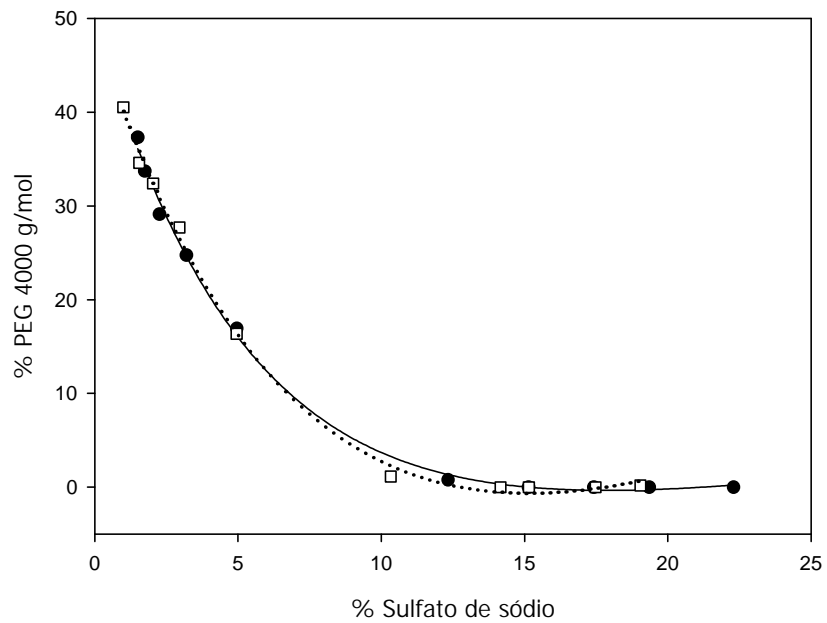


Figura 4: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 4000, sulfato de sódio e água, pH 7: (—●—) T = 5 °C; (···□···) T = 25 °C.

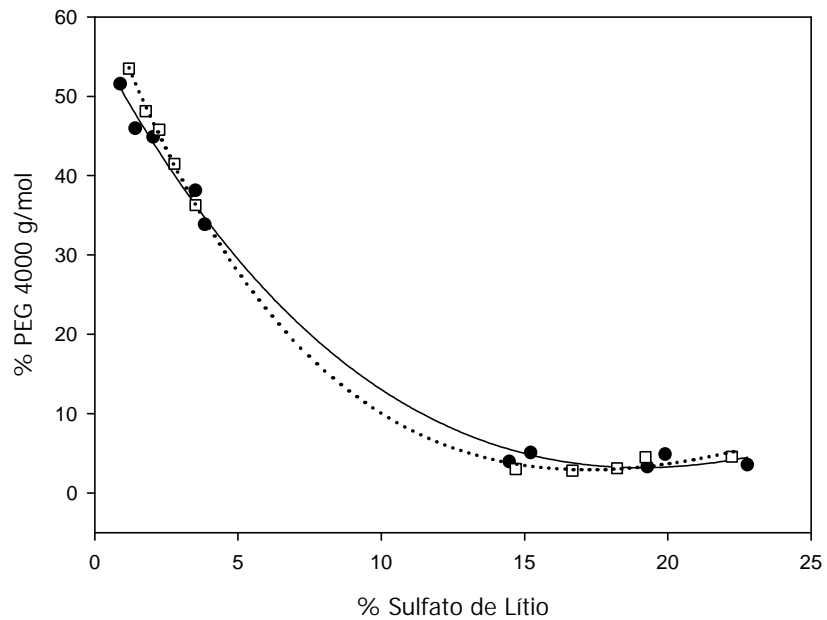


Figura 5: Efeito da temperatura sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sulfato de lítio e água, pH 7: (—●—) T = 5 °C; (···□···) T = 25 °C.

Tabela 6: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração para o sistema PEG 1500, sais e água. (A) sulfato de lítio, (B) sulfato de sódio, (C) citrato de sódio.

LINHAS DE AMARRAÇÃO	TEMPERATURAS					
	(A)		(B)		(C)	
	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C
1	2,589	2,833	1,986	1,832	1,602	1,643
2	2,527	2,664	2,325	2,012	1,467	1,551
3	2,379	2,677	2,044	2,218	1,378	1,527
4	2,237	2,632	2,055	2,287	1,380	1,484
5	2,329	2,607	2,016	2,164	1,355	1,464

Tabela 7: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração para o sistema PEG 4000, sais e água. (A) sulfato de lítio, (B) sulfato de sódio.

LINHAS DE AMARRAÇÃO	TEMPERATURAS			
	(A)		(B)	
	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C
1	2,810	2,977	2,188	2,836
2	2,822	2,782	2,071	2,474
3	2,408	2,669	1,921	2,470
4	2,222	2,501	1,914	2,171
5	2,191	2,324	1,794	2,235

A Figura 6 compara a influência do tipo de ânion do sal sobre os dados de equilíbrio. Os diagramas do sistema formado por sulfato de sódio apresentam maior região bifásica e maior inclinação das linhas de amarração quando comparado aos sistemas formados por citrato de sódio. Entretanto, na análise deste comportamento de acordo com o raio do ânion, um resultado oposto seria esperado. Desta forma, pode-se dizer que a influência do raio iônico foi compensada pela presença de elétrons livres no ânion citrato que favorecem a interação do mesmo com a macromolécula, aumentando a quantidade de sal necessária à formação do SAB. Este comportamento está de acordo com o relatado para tais sistemas (ZAFARANI-MOATTAR & GASEMI, 2002; DA SILVA & LOH, 2000; ANANTHAPADMANABHAN & GODDARD, 1987).

Relacionado à influência do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio, pode-se observar nas Figuras 7 e 8 que os diagramas formados pelo sulfato de sódio apresentam maior região bifásica do que aqueles formados pelo sulfato de lítio. O sulfato

de lítio possui um diagrama de fases com menor região bifásica que o sulfato de sódio, indicando que para a formação de um SAB a partir de PEG, Li_2SO_4 e água maior quantidade de sal é necessária.

Este comportamento pode ser explicado pelo fato do átomo de lítio possuir menor raio e maior densidade de carga do que o átomo de sódio, resultando em uma interação menos energética com o PEG. Se a interação íon-PEG é desfavorecida, o sal irá interagir com o PEG em maior proporção, aumentando a quantidade de sal necessária à saturação da cadeia do polímero e conseqüente formação do SAB. Desta forma, a região bifásica do diagrama de equilíbrio do sistema PEG, sulfato de lítio, água é menor do que a do sistema PEG, sulfato de sódio, água.

Entretanto, como pode ser observado nas Tabelas 6 e 7, o sistema formado por sulfato de lítio apresenta linhas de amarração mais inclinadas do que aquele formado por sulfato de sódio. Assim, a diminuição do raio iônico do sal aumenta a inclinação da linha de amarração enquanto diminui a região bifásica. Isto indica que o aumento da concentração de PEG na fase superior é maior do que o aumento da concentração de sal na fase inferior, resultando no aumento da ILA, confirmando a transferência de água da FS para a FI.

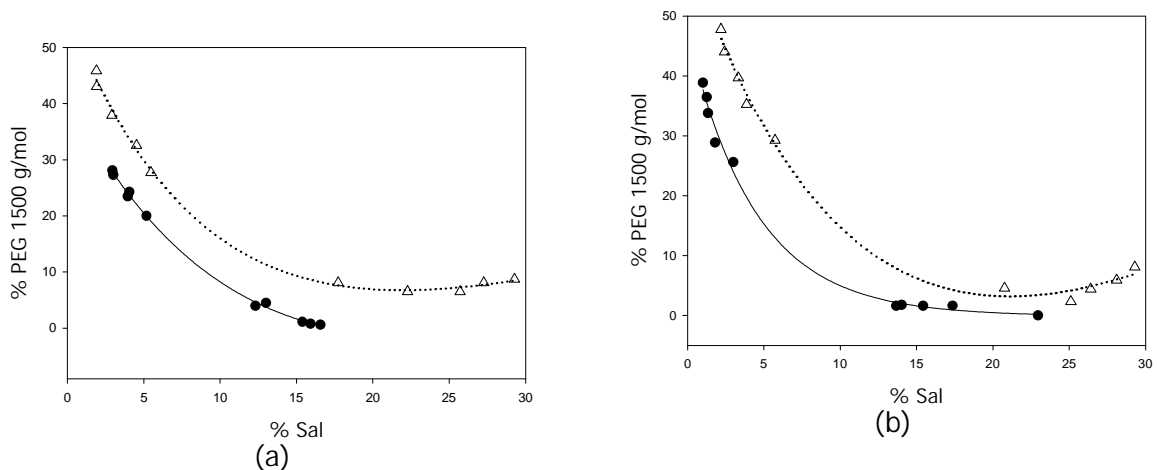


Figura 6: Efeito do tipo de ânion do sal sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sal e água, pH 7: (—●—) sulfato de sódio; (···△···) citrato de sódio. (a) 5 °C, (b) 25 °C.

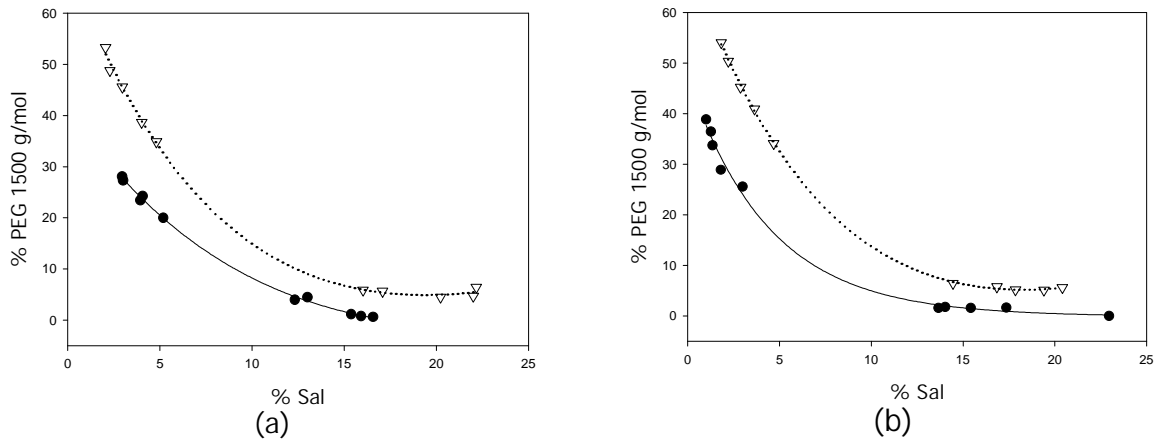


Figura 7: Efeito do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio para o sistema polietileno glicol 1500, sal e água, pH 7: (∇) sulfato de lítio; (\bullet) sulfato de sódio. (a) 5 °C, (b) 25 °C.

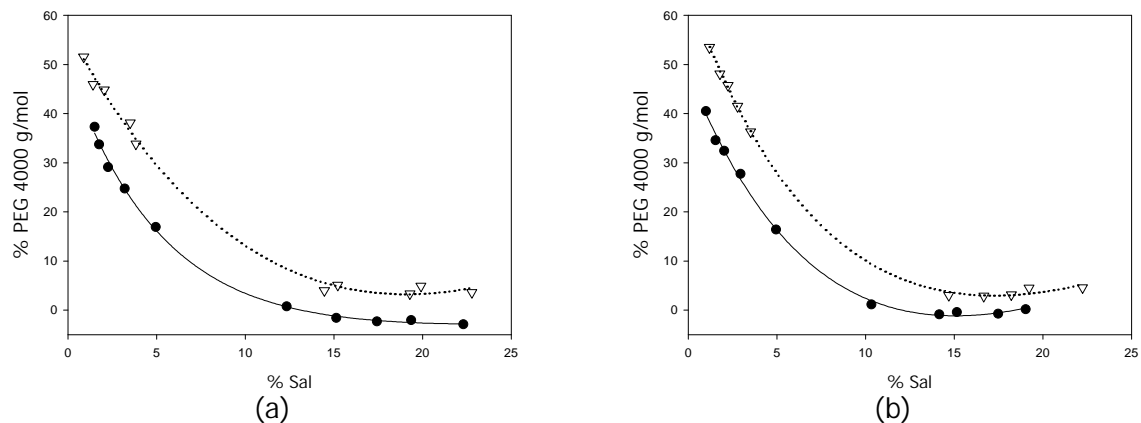


Figura 8: Efeito do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio para os sistemas polietileno glicol 4000, sal e água, pH 7: (∇) sulfato de lítio; (\bullet) sulfato de sódio. (a) T = 5 °C, (b) T = 25 °C.

As Figuras 9 e 10 comparam a influência da massa molar do polímero sobre os dados de equilíbrio de fases. Observou-se o aumento da região bifásica nos diagramas formados por polímero de maior massa molar.

Quanto à influência da massa molar do polímero, considera-se que o aumento do tamanho da molécula do polímero provoca o envelhecimento da cadeia da macromolécula. As ligações carbono-carbono no polímero passam da forma TRANS para a CIS (mais energética) aumentando a sua entropia. Este processo de envelhecimento resulta na

diminuição do número de sítios disponíveis às interações, diminuindo a sua solubilidade, liberando moléculas de água das camadas de solvatação e provocando a transferência das mesmas da fase superior para a fase inferior. A migração das moléculas de água da FS para a FI resulta na diminuição da concentração de sal na FI e conseqüente aumento da ILA e da região bifásica do diagrama de equilíbrio.

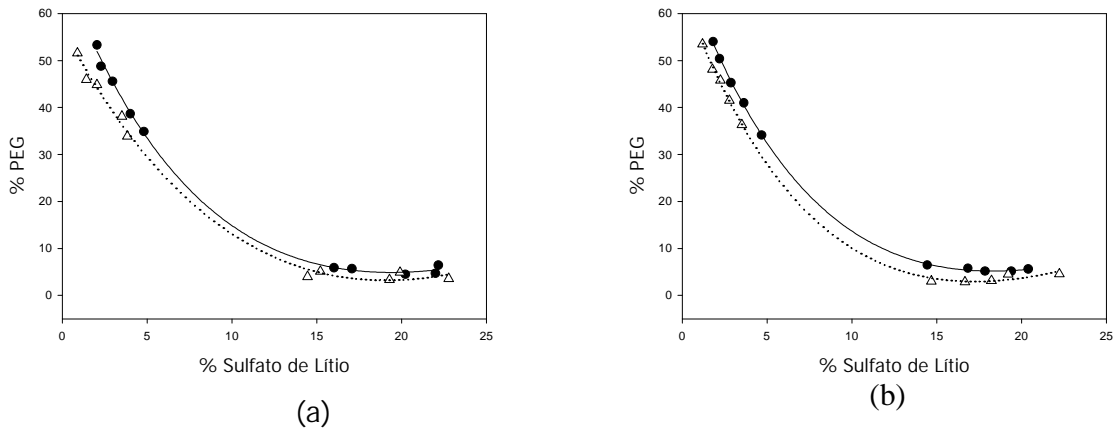


Figura 9: Efeito da massa molar do polímero sobre os dados de equilíbrio para o sistema sulfato de lítio, PEG e água, pH 7: (—●—) PEG 1500 (---△---) PEG 4000. (a) 5 °C, (b) 25 °C.

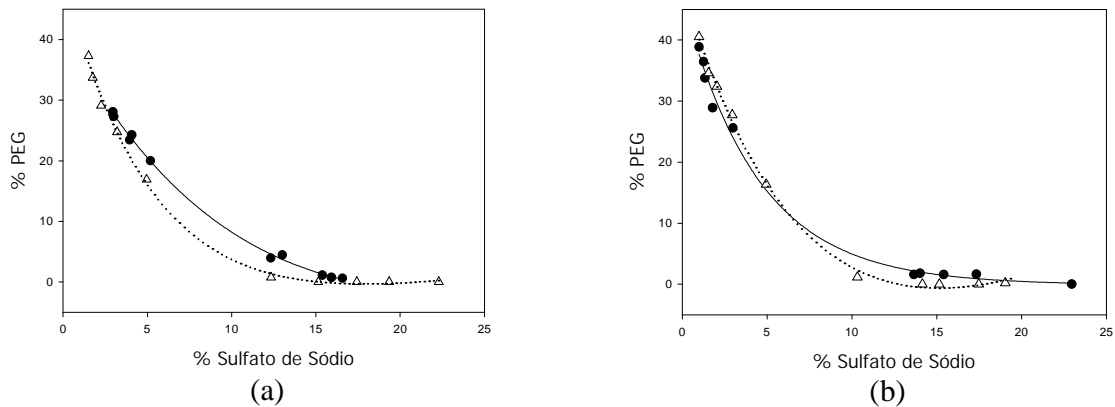


Figura 10: Efeito da massa molar do polímero sobre os dados de equilíbrio para o sistema sulfato de sódio, PEG e água, pH 7: (—●—) PEG 1500 (---△---) PEG 4000. (a) 5 °C, (b) 25 °C.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho analisou a influência da temperatura, do tipo de sal e da massa molar nos dados de equilíbrio de sistemas formados por PEG 1500 + sulfato de lítio + água, PEG 1500 + sulfato de sódio + água, PEG 1500 + citrato de sódio + água, PEG 4000 + sulfato de sódio + água e PEG 4000 + sulfato de lítio + água nas temperaturas de 5 °C e 25 °C.

Observou-se, de uma forma geral, uma redução da quantidade de sal necessária à formação do sistema bifásico, ou aumento da quantidade de PEG, quando a temperatura é aumentada, o que pôde ser verificado através do aumento da inclinação da linha de amarração. O aumento da ILA com a temperatura pode ser justificado pela transferência de água da fase superior para a fase inferior.

Quanto ao efeito do sal, o sulfato de sódio possui maior capacidade de indução à formação do sistema aquoso bifásico do que o sulfato de lítio e o citrato de sódio. Este comportamento era o esperado pois o cátion sódio possui raio atômico maior do que o lítio, assim como o sulfato possui maior raio quando comparado ao citrato.

Os diagramas formados por PEG 4000 apresentaram maior região bifásica em relação aos diagramas formados por PEG 1500, pois quanto maior a massa molar do polímero, menor é a quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico.

5. BIBLIOGRAFIA

ALBERTSSON, P-Å. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. First Edition. Stockolm: Almquist & Wiksells, 1960. 231 p.

ALVES, J. G. L. F. *Estudo do equilíbrio líquido-líquido, da partição de insulina e da pré-purificação da proteína de fusão precursora da insulina humana em sistemas aquoso bifásicos do tipo PEG/sal*. 2002. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2002.

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

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

GUSTAFSSON, A.; WENNERSTRUM, H.; TJERNELD, F. Aqueous polymer two-phase systems in biotechnology. *Fluid Phase Equilibria*, v. 29, p. 365-371, 1986.

HAMMER, S.; PFENNIG, A.; STUMPF, M. Liquid-Liquid and Vapor-Liquid Equilibria in Water + Poly (ethylene glycol) + Sodium Sulfate. *J. Chem. Eng. Data*, v. 39, p. 409-413, 1994.

MISHIMA, K.; MATSUYAMA, K.; EZAWA, M.; TARUTA, Y.; TAKARABE, S.; NAGATANI, M. Interfacial tension of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) and dipotassium hydrogenphosphate. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 313–318, 1998.

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*, v. 187-188, p. 489-498, 2001.

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

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

CONCLUSÃO GERAL

- ❖ As técnicas analíticas utilizadas para a obtenção das concentrações dos componentes apresentaram simplicidade de execução, baixos desvios padrões e baixos valores de erro experimental.
- ❖ Os sistemas estudados foram PEG 1500 + fosfato de potássio + água, PEG 4000 + fosfato de potássio + água, PEG 4000 + sulfato de sódio + água e PEG 4000 + sulfato de lítio + água nas temperaturas de 5 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C e PEG 1500 + sulfato de sódio + água, PEG 1500 + sulfato de lítio + água, PEG 1500 + citrato de sódio + água a 5 °C e 25 °C, pH 7.
- ❖ Em linhas gerais, o aumento da temperatura provocou o aumento da região bifásica e da ILA do diagrama de equilíbrio.
- ❖ Para os sistemas PEG 4000 + sulfato de sódio + água, PEG 4000 + sulfato de lítio + água e PEG 1500 + fosfato de potássio + água não foi observada influência significativa da temperatura entre 35 °C e 45 °C.
- ❖ Relativamente à influência do tipo de ânion do sal sobre os dados de equilíbrio, os diagramas do sistema formado por sulfato de sódio apresentam maior região bifásica e maior inclinação das linhas de amarração quando comparados aos sistemas formados por citrato de sódio.
- ❖ Quanto à influência do tipo de cátion do sal sobre os dados de equilíbrio, foi observado que os diagramas formados pelo sulfato de sódio apresentam maior região bifásica do que aqueles formados pelo sulfato de lítio. Entretanto, o sistema formado por sulfato de lítio apresenta linhas de amarração mais inclinadas do que aquele formado por sulfato de sódio.
- ❖ A influência da massa molar do polietileno glicol 1500 g/mol e 4000 g/mol foi analisada nos sistemas PEG, fosfato de potássio, sulfato de sódio ou sulfato de lítio e água a 5 °C e 25 °C. Observou-se o aumento da região bifásica nos diagramas formados por polímero de maior massa molar.

APÊNDICE 1

Quantificação de fosfato de potássio por espectrofotometria

A determinação de fosfato de potássio foi primeiramente realizada de acordo com o método espectrofotométrico proposto por FISKE & SUBBAROW (1925) para a quantificação de fosfato no sangue e urina humanos.

Este método baseia-se na redução de uma solução ácida de molibdato de amônio pelo ácido ascórbico formando uma solução ácida de fosfomolibdato, (MURPHY & RILEY, 1962). A quantidade de fósforo foi determinada medindo-se a intensidade da coloração azul, em espectrofotômetro, dada pela solução de fosfomolibdato (SILVA & QUEIROZ, 2002).

Inicialmente, foram pesados aproximadamente 1,0 g de amostra previamente diluída em balança analítica, adicionados 2 mL de solução de ácido ascórbico 2 % e 5 mL de Reagente de Formação de Cor. Completou-se o volume com água deionizada para 50 g. Foram aguardados dez minutos para que ocorresse a reação e mediu-se a absorvância em Espectrofotômetro a 725 nm.

Foi considerado que a solução de ácido ascórbico possui uma estabilidade máxima de sessenta minutos quando mantida sem resfriamento (SILVA & QUEIROZ, 2002).

O Reagente de Formação de Cor foi preparado através da adição de 5 g de molibdato de amônio, 0,5 g de subcarbonato de bismuto e 35 mL de ácido sulfúrico concentrado, completando o volume para 500 mL.

Inicialmente foi feita uma curva analítica com soluções de concentração conhecida, relacionando absorvância e concentração.

As leituras foram feitas para todos os pontos das duas fases, e após o balanço de massa, concluiu-se que o erro médio obtido entre a massa de sal inicial e final era de 41,14 %, sendo que as massas de sal oscilaram positiva e negativamente entre os pontos.

Iniciou-se então uma série de testes de verificação desta metodologia. Verificou-se inicialmente o tempo de reação necessário para a leitura. As avaliações iniciais indicaram um tempo ideal de vinte minutos, entretanto este resultado não se reproduzia, nem para soluções teste, nem para as fases. Foi feito um estudo da cinética da reação, medindo a absorvância a cada 5 minutos, para os pontos 1 e 2 da fase inferior. Mesmo após cento e quarenta minutos os valores de absorvância cresciam. Este resultado indicou a presença de outros fatores indutivos de erro.

Durante estas análises observou-se um equívoco na quantidade de ácido sulfúrico no Reagente de Formação de Cor. Segundo GOMES (2000) e SILVA & QUEIROZ (2002) deveriam ser adicionados 138 mL do ácido para garantir que todo o fósforo estivesse livre na solução assim como está demonstrado na equação (1). Isto se deve ao fato de que a quantidade de ácido sulfúrico não deve ser muito pequena, originando perda de fosfato (devido à sua volatilização ou devido à formação de ácido piro-fosfórico ou meta-fosfórico e sua combinação com as paredes do béquer). Da mesma maneira, a quantidade do ácido não deve ser grande para não retardar a redução do ácido fosfomolibdato (FISKE & SUBBAROW, 1925).



Passaram a ser adicionados, então, 138 mL de ácido sulfúrico ao Reagente de Formação de Cor. Para a fase superior observou-se uma fonte de erro adicional, dada pela grande quantidade de polímero, o que provocava turvamento da solução, levando a valores de absorvância inferiores ao da água. O mesmo pôde ser observado na quantificação de fósforo no sangue e urina devido à presença de proteínas, o que foi contornado com a adição de ácido tricloroacético (TCA) (SILVA & QUEIROZ, 2002).

Foi proposto, então, a adição de clorofórmio (CHCL₃) que carregaria o polímero, suprimindo a sua interferência. Após a adição de aproximadamente o mesmo volume de fase de clorofórmio, centrifugou-se a solução durante 15 minutos a 4000 rpm. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles anteriores à adição do clorofórmio.

Os frascos utilizados na análise foram cuidadosamente lavados com solução de ácido clorídrico. Uma alternativa seria separar as vidrarias utilizadas nesta quantificação, mantendo-as cheias de água entre as análises, sendo o tratamento com ácido necessário apenas ocasionalmente (MURPHY & RILEY, 1962).

Mesmo após todos os cuidados acima relatados, este método não produzia resultados aceitáveis. Devido à escassez de tempo, este método foi, então, substituído pelo fotométrico.

Bibliografia:

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, v. ΛΞϚ, n. 2, p. 375-400, 1925.

GOMES, J. C. Apostila de Análise de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2000. 136 p.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*. v. 27, p. 31-36,1962.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos*. Terceira edição. Viçosa. Editora UFV, 2002. 235 p.