

MARCELO MENDES DE CARVALHO

**ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE FASES PARA SISTEMAS AQUOSOS  
BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLI (ETILENO GLICOL) 6000, SULFATO  
DE COBRE OU SULFATO DE ZINCO E ÁGUA, EM FUNÇÃO DA  
TEMPERATURA.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007

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

T

C331e  
2007

Carvalho, Marcelo Mendes de, 1971-

Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água, em função da temperatura / Marcelo Mendes de Carvalho. – Viçosa, MG, 2007.

xi, 58f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luis Antonio Minim.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Partição de fases. 2. Fases e equilíbrio de sistemas. 3. Polietilenoglicol. 4. Sulfato de cobre. 5. Sulfato de zinco. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.2842

MARCELO MENDES DE CARVALHO

**ESTUDO DE EQUILÍBRIO DE FASES PARA SISTEMAS AQUOSOS  
BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLI (ETILENO GLICOL) 6000, SULFATO  
DE COBRE OU SULFATO DE ZINCO E ÁGUA, EM FUNÇÃO DA  
TEMPERATURA.**

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

APROVADA: 26 de fevereiro de 2007.

---

Prof<sup>a</sup> Jane Sélia dos Reis Coimbra  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva  
(Co-Orientador)

---

Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Bevitori Maffia de Oliveira

---

Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Hespanhol da  
Silva

---

Prof. Luis Antonio Minim  
(Orientador)

*À dona Geralda, exemplo de mãe, de vida, de amor  
incondicional, de retidão, de ser humano, a minha mãe é  
perfeita!*

*Ao Sô Valdir (in memorian), o homem que construiu a base do  
que hoje sou e depois partiu para junto dos bons.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me presenteou com a vida e sempre me guardou.

A meus pais, que me propiciaram um seio familiar saudável e harmônico, ensinando tudo com o exemplo do amor. Aos meus irmãos, Jucélia, Vinícius e Ricardo, tenho certeza que sempre estaremos juntos.

Ao professor Luís Antônio Minim, que estendeu a mão e me ajudou a galgar mais um degrau, obrigado pela compreensão, apoio e paciência. Espero poder retribuir e tê-lo como amigo sempre.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra que sempre me recebeu com um sorriso e além de grandes conselhos nunca se cansou de incentivar.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva, por acreditar e impulsionar, eu nem chegaria no final sem sua ajuda. Obrigado pela amizade e por todos os debates não científicos.

À Universidade Federal de Viçosa que por longos anos vem me acolhendo e oferecendo sempre uma formação de qualidade.

Ao Departamento de Tecnologia de alimentos, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela acolhida e oportunidade de me aperfeiçoar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro.

À professora Maria do Carmo Hespanhol da Silva e a Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Bevitori Maffia de Oliveira, pela participação na banca e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos amigos Rafael, Sérgio, Rosana, Tarliane, Osmar, Oscar, Edwin, Regina, Bruno, Roberta, Aléxia, Fabíola, Gisele, Roney, Simone, Érica, Elisa (Kika) e Pricilla, e a todos do LPS que estiveram presentes e me deram força, inclusive aos que, por displicência, eu não me tenha agradecido.

Aos técnicos da absorção atômica Ricardo e Carlos, e aos funcionários do departamento de alimentos, pela mão sempre disposta a ajudar.

Aos companheiros de república, Alfredo, Renato, Daniel, André, Henrique, Hadriel, Marcelo e Bruno. Dividimos o espaço e somamos nossas vidas, é sempre bom ter amigos para passar todas as horas.

Aos meus irmãos/amigos Leonardo, Rodrigo e Vitor, companheiros de longa data e para longas datas, é muito bom tê-los por perto. Gordy muito obrigado pelas grandes contribuições.

Ao amigo Anderson Fuzer, por suas colaborações e papos sempre tranqüilos e apaziguadores.

À Vanessa, que mesmo de longe me deu muita força, principalmente nas viradas de noites que eu passava escrevendo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho, e que eu tenho falhado de não mencionar, meus sinceros agradecimentos.

## BIOGRAFIA

É verão, janeiro de 1971, em uma maternidade de Coronel Fabriciano nasce Marcelo Mendes de Carvalho, é dia 15, no 16 a mãe, Geralda Madalena Mendes Carvalho e o pai, Valdir Lopes de Carvalho, já estão de volta a pequena Belo Oriente, no interior de Minas, onde o menino vai crescer e passar a infância e a adolescência.

Assim como a vida, os estudos seguem tranquilos, e em 1988 o jovem Marcelo conclui o curso técnico em Contabilidade. Não satisfeito, e depois de uma breve parada, muda de área e entre 1991 e 1992 faz o curso técnico em Química no Colégio Técnico de Coronel Fabriciano – CTCF.

Em 1993, se vê frente a uma importante escolha, UFJF ou UFV, como sempre presou pela simplicidade, escolhe a menor sigla e cidade, UFV – Universidade Federal de Viçosa, para fazer a graduação em Química (bacharelado e licenciatura), que é concluída em 1998.

Recém saído da universidade, começa a trabalhar como professor de química em colégios públicos e particulares de Ipatinga – MG. Em 2000 volta a ser estudante, é o primeiro retorno à UFV, periodicamente esta nas salas de aula da Pós-graduação Lato Sensu em Ensino de Química, concluída em 2001.

Mais uma parada na vida acadêmica, e em março de 2004 é aceito no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, segundo retorno, agora o objetivo é o mestrado, que depois de vários problemas pelo caminho, esta sendo concluído.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
1.1 – Sistemas aquosos bifásicos.....	5
1.1.1 – Tensão interfacial.....	10
1.1.3 – Efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases .....	18
1.1.3 – Efeito da massa molar do polímero sobre o equilíbrio de fases	20
1.2 – Componentes dos sistemas aquosos bifásicos .....	22
1.2.1 – Poli (etileno glicol) (PEG).....	22
1.2.2 – Sulfato de zinco e sulfato de cobre .....	23
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
2.1 – Reagentes .....	24
2.2 – Equipamentos .....	24
2.3 – Métodos .....	24
2.3.1 – Titulação turbidimétrica .....	24
2.3.2 – Preparo dos sistemas aquosos bifásicos.....	25
2.3.3 – Determinação dos dados de equilíbrio.....	27
2.3.3.1 – Coleta das fases .....	27
2.3.3.2 – Densidade.....	27
2.3.3.3 – Volume das fases .....	28
2.3.3.4 – Quantificação do teor de água .....	30
2.3.3.5 – Quantificação do sulfato de cobre e do sulfato de zinco .....	30
2.3.3.6 – Quantificação do teor de poli (etileno glicol) .....	31
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>32</b>



<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>38</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>38</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>2 – MATERIAS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>4 – CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1**

<i>Figura 1: Sistema aquoso composto por PEG e Levana. ....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2: Tensão interfacial. ....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 3: Diagrama de fase em coordenadas triangulares ....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4: Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.....</i>	<i>16</i>

### **CAPÍTULO 2**

<i>Figura 1: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre e água, nas temperaturas de 5 e 35 °C. ....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 2: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre e água, nas temperaturas de 10 e 45 °C. ....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 3: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de zinco e água, nas temperaturas de 5 e 35 °C. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 4: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de zinco e água, nas temperaturas de 10 e 45 °C. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 5: Linhas de amarração para o sistema formado por PEG 6000, sulfato de cobre e água. ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 6: Efeito do tipo de cátion sobre os dados de equilíbrio para o sistema poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água a 5 °C. ....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 7: Efeito do tipo de cátion sobre os dados de equilíbrio para o sistema poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água a 10 °C. ....</i>	<i>50</i>

<i>Figura 8: Efeito do tipo de cátion sobre os dados de equilíbrio para o sistema poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água a 35 °C.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 9: Efeito do tipo de cátion sobre os dados de equilíbrio para o sistema poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água a 45 °C.....</i>	<i>51</i>

## ÍNDICE DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1**

<i>Tabela 1 – Sistemas aquosos bifásicos e seus componentes.....</i>	<i>7</i>
<i>Tabela 2 – Tensão Interfacial .....</i>	<i>12</i>
<i>Tabela 3 – Tensão Interfacial em SAB's formados por PEG, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e água .....</i>	<i>12</i>

### **CAPÍTULO 2**

<i>Tabela 1: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre e água, em diferentes temperaturas.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 2: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de zinco e água, em diferentes temperaturas.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 3: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 6000, sulfato de cobre e água.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 4: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 6000, sulfato de zinco e água. ....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 5: Influência da temperatura sobre o comprimento das linhas de amarração (CLA) para o sistema PEG 6000, sulfato de cobre e água. ....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 6: Influência da temperatura sobre o comprimento das linhas de amarração (CLA) para o sistema PEG 6000, sulfato de zinco e água.....</i>	<i>49</i>

## RESUMO

CARVALHO, Marcelo Mendes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água, em função da temperatura**  
Orientador: Luis Antônio Minim. Co-Orientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Luís Henrique Mendes da Silva.

Neste trabalho foram determinados diagramas de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos compostos por poli (etileno glicol) (PEG) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água, nas temperaturas de (5, 10, 35 e 45) °C. Cada diagrama foi composto por cinco linhas de amarração. Na quantificação dos componentes das fases, os teores de sal e água foram obtidos, respectivamente, por medidas de absorção atômica e liofilização. O conteúdo de PEG foi calculado por diferença. Os efeitos da temperatura e do tipo de sal sobre o equilíbrio do sistema foram analisados. Observou-se, de forma geral, o aumento da região bifásica com a elevação da temperatura. Houve também um incremento na diferença entre as propriedades intensivas do sistema com a variação da temperatura, o que pode ser observado pela variação dos dados de comprimento da linha de amarração. Quanto ao efeito do tipo de sal, os sistemas aquosos bifásicos estudados compartilham o mesmo ânion (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) e têm cátions com valências iguais (Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>). A maior capacidade de indução de fases foi observada para o Zn<sup>2+</sup>. O seu  $\Delta_{\text{hid}}G$  é muito próximo ao do Cu<sup>2+</sup> (embora um pouco menos negativo) o que indica que outros fatores como menor raio iônico e maior solubilidade em água parecem contribuir de forma mais contundente para o resultado encontrado.

## ABSTRACT

CARVALHO, Marcelo Mendes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2007. **Study of phase equilibria to aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol 6000, copper sulphate or zinc sulphate and water, in function of the temperature.** Adviser: Luis Antônio Minim. Co-Advisers: Jane Sélia dos Reis Coimbra and Luís Henrique Mendes da Silva.

In this work, equilibrium diagrams for aqueous two-phase systems composed by polyethylene glycol (PEG) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, copper sulfate or zinc sulfate and water were determined in the temperatures of 5, 10, 35 and 45 °C. Each diagram was composed by five tie lines. In the quantification of the phase's components, the salt and water contents were determined, respectively, by atomic absorption and lyophilization measurements. The PEG content was calculated by difference. The effects of the temperature and salt type on the aqueous systems were analyzed. It was observed, in a general way, an increase in the two-phase area with the elevation of the temperature. There was also an increment in the difference between the intensive properties of the system with the temperature variation, what can be observed by the variation of the tie lines length data. In relation to the salt type effect, the aqueous two-phase systems studied share the same anion (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) and they have cations with same valences (Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>). The highest capacity of phase's induction was observed for Zn<sup>2+</sup>. Its  $\Delta_{\text{hid}}G$  is very close to that of Cu<sup>2+</sup> (although a little less negative) what indicates that other factors as smaller ionic radius and larger water solubility (ZnSO<sub>4</sub>) seem to contribute in a more incisive way to the observed result.

## INTRODUÇÃO

Quando se misturam, uma solução aquosa de poli (etileno glicol) a outra solução aquosa, de um segundo polímero, como a Dextrana, ou de um sal inorgânico, como o fosfato de potássio (em determinadas faixas de composição e temperatura), ocorre separação de duas fases distintas.

A formação de duas fases líquidas em equilíbrio são observadas com frequência em sistemas contendo polímeros e ocorrem sob diversas condições termodinâmicas, podendo ocorrer em soluções aquosas ou não-aquosas, formadas por dois componentes dentro de uma faixa de temperatura e concentração, ou em misturas ternárias de um polímero e dois solventes distintos e, até mesmo, em mistura de dois ou mais polímeros sem a presença de qualquer solvente [1].

Os primeiros relatos sobre sistemas aquosos bifásicos foram feitos por Beijerinck em 1896. Estes sistemas eram formados partindo-se de uma mistura de soluções aquosas de gelatina e agar ou gelatina e amido [2]. (Albertsson) Uma característica sem igual deste sistema bifásico é que ambas as fases são formadas predominantemente por água, além disso, a diferença entre as densidades das fases é pequena e, a tensão interfacial entre elas fica na ordem de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$  mN.m<sup>-1</sup> [3].

As propriedades dos sistemas aquosos bifásicos, possibilitam sua utilização na partição e purificação de materiais biológicos como células, organelas, enzimas, proteínas, etc. Note que o uso de sistemas bifásicos do tipo água/óleo, para tais separações biológicas, em geral não podem ser utilizados, devido à possível desnaturação do componente biologicamente ativo em meios não aquosos [3].

Diversos fatores influenciam a formação de duas fases durante o processo de mistura de soluções aquosas de dois polímeros (ou de um polímero e de um sal). Esta transição de fases dependerá das interações intermoleculares - expressas em termos da energia livre - entre os constituintes formadores do sistema. Serão também estas mesmas

interações as responsáveis por todas as propriedades físico-químicas presentes nas duas fases, como por ex., a distribuição dos diferentes componentes no sistema, da relação de volumes entre as fases, da diferença de potencial elétrico e do excesso de energia livre associados à interface, do coeficiente de partição de um soluto específico, etc [4]. A avaliação de tais fatores é predominante nas pesquisas na área, uma vez que até então o preparo de diferentes SAB's é uma tarefa árdua baseada apenas em abordagens de tentativa e erro. O presente trabalho se situa entre as várias contribuições voltadas para o entendimento de tais sistemas.

## OBJETIVOS GERAIS

- Determinar dados de equilíbrio de fases para os sistemas aquosos compostos por poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup> e os sais sulfato de cobre e sulfato de zinco, viabilizando sua aplicação para a partição de compostos orgânicos e inorgânicos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os dados de equilíbrio de fases, para sistemas aquosos bifásicos formados por água, poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup> e os sais sulfato de zinco e sulfato de cobre nas temperaturas de 5, 10, 35 e 45 °C.
- Avaliar a influência da temperatura nos sistemas citados, em função de alterações na região bifásica, expressas pela inclinação e comprimento das linhas de amarração.
- Estudar a influência do tipo de cátion sobre a formação de sistemas compostos por poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup> e os sais sulfato de zinco e sulfato de cobre.



## CAPÍTULO 1

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

É bem conhecido o fato de que certas substâncias são mais solúveis em alguns solventes que em outros, e que existem líquidos que quando misturados em um recipiente, agitados e deixados em repouso, separam-se formando camadas. Tais líquidos são ditos imiscíveis ou parcialmente miscíveis, considerando que eles são insolúveis ou parcialmente solúveis entre si, ressaltando que líquidos totalmente imiscíveis não existem. Os sistemas assim formados são sistemas líquidos bifásicos.

Os sistemas líquidos bifásicos têm sido um importante tema de investigações teóricas e experimentais, principalmente devido à distribuição de um soluto entre suas fases líquidas imiscíveis. O primeiro estudo sistemático da partição de solutos em sistemas líquidos bifásicos, que permitiu o desenvolvimento de uma teoria capaz de prever o comportamento destes sistemas, foi realizado por Berthelot e Jungfleisch em 1872. Estudando a partição de  $I_2$  e  $Br_2$  no sistema bifásico água / dissulfeto de carbono e a distribuição de ácidos orgânicos no sistema água / éter etílico, descreveram, pela primeira vez, o princípio fundamental de que a razão das concentrações de um soluto distribuído entre dois solventes imiscíveis era constante e não dependia do volume relativo das fases do sistema. Contudo, verificaram que certos sistemas não obedeciam esta “regra”, mesmo em soluções diluídas [5].

Neste aspecto, em 1891, Nernst enfatizou o fato de que o coeficiente de partição deveria manter-se constante somente no caso da partição de uma única espécie molecular entre as duas fases. Fatores como a dimerização da espécie estudada na fase orgânica ou a sua ionização na fase aquosa deveriam ser usados na correção dos valores da sua concentração em suas respectivas fases. Deste modo, verificou-se que o coeficiente de partição do ácido benzóico no sistema água / benzeno era corretamente expresso pela equação:

$$\frac{\sqrt{C_{(FO)}}}{C_{(FA)}} = \text{constante} \quad (1)$$

Em que  $C_{(FO)}$  é a concentração de ácido benzóico na fase orgânica (encontrado principalmente na forma de dímero),  $C_{(FA)}$  é a concentração de ácido benzóico na fase aquosa e a constante obtida é resultante do coeficiente de partição do monômero de ácido benzóico e da constante de dimerização deste ácido na fase orgânica. Uma vez que, nas concentrações empregadas, a maior parte do ácido benzóico na fase orgânica forma dímeros, a concentração de monômero nesta fase é proporcional à raiz quadrada da sua concentração total nesta fase.

No aspecto tecnológico, a aplicação dos sistemas líquidos bifásicos possibilitam importantes meios para os processos de extração, e têm sido usados no isolamento de produtos naturais. Também são descritos na literatura sistemas multifásicos (três e quatro fases) que pela maior faixa de polaridades e propriedades químicas abrangidas pelas fases, são mais seletivos, comparados aos sistema água/óleo e aquosos bifásicos, podendo ser ajustados a diferentes propósitos [6,7,8].

Na purificação de biomoléculas e íons, os sistemas aquosos bifásicos têm grande importância. Estes sistemas têm sido usados com sucesso na separação de várias entidades biológicas, tais como células, organelas e proteínas. Nos sistemas aquosos bifásicos, proteínas e outros materiais sensíveis podem ser separados com baixo risco de desnaturação [9,10,11].

## 1.1 – Sistemas aquosos bifásicos

Em certos estados termodinâmicos, soluções aquosas de alguns polímeros podem apresentar o fenômeno de turvação com a conseqüente formação de duas fases, que permanecem em equilíbrio e, que possuem a água como componente majoritário [12]. Estes tipos de fenômenos são relativamente raros em soluções aquosas que se encontram em

temperaturas compatíveis com a manipulação de materiais biológicos [13]. Outra possibilidade de formação de sistemas bifásicos ocorre quando se adiciona um terceiro componente, que pode ser de baixa massa molar ou uma outra macromolécula.

Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's) foram primeiramente relatados na literatura por Beijerinck, em 1896, segundo Diamond & Hsu (1992). Ele descobriu que misturando-se gelatina, ágar e água em certas concentrações, forma-se um SAB, com a fase superior rica em gelatina e a inferior rica em ágar. Nas décadas de 40 e 50, Craig & Craig foram os primeiros a utilizar sistemas aquosos bifásicos e sistemas orgânicos bifásicos para purificação de proteínas, usando-se distribuição em contracorrente. Entretanto, somente em 1955, Per-Ake Albertsson descobriu que poli (etileno glicol) (PEG), dextrana e água; PEG, fosfato de potássio e água formavam duas fases, que são os sistemas mais freqüentemente estudados e utilizados atualmente para purificação de biomoléculas. Albertsson observou que além da separação de fases, ocorria a partição do biomaterial. SAB's oferecem um meio adequado para partição de células, organelas celulares e proteínas ativas biologicamente. Nos últimos 50 anos, muitos pesquisadores têm aplicado estes sistemas à separação em escala de laboratório de proteínas, células, organelas celulares, vírus, fragmentos da membrana celular e outros materiais biológicos [14].

As duas fases que constituem o SAB, se encontram em um equilíbrio termodinâmico, não havendo mais troca de matéria ou energia resultante entre as fases e o fluxo resultante de matéria ou de energia, indo da fase inferior para a fase superior (ou vice-versa), é nulo; porém, estas fases possuem propriedades intensivas diferentes, como índice de refração, entalpia molar, composição, densidade e viscosidade. Este equilíbrio é mantido desde que certas condições termodinâmicas, como temperatura e pressão, sejam constantes.

As duas possibilidades mais comumente encontradas na composição dos SAB's são as que se utilizam de dois polímeros diferentes ou de um

polímero e um soluto de pequena massa molar, geralmente um sal. Na tabela 1 são encontrados vários exemplos destes sistemas.

**Tabela 1 – Sistemas aquosos bifásicos e seus componentes.**

<b>A – Sistemas polímero-polímero-água</b>	
<b>Polímero</b>	<b>Polímero</b>
Poli (propileno glicol)	Metoxipolietileno glicol Poli (etileno glicol) Álcool polivinílico Polivinilpirrolidona Hidroxiopropil dextrana Dextrana Hidroxiopropil amido Maltodextrina
Poli (etileno glicol)	Álcool polivinílico Polivinilpirrolidona Dextrana Ficoll Pululana Poli(N-vinil-2-pirrolidona)
Álcool polivinílico	Metilcelulose Hidroxiopropil dextrana Dextrana
Polivinilpirrolidona	Metilcelulose Dextrana
Metilcelulose	Hidroxiopropil dextrana Dextrana
Etilhidroxietilcelulose	Dextrana Hidroxiopropil amido
Hidroxiopropil dextrana	Dextrana
Ficoll	Dextrana
Copolímero Poli (óxido de etileno)-poli (óxido de propileno)	Maltodextrina

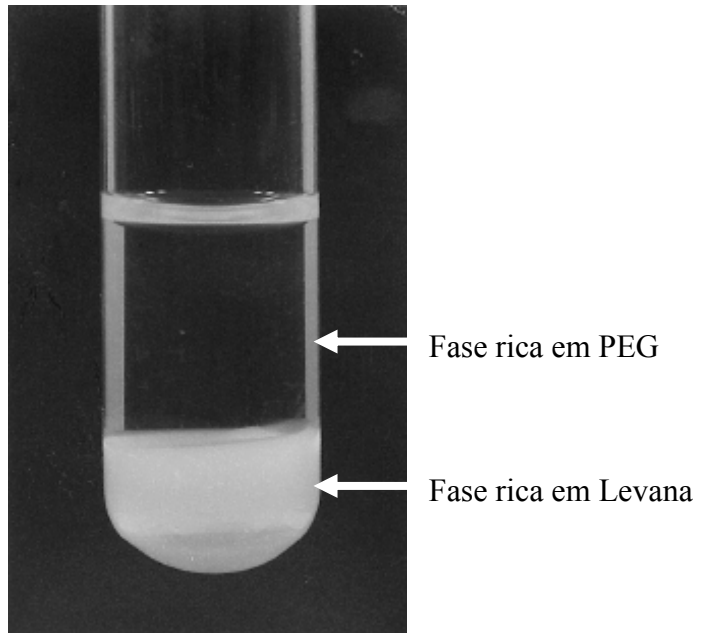
Tabela 1: (continuação)

<b>B – Polímero-soluto de pequena massa molar-água</b>	
Polímero	Soluto de pequena massa molar
Poli (etileno glicol)	Fosfato de potássio Aminoácido Mono/Dissacarídeo Peptídeo/Proteína Cloreto de sódio Glicose Glicerol Citrate de sódio Sulfato de sódio
Metoxipoli (etileno glicol)	Fosfato de potássio
Álcool polivinílico	Butilcelosolve
Polivinilpirrolidona	Butilcelosolve
Dextrana	Álcool propílico
Dextrana sulfonato de sódio	Cloreto de sódio

Fontes: Alves, 2003 [14] e da Silva e Loh, 2006 [4]

A separação de fases entre duas soluções aquosas de polímeros só ocorrerá se a energia livre de Gibbs do sistema for minimizada; se este fato ocorre quando os polímeros estão em fases distintas, a interação entre as moléculas dos dois polímeros é de caráter repulsivo, estando o sistema em um estado energeticamente favorável quando estas se encontram separadas [15].

Para um SAB do tipo polímero<sup>a</sup>/polímero<sup>b</sup>/água, produzido a partir de uma determinada composição global, geralmente definida em termos de porcentagem em massa, % (m/m), observa-se que uma das fases formadas será rica em um polímero e a outra, rica no outro polímero. Em ambas, geralmente, predomina a água (Figura 1) [16].



Fonte: Chung, 1997 [17]

Figura 1: Sistema aquoso composto por PEG e Levana.

É interessante destacar que, à medida que o número de diferentes componentes aumenta, abrem-se possibilidades para formação de sistemas polifásicos. Em 1998, foi descoberto que a adição de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a um SAB formado por  $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{PEG}/\text{H}_2\text{O}$  resultava em um sistema trifásico, em que a fase mais densa era formada pela mistura  $\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{SO}_4$ , a fase intermediária era composta por  $\text{PEG}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , enquanto a fase superior era formada por  $\text{PEG}/\text{H}_2\text{O}$ . A adição de n-hexano, a este sistema trifásico, gerava um sistema tetrafásico em que a nova fase era a menos densa e formada pela mistura  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-hexano}$  [4].

Das propriedades termodinâmicas dos SAB's, uma das mais importantes na partição de biomateriais, e outros compostos de interesse, é a sua baixa tensão interfacial. Essa característica, permite a passagem desses materiais a serem particionados, de uma fase para a outra, com um mínimo de perturbação em suas estruturas.

### 1.1.1 – Tensão interfacial

Quando um líquido é colocado em contato com um outro, a tensão interfacial entre os fluidos fica reduzida, (quando comparada as tensões interfaciais entre esses líquidos e o ar), em função das forças de atração entre as moléculas do primeiro fluido com as do segundo. Essas forças tendem a misturar os dois líquidos e quando a mistura não ocorre (como é o caso de fluidos imiscíveis), significa que as forças entre moléculas idênticas em cada fluido predominam sobre elas. A razão da imiscibilidade é normalmente encontrada na diferença entre as forças de coesão das moléculas nos dois líquidos [18].

Segundo Castellan [19], a tensão interfacial entre duas fases líquidas,  $\alpha$  e  $\beta$ , é designada por  $\gamma^{\alpha\beta}$ . Considerando que a interface tenha área unitária; se as duas fases forem afastadas até se separem, será formado  $1 \text{ m}^2$  de uma superfície da fase  $\alpha$  pura com energia de Gibbs superficial  $\gamma^{\alpha V}$  e  $1 \text{ m}^2$  de uma superfície da fase  $\beta$  pura com energia de Gibbs superficial  $\gamma^{\beta V}$  (Figura 2). A variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) nesta transformação, expressa pelo aumento de G, é:

$$\Delta G = w_A^{\alpha\beta} = \gamma^{\alpha V} + \gamma^{\beta V} - \gamma^{\alpha\beta} \quad (2)$$

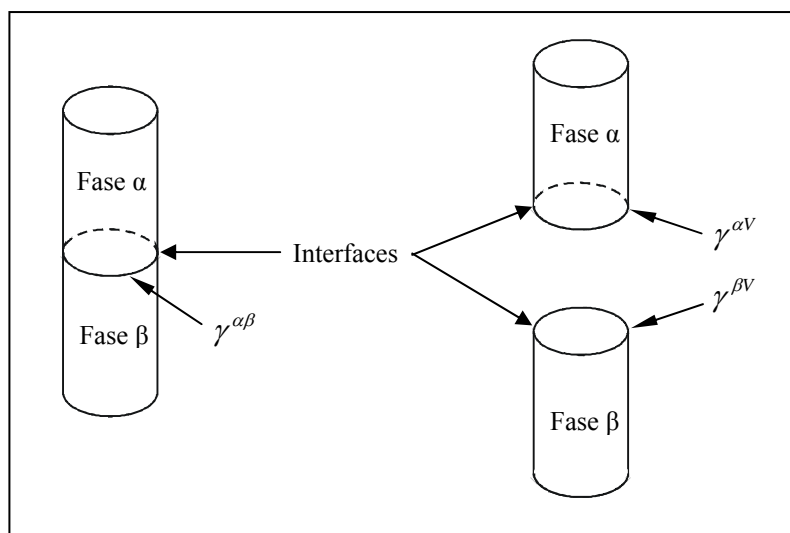


Figura 2: Tensão interfacial.

Este aumento na energia de Gibbs é chamado de trabalho de adesão,  $w_A^{\alpha\beta}$ , entre as fases  $\alpha$  e  $\beta$ . Note que, como as fases puras  $\alpha$  e  $\beta$  estão em contato com a fase vapor, será escrito  $\gamma^{\alpha V}$  para a tensão interfacial entre  $\alpha$  e a fase vapor. Da mesma forma  $\gamma^{\beta V}$  é a tensão interfacial entre  $\beta$  e a fase vapor em equilíbrio.

Se uma coluna da fase pura  $\alpha$  for seccionada, será formado  $2 \text{ m}^2$  de superfície e

$$\Delta G = w_C^\alpha = 2\gamma^{\alpha V} \quad (3)$$

Este aumento na energia de Gibbs,  $w_C^\alpha$ , é chamado de trabalho de coesão de  $\alpha$ . Da mesma forma,  $w_C^\beta = 2\gamma^{\beta V}$ . Portanto:

$$w_C^{\alpha\beta} = \frac{1}{2}w_C^\alpha + \frac{1}{2}w_C^\beta - \gamma^{\alpha\beta} \quad (4)$$

ou

$$\gamma^{\alpha\beta} = \frac{1}{2}(w_C^\alpha + w_C^\beta) - w_C^{\alpha\beta} \quad (5)$$

À medida que a energia de Gibbs de adesão entre as fase  $\alpha$  e  $\beta$  aumenta,  $\gamma^{\alpha\beta}$  diminui. Quando  $\gamma^{\alpha\beta} = 0$ , não há resistência ao aumento da interface entre as fases  $\alpha$  e  $\beta$ ; e os dois líquidos misturam-se espontaneamente.

É interessante notar que a tensão interfacial,  $\gamma$ , para sistemas líquido-líquido do tipo água/óleo tem seus valores de tensão muito superiores aos valores de  $\gamma$  encontrados em sistemas aquosos bifásicos. Para aplicação em processos de separação de biomoléculas, este pequeno valor de excesso de energia livre de Gibbs, por unidade de área, possibilita a transferência das biopartículas pela interface com um risco mínimo de ocorrerem alterações estruturais nas proteínas, células e membranas particionadas [4]. As tabelas 2 e 3 mostram valores de  $\gamma$  para os dois tipos de sistema.



Tabela 2 – Tensão Interfacial

Tensão interfacial entre a água ( $\alpha$ ) e vários líquidos ( $\beta$ ), a 20 °C *	
Líquido	$\gamma^{\alpha\beta}$ ( $10^{-3}$ N.m $^{-1}$ )
Hg	375,0
<i>n</i> -C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	50,8
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	35,0
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CHO	15,5
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> COOH	7,0
<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	1,8
Tensão interfacial em SAB's **	
Tipo de SAB	$\gamma^{SAB}$ ( $10^{-6}$ N.m $^{-1}$ )
Polímero-polímero	0,5 a 500

Fonte: \* Castellan [19], \*\* Zaslavsky [20].

Tabela 3 – Tensão Interfacial em SAB's formados por PEG, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e água

Sistema	$\gamma^{SAB}$ ( $10^{-4}$ N.m $^{-1}$ )				
	Linhas de amarração				
	1	2	3	4	5
A	1,15	1,77	2,75	3,71	4,78
B	0,98	1,85	3,38	4,71	6,45
C	1,70	2,24	3,98	7,59	12,6
D	—	11,53	22,05	22,94	4,03
E	1,49	3,39	4,32	—	9,03

A - PEG 4000 – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – água, sistema a 298,15 K.

B - PEG 6000 – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – água, sistema a 298,15 K.

C - PEG 20 000 – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – água, sistema a 298,15 K.

D - PEG 6000 – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – água, sistema a 288,15 K.

E - PEG 6000 – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – água, sistema a 308,15 K.

Fonte: Mishima [21].

Observando os dados contidos nas tabelas, pode-se notar que as tensões interfaciais entre a água e os líquidos com elevada miscibilidade, como o n-butanol ( $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH}$ ), têm valores relativamente baixos; mas mesmo assim ainda são altos quando comparados com os valores de tensão interfacial para sistemas aquosos bifásicos (polímero/polímero). A tensão interfacial em sistemas aquosos poliméricos se encontra em uma faixa de valores entre  $0,5$  e  $500 \times 10^{-6} \text{ N.m}^{-1}$ , o que corresponde a duas ou três ordens de magnitude menores do que os encontrados para sistemas formados por água/solventes orgânicos [20].

Segundo da Silva e Loh [4], nos trabalhos pioneiros de Ryden e Albertsson, em 1971 [22], já eram relatados comportamentos característicos da  $\gamma$  em função de duas variáveis termodinâmicas: o comprimento da linha de amarração (CLA) e a massa molar dos dois polímeros. Estes autores mostraram existir uma relação simples entre a tensão interfacial e estas duas características dos SAB's formados, conforme a equação 6

$$\gamma = a(CLA)^b \quad (6)$$

Em que  $a$  e  $b$  são constantes dependentes da massa molar das macromoléculas formadoras dos SAB's. Os valores de  $\gamma$  permaneceram entre  $6,55 \times 10^{-5}$  e  $4,6 \times 10^{-7} \text{ N m}^{-1}$ , sendo que os valores menores pertencem a composições mais próximas ao ponto crítico. Estudando o mesmo sistema, Bamberg e colaboradores [23], propuseram uma relação exponencial entre a tensão interfacial e a diferença de composição entre as duas fases, expressa pelo comprimento da linha de amarração (CLA)

$$\gamma = ce^{d(CLA)} \quad (7)$$

em que  $c$  e  $d$  são constantes. Entretanto, uma limitação clara da Equação 7 é o fato de que ela prevê um valor finito para a tensão interfacial quando o sistema se encontra na composição do ponto crítico e isto fisicamente não

faz sentido. No ponto crítico, as diferenças entre todas as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase tornam-se inexistentes e, conseqüentemente, o valor da tensão interfacial se iguala a zero [4].

### 1.1.2 – Diagramas de fases

Os dados de equilíbrio líquido-líquido são normalmente apresentados por meio de diagramas de fases, ou diagramas de equilíbrio, que são representações gráficas descritivas do comportamento do sistema em diferentes condições. Os diagramas de equilíbrio podem ser construídos empregando tanto o sistema de coordenadas retangulares quanto triangulares, sendo que no primeiro, a concentração do solvente está implícita no diagrama [15,20].

Nos diagramas de fases, são representadas as composições dos sistemas em que ocorre, ou não, a separação de fases, indicando em qual composição global o sistema encontra-se bifásico ou monofásico. As Figuras 3 e 4 mostram dois tipos de diagramas. O primeiro expresso em coordenadas triangulares e o segundo em coordenadas cartesianas (retangulares). Os três vértices do triângulo equilátero representam, respectivamente, os componentes 1, 2 e 3 (água) puros. Os lados do triângulo representam sistemas binários, constituídos pelo componente 1 + água, componente 1 + componente 2, e componente 2 + água. Os pontos internos do triângulo representam misturas dos três componentes. A porcentagem de cada componente, em uma mistura, é lida ao longo da linha perpendicular no lado oposto do ápice correspondente [24] .

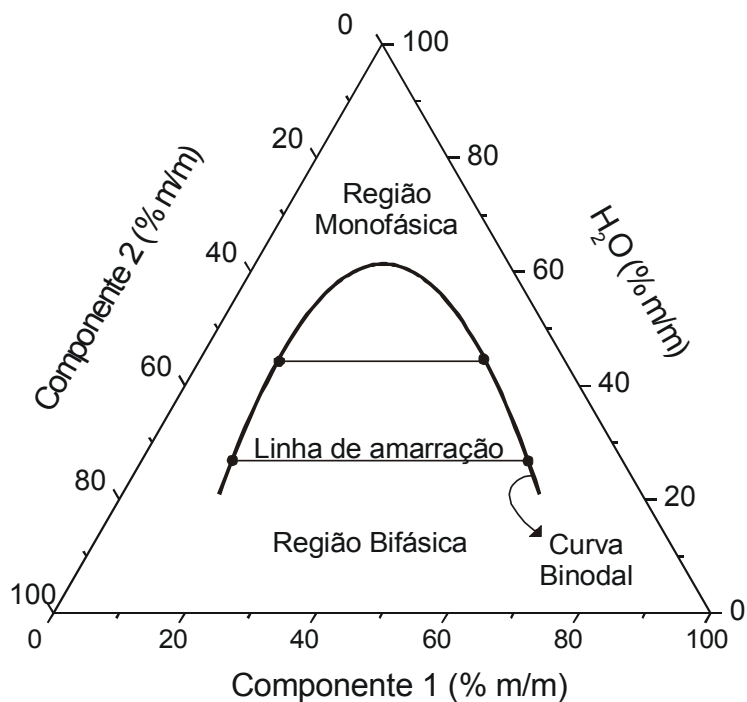


Figura 3: Diagrama de fase em coordenadas triangulares

O tipo de representação gráfica utilizada neste trabalho será a de coordenadas cartesianas, que é a mais comum na literatura existente sobre sistemas aquosos bifásicos [20].

No diagrama apresentado na Figura 4, são plotadas as concentrações do componente 1, geralmente o majoritário na fase inferior, no eixo das abscissas e do componente 2, majoritário na fase superior, nas ordenadas. O ponto A fornece as composições dos componentes 1 e 2 na fase superior enquanto que o ponto C, as composições na fase inferior. A linha binodal (curva A,Pc,C) informa em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo. Todas as misturas que têm composições representadas por pontos acima e à direita da binodal dão origem à separação de fases, enquanto que as misturas representadas pelos pontos abaixo e à esquerda da binodal não originam separação de fases [20,2]. Também são representadas as linhas de amarração, retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertença à região bifásica e que esteja sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores

que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc). A mesma descrição pode ser feita para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração [4].

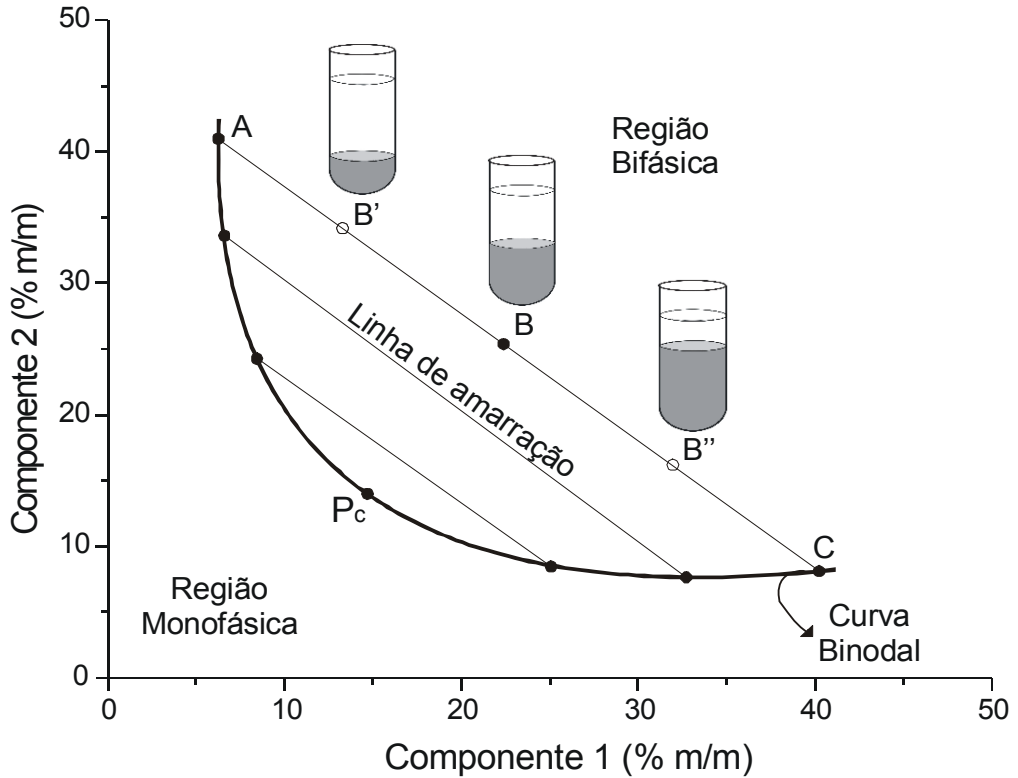


Figura 4: Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares

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

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

sendo [P] e [S] as concentrações de polímero e sal, respectivamente. Os sobrescritos S e I representam a fase superior e a fase inferior [15].

Considerando sucessivas linhas de amarração (paralelas entre si) de forma que elas diminuam, em comprimento, até que os dois pontos A e C coincidam, chega-se ao ponto crítico (Pc), sendo a composição representada pelo ponto Pc denominada composição crítica. Neste ponto, as composições e os volumes das duas fases teoricamente tornam-se iguais. Logo, uma mudança muito pequena na composição global, de baixo para cima em relação à Pc significa uma mudança do sistema de monofásico para bifásico, com o volume das duas fases formadas muito próximos à igualdade. Pode-se dizer que as propriedades termodinâmicas intensivas e extensivas das fases em equilíbrio, no ponto crítico, são iguais [24].

Outro parâmetro termodinâmico importante é o comprimento da linha de amarração (CLA), geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição dos solutos em SAB's formados por diferentes componentes, sendo calculado como segue:

$$CLA = \left\{ \left[ C(COMP_1)_{FS} - C(COMP_1)_{FI} \right]^2 + \left[ C(COMP_2)_{FS} - C(COMP_2)_{FI} \right]^2 \right\}^{0,5} \quad (9)$$

em que  $C(COMP_1)_{FS}$ ,  $C(COMP_1)_{FI}$ ,  $C(COMP_2)_{FS}$  e  $C(COMP_2)_{FI}$  são as concentrações (% m/m) dos componentes do SAB nas fases superior (FS) e inferior (FI), respectivamente. Com o aumento do valor do parâmetro CLA, aumenta a diferença entre a fase superior e a inferior, em termos de propriedades termodinâmicas intensivas [4].

Deve-se ainda mencionar que, 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 [20].

### 1.1.3 – Efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases

As propriedades termodinâmicas entalpia e entropia dos sistemas devem ser analisadas para verificar o efeito da temperatura sobre a separação de fases.

Considerando o efeito da temperatura na constante de equilíbrio (K) de formação da interação Sal-PEG após a saturação do polímero:

Segundo da Silva e Loh (2000) [25], 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 (Equação 10):



sendo que

$$K = \frac{[\text{Sal} - \text{PEG}]}{[\text{Sal}][\text{PEG}]}$$

Desta forma, o favorecimento da interação Sal-PEG levaria à diminuição 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 a 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, ocorrendo também um incremento na sua entropia configuracional.

Ao mesmo tempo, a entropia conformacional do polímero aumenta, pois a elevação da temperatura provoca o enovelamento da cadeia do poli(etileno 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 curva binodal para regiões mais próximas aos eixos do diagrama de equilíbrio [15].

Zafarani-Moattar e Gasemi [26] investigaram o efeito da temperatura nas curvas binodais em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 6000 e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ou  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Eles verificaram que a área bifásica é expandida com o aumento da temperatura. Adicionalmente, a inclinação e o comprimento de todas as linhas de amarração aumentaram com o aumento da temperatura. Resultados similares foram obtidos por Voros e colaboradores [27], Mishima e colaboradores [28], e Zafarani-Moattar e Hamidi [29] para outros SAB's contendo PEG e sal.

Comparando SAB's formados por PEG 6000 e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ou  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Zafarani-Moattar e Sadeghi [30] também verificaram que a área bifásica é expandida com o aumento da temperatura. Entretanto, com concentrações mais altas de polímero as binodais se cruzam e o efeito da temperatura é revertido, ocorrendo um aumento da região monofásica com a elevação da temperatura. Mishima e colaboradores [28], observando as binodais de SAB's formados por PEG 6000 e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , obtiveram resultados similares nas regiões de altas concentrações de PEG.

Zafarani-Moattar e Sadeghi [30] verificaram que a inclinação e o comprimento das linhas de amarração aumentam com a elevação da temperatura, isto porque as composições das fases em equilíbrio mudam com a variação da temperatura. O aumento da temperatura nos SAB's formados por PEG e sal causará um incremento na concentração de PEG na fase superior e uma diminuição da concentração de sal na fase inferior. Resultados similares foram obtidos por Voros e colaboradores [27] e Mishima e colaboradores [28] para outros SAB's contendo PEG e sal.



### 1.1.3 – Efeito da massa molar do polímero sobre o equilíbrio de fases

Em se tratando da massa molar do polímero, quanto maior a massa molar, menor a concentração requerida para a separação de fases, e ainda, quanto maior a diferença no tamanho molecular entre os dois polímeros, mais assimétrica será a curva binodal [2,31]. Albertsson [2] observou também que quanto maior a massa molar do polímero formador do SAB menor será a concentração requerida do segundo componente, seja ele um outro polímero ou um sal, para que ocorra a separação de fases.

Estudos com sistemas aquosos compostos por citrato de sódio + PEG de diferentes massas molares, em pH 9,2 e a 22°C, mostraram que as curvas binodais se tornaram assimétricas e mais próximas da origem com o aumento da massa molar do PEG e, conseqüentemente menores concentrações de PEG eram necessárias para que ocorresse a separação de fases [32]

Em outros trabalhos, como os de Ananthapadmanabhan e Goddard [3], Lei et al. [33], Forcinit et al. [34], Voros et al. [27], da Silva et al. [35], da Silva e Meirelles [36] e Zafarani-Moattar e Sadeghi [30], foi também observado o mesmo comportamento, ou seja, aumento da região bifásica como conseqüência da maior massa molar do polímero constituinte do sistema.

Analisando as curvas binodais dos sistemas aquosos bifásicos, pode-se observar o efeito da massa molar do PEG na separação de fases. Quando a massa molar do PEG é aumentada, as curvas se deslocam para concentrações menores de PEG e sal. Isso se deve à solubilidade do PEG diminuir com o aumento da massa molar. De fato, com massas molares maiores de PEG, a fase rica em PEG atinge a saturação em concentrações de PEG relativamente baixas já que as moléculas de PEG são maiores. Essa tendência foi também observada em outros resultados experimentais [2, 27, 34, 35].

#### 1.1.4 – Efeito do tipo de sal sobre o equilíbrio de fases

A separação de fases em misturas contendo polieletrólitos depende fortemente da força iônica e do tipo de íon presente no sistema [2].

Considerando SAB's formados por PEG 6000 e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Zafarani-Moattar e Gasemi [26] verificaram que o tamanho da região bifásica aumentava quando o tamanho do cátion diminuía. Os sais empregados compartilhavam o mesmo ânion e continham cátions monovalentes com raios iônicos de 0,137, 0,133 e 0,098 nm ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ , respectivamente).

Zafarani-Moattar e Sadeghi [30] estudaram SAB's contendo PEG 6000 e os sais  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Esses sais compartilham um cátion comum ( $\text{Na}^+$ ), mas contêm ânions de carga crescente. O aumento da carga do ânion de -1 ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) para -3 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) diminui a concentração de sal na qual a separação de fases acontece. Ananthapadmanabhan e Goddard [3] 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  $\text{PO}_4^{3-} > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_3^{2-} > \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-} > \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4^{2-} > \text{OH}^-$ . Deste modo, quanto maior for a valência do ânion, menor será a quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico.

Quanto à tendência dos sais de sulfato de formarem SAB, a ordem decrescente é:  $\text{Al}^{3+} > \text{Na}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{NH}_4^+ > \text{Li}^+$ .

Esses autores sugerem que ânions com valências mais altas são melhores agentes formadores de SAB's do que ânions com valências menores, devido ao fato de que ânions de valências maiores necessitam de um número maior de moléculas de água de solvatação do que os ânions de valências menores, diminuindo assim, a quantidade de água disponível para solvatar o PEG. Esse comportamento foi predito teoricamente por Kenkare e Hall [37].

Considerando sais formados pelo mesmo cátion e ânions diferentes com a mesma valência ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NaHSO}_4$ ), pode ser verificado que a eficiência na formação de fase é aumentada de  $\text{NaHSO}_4$  para  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , devido a solubilidade do  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em água ser menor do que a do  $\text{NaHSO}_4$ .

## 1.2 – Componentes dos sistemas aquosos bifásicos

### 1.2.1 – Poli (etileno glicol) (PEG)

O poli (etileno 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 [38].

Devido ao seu caráter atóxico, pode também ser utilizado em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. É 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 [39].

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. Em seu estado cristalino, a cadeia de poli (óxido de etileno) apresenta conformação helicoidal contendo sete unidades químicas ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ ) e duas rotações em torno da cadeia a cada  $19,3 \text{ \AA}$  [38].

## 1.2.2 – Sulfato de zinco e sulfato de cobre

O zinco é um metal branco azulado, moderadamente maleável e dúctil a 110-150 °C. Funde a 410 °C e seu ponto de ebulição é 906 °C [40]. Nos seus compostos, o único estado de oxidação importante é o 2<sup>+</sup>. O íon do zinco (Zn<sup>2+</sup>), em solução aquosa é um íon tetraaquo tetraédrico (quatro moléculas de água à sua volta, em um geometria tetraédrica), e sua solução é ácida devido à hidrólise [41].

O sulfato de zinco é um sal comumente encontrado na sua forma hidratada. O sulfato de zinco heptatahidratado (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) é um sal cristalino, incolor, inodoro, solúvel em água formando soluções de pH aproximadamente igual a 4,5, decompõe-se em temperaturas acima de 500 °C e, em temperaturas acima de 280 °C, perde todas as moléculas de água de cristalização [42].

O cobre é um metal vermelho pálido, macio, maleável e dúctil. Funde a 1038 °C, sendo um excelente condutor elétrico (o melhor depois da prata). Nos compostos, mostra ter dois estados de oxidação, +1 e +2, sendo o estado +2 o mais importante. O íon cúprico (Cu<sup>+2</sup>) forma um hexaaquocomplexo azul no qual duas moléculas de água estão mais distantes do cobre que as outras quatro, formando a estrutura de um octaedro tetragonalmente distorcido [40,41].

O sulfato de cobre pode se apresentar como um sólido branco, azul ou esverdeado, é inodoro e solúvel em água. É usualmente fornecido na forma pentahidratada (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O). Acima de 110 °C, este sal perde água de cristalização formando o sulfato de cobre monohidratado e, acima de 250 °C, perde toda a água de cristalização [43].

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 – Reagentes**

Poli (etileno glicol) (PEG) 6000 g.mol<sup>-1</sup> (ISO FAR, Brasil)

Sulfato de zinco heptaidratado (VETEC, Brasil)

Sulfato de cobre anidro (NUCLEAR, Brasil)

Sulfato de cobre pentaidratado (VETEC, Brasil)

### **2.2 – Equipamentos**

Balança analítica M-310 (Denver Instrument, USA)

Banho termostático TE-184 (TECNAL, Brasil)

Banho termostático C10-B3 (HAAKE, Alemanha)

Centrífuga 5804 (Eppendorf, Alemanha)

Espectrofotômetro de absorção atômica (Varian SpectrAA – 200, Austrália)

Liofilizador (Edwards do Brasil, Brasil)

Purificador de água – (Sistema Milli-Q, Millipore, EUA)

### **2.3 – Métodos**

#### **2.3.1 – Titulação turbidimétrica**

Anteriormente à preparação dos sistemas aquosos bifásicos, compostos por PEG/Sal/Água, utilizou-se a técnica da titulação turbidimétrica, de acordo com metodologia proposta por Albertsson (1960), para se definir as quantidades de cada componente necessárias para a obtenção do ponto global de um sistema bifásico. As titulações foram feitas nas temperaturas de trabalho (5, 10, 35 e 45) °C.

Todas as titulações turbidimétricas foram realizadas como descrito abaixo.

Para o sistema PEG 6000/sulfato de zinco – foi adicionado aproximadamente, 1 g de uma solução a 50% em massa do PEG, em um tubo de ensaio de 35 mL, termostaticado à temperatura de 45 °C (também foram feitas titulações turbidimétricas à 5, 10 e 35 °C).

A esta solução foram adicionadas, subseqüentemente, alíquotas de 10 µL de uma solução de sulfato de zinco a 30% em massa, sempre com agitação, até o surgimento de turvação na solução resultante.

Em seguida, o sistema foi deixado em repouso por alguns minutos até a confirmação da formação de duas fases e a composição total do sistema foi anotada.

Ao mesmo sistema foi adicionado 1,0 mL de água, para ocorrer homogeneização da solução.

Adicionam-se ao sistema incrementos de 10 µL até nova turvação.

A composição total foi anotada e mais 1,0 mL de água foi adicionada para que o sistema apresentasse novamente uma única fase.

Este procedimento foi repetido até percorrer uma faixa ampla de composições e, assim, obter a curva espínodal a partir do diagrama de fases do sistema.

### **2.3.2 – Preparo dos sistemas aquosos bifásicos**

Os sistemas aquosos bifásicos foram obtidos adicionando-se massas adequadas de PEG, sal e água deionizada (Sistema Milli-Q, Millipore, EUA), totalizando uma massa de 40 g. As massas foram adicionadas diretamente no tubo utilizado como célula de equilíbrio e pesadas em balança analítica. A mistura foi agitada mecanicamente, por 30 min, sendo posteriormente centrifugada a 2000 g, por 10 min, acelerando a separação das fases. Após os procedimentos anteriores, os tubos foram colocados em banho termostático, mantendo sua temperatura controlada, e mantidos em repouso durante 24 horas.

Para a preparação, por exemplo, de um sistema contendo 9,5% de sulfato de zinco, 11,5% de PEG 6000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e 79% de água, que seria posteriormente mantido a 10 °C, foi utilizado um tubo de centrifuga como célula de equilíbrio e, neste tubo, foram pesados, em balança analítica (M-310, Denver Instrument), 6,8261 g de sulfato de zinco, 4,6171 g de PEG 6000 e 28,5568 g de água. A massa do sulfato de zinco foi ligeiramente superior à necessária para se atingir a porcentagem em massa descrita inicialmente, e a massa de água foi ligeiramente inferior, devido ao fato do sulfato de zinco utilizado ser o sulfato de zinco heptaidratado, contendo sete moléculas de água em sua estrutura. Para fins de cálculos, a massa de água agregada ao sulfato de zinco foi descontada de sua massa total pesada e adicionada à massa de água.

Foram escolhidos cinco pontos globais de mistura para cada uma das quatro temperaturas em estudo (5, 10, 35 e 45) °C, e todos os sistemas aquosos bifásicos preparados com PEG 6000, sulfato de zinco e água seguiram a descrição acima.

Para os sistemas compostos por PEG 6000, sulfato de cobre e água, ocorreu somente uma variante em relação ao procedimento descrito para o sulfato de zinco. Pôde-se medir as massas diretamente quando se utilizou sulfato de cobre anidro, em uma parte do experimento. O sulfato de cobre pentahidratado também foi usado e, neste caso, como no do sulfato de zinco heptaidratado, foi tomado o cuidado de se descontar a massa de água contida na estrutura cristalina do sal e, adicioná-la à massa total de água.

Todos os SAB's, soluções e diluições, foram preparados cuidadosamente utilizando-se água ultra pura (Sistema Milli-Q, Millipore, EUA) e balança analítica.

### 2.3.3 – Determinação dos dados de equilíbrio

#### 2.3.3.1 – Coleta das fases

Após o preparo dos sistemas, esses foram acondicionados em banho termostático, durante um período não inferior a 24 h, para que o equilíbrio fosse atingido e as duas fases se apresentassem límpidas. Após estabelecido o equilíbrio, partiu-se para a coleta das fases.

A fase superior foi coletada utilizando-se uma seringa (20 mL), sem a agulha, tomando-se o cuidado de deixar uma pequena camada desta fase, de aproximadamente 5 mm acima da interface. O motivo deste procedimento é garantir que a interface não seja perturbada.

A fase inferior foi coletada utilizando-se uma seringa (20 mL), com agulha longa. A seringa foi introduzida na célula de equilíbrio cuidadosamente, visando causar a menor perturbação possível à interface do sistema. Após 1 h em repouso, esperando-se que o equilíbrio fosse restabelecido, moveu-se o êmbolo da seringa, vagarosamente, sugando assim a fase inferior e tomando-se o cuidado de que restasse na célula de equilíbrio uma camada desta fase, evitando-se a sucção da fase superior.

As fases coletadas foram acondicionadas em recipientes com tampas e armazenadas sob refrigeração até que as análises fossem realizadas. Cada fase do sistema teve seus componentes quantificados e os diagramas de equilíbrio foram construídos.

#### 2.3.3.2 – Densidade

As densidades das fases foram medidas, em cada uma das temperaturas dos sistemas, usando picnômetros de 10 cm<sup>3</sup>, calibrados inicialmente com água. A temperatura ambiente foi anotada, pois este dado é necessário para se conhecer a densidade da água. Deverão ser conhecidos, então, a massa do picnômetro vazio e seco ( $m_{pic.vazio}$ ), a massa



do picnômetro com água ( $m_{pic+água}$ ) e a densidade da água ( $\rho_{água}$ ), para se calcular o volume do picnômetro, utilizando a Equação 11.

$$V = \frac{m_{pic+água} - m_{pic.vazio}}{\rho_{água}} \quad (11)$$

Aferido o picnômetro, partiu-se então para a obtenção da densidade de cada fase. Retirou-se uma amostra da fase, que se encontrava com temperatura controlada pelo banho termostático, utilizando-se uma seringa, e transferiu-se para o picnômetro, o qual foi pesado logo em seguida. De posse dos dados da massa do picnômetro com a massa da amostra ( $m_{pic+amostra}$ ), massa do picnômetro vazio ( $m_{pic.vazio}$ ) e do volume do picnômetro ( $V$ ), pode-se calcular a densidade das fases ( $\rho_{fase}$ ) pela Equação 12.

$$\rho_{fase} = \frac{m_{pic+amostra} - m_{pic.vazio}}{V} \quad (12)$$

### 2.3.3.3 – Volume das fases

Foram utilizados dois métodos para a determinação dos volumes ocupados pelas fases dos sistemas em cada célula de equilíbrio.

Em um dos métodos, obteve-se uma relação entre a altura da coluna de água atingida pela fase e a sua massa correspondente. Utilizando-se a densidade da água na temperatura na qual foram feitas as medidas e a relação  $\rho = m/V$ , pôde-se construir uma curva analítica relacionando a altura da coluna de água em função do volume ocupado pela mesma (este procedimento foi feito para cada um dos tubos utilizados, calibrando-os). Para saber qual era o volume das fases, media-se com uma régua as alturas referentes a cada uma. No caso da fase inferior era medido a altura da base do tubo até a interface do sistema e, com este valor, calculava-se o seu

volume. Para a fase superior era utilizado a altura total ocupada pela sistema subtraída da altura equivalente à interface. Essa diferença era então utilizada para obter o volume da fase superior.

O outro método consistia em marcar um tubo plástico de 50 mL (tubo de centrífuga), utilizado como célula de equilíbrio, nos pontos onde se encontravam a superfície do sistema e também a interface entre as duas fases líquidas. O SAB era então retirado dos tubos, cada uma das fases tinha sua densidade determinada e eram devidamente separadas e acondicionadas em frascos com tampas. Os tubos passavam por uma lavagem e uma secagem, tomando-se cuidado para não apagar as marcas das fases. Após secos, eram levados para uma balança analítica que era zerada com o tubo sobre seu prato, adicionava-se água até a marca da interface (equivalente ao volume da fase inferior) e anotava-se a massa; mais água era adicionada até que seu nível atingisse a marca referente à superfície do sistema e novamente, a massa de água era anotada. De posse do valor da massa total do sistema e da massa de água equivalente a fase inferior, por subtração se obtinha a massa de água equivalente ao volume ocupado pela fase superior. Tendo-se em mãos as massas de água equivalentes aos volumes das fases inferiores e superiores e a densidade da água na temperatura em que foram realizadas as medidas, pôde-se calcular o volume ocupado por cada uma das fases.

Foi observado que os resultados obtidos para as massas totais dos sistemas quando se utilizavam os valores oriundos da calibração dos tubos, continham, em média, erros de 2% e, quando se utilizavam os valores vindos do método que utilizava a marcação nos tubos, estes erros eram raramente maiores que 0,2%, o que levou à escolha do segundo método como padrão para a obtenção de dados neste trabalho.

#### **2.3.3.4 – Quantificação do teor de água**

A quantidade de água presente em cada fase foi determinada utilizando a técnica da liofilização. Neste processo, a água sofre sublimação, pois é submetida a baixas temperatura e valores de pressão.

Tubos de vidro, limpos e secos, de aproximadamente 4 cm de altura e 3 cm de diâmetro foram pesados e tiveram suas massas anotadas. Adicionou-se, então, aproximadamente 1,0 g da fase e, novamente, anotou-se a massa. Em seguida, os tubos foram fechados com tampas plásticas perfuradas (para evitar a projeção do material sólido após a secagem) e a massa total foi então determinada. Os tubos foram mantidos no congelador à temperatura de -12 °C, durante um período não inferior a 24 horas e levados ao liofilizador, submetidos então à temperatura de -52 °C e à uma pressão de 12 N/m<sup>2</sup> durante 24 h, para a secagem.

Após a liofilização, todos os tubos foram imediatamente pesados e os valores usados para calcular a perda de massa. Considerando que toda a diferença nas massas foi devida à sublimação da água da amostra, pôde-se calcular a porcentagem de água contida na amostra. A análise foi feita em duplicata e o desvio padrão calculado posteriormente.

#### **2.3.3.5 – Quantificação do sulfato de cobre e do sulfato de zinco**

As concentrações de sulfato de cobre e sulfato de zinco nas fases dos sistemas aquosos bifásicos foram determinadas de forma indireta pela quantificação do teor de cobre e zinco, via espectrofotometria de absorção atômica (Espectrofotômetro Varian SpectrAA-200) para as fases superiores e inferiores. Na absorção atômica, o elemento a ser determinado é levado à condição de uma dispersão atômica gasosa através da qual se faz passar, então, o feixe de radiação de uma fonte apropriada (lâmpada de cátodo oco). O processo usual consiste em introduzir a solução da amostra, na forma de um aerossol, em uma chama apropriada. A extensão da absorção, que se processa a custa de transições eletrônicas do estado fundamental a

um estado energético mais alto, é uma medida da população de átomos do elemento responsável, presente na chama e, portanto, da concentração do elemento na amostra.

Antes de cada análise, se construiu uma curva analítica para cada elemento. Para o Zinco as concentrações máximas detectáveis dentro desta curva, eram de 2 mg/L e, para o Cobre 5,5 mg/L. As quantificações foram feitas diluindo-se amostras de cada fase, até que a concentração do metal em solução, tivesse valores dentro da curva analítica. As análises foram feitas em duplicata e o desvio padrão calculado.

#### **2.3.3.6 – Quantificação do teor de poli (etileno glicol)**

A quantificação do poli (etileno glicol) foi feita utilizando os valores obtidos nas determinações da água e do sal, e por diferença encontrou-se a percentagem de PEG.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SILVA, L.H.M. *Uso da calorimetria em estudos físico-químicos de processos responsáveis pela formação de sistemas líquidos bifásicos contendo poli(óxido de etileno)*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, **2001**.
- [2] Albertsson, P-A. *Partitioning of cell particles and macromolecules*. 2nd ed. Ed. John Wiley, New York, **1986**.
- [3] Ananthapadmanabhan, K. P.; Goddard, E. D.. *Aqueous Biphasic Formation in Polyethylene Oxide-Inorganic Salt Systems*. *Langmuir*, v. 3, p. 25-31, **1987**.
- [4] da Silva, L. H. M.; Loh, W;. *Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas*. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, **2006**.
- [5] Sassonia, R. C.; *Estudo da termodinâmica de partição de polímeros hidrossolúveis em sistemas líquidos bifásicos aquosos/orgânicos*. Dissertação (Mestrado – Físico-química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, **2004**.
- [6] da Rosa, R. G.; Martinelli, L.; da Silva, L. H. M.; Loh, W.; *Easy and efficient processes for catalyst recycling and product recovery in organic biphasic systems tested in the hydrogenation of hex-1-ene*. *Chemical Communications*, n.1, p. 33-34, **2000**,
- [7] Spitzer, M.; da Silva, L. H. M.; Loh, W.; *Liquid Biphasic Systems Formed in Ternary Mixtures of Two Organic Solvents and Ethylene Oxide Oligomers or Polymers*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 11, p. 375-380, **2000**,

- [8] da Silva, L. H. M.; Loh, W.; *Polymer induced multiphase generation in water/organic solvent mixtures. Strategies towards the design of triphasic and tetraphasic liquid systems*. Chemical Communications, v. 7, p. 787-788 **1998**,
- [9] Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R. *Measurement and correlation of liquid–liquid equilibria of the aqueous two-phase system polyvinylpyrrolidone–sodium dihydrogen phosphate*. Fluid Phase Equilibria, v. 203, p. 177–191, **2002**.
- [10] Coimbra, J. S. R. *Desempenho de um extractor tipo graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos*. Campinas, SP: UNICAMP, **1995**. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, **1995**.
- [11] Haghtalab, A.; Mokhtarani, B. *The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid–liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)*. Fluid Phase Equilibria, v. 215, p. 151–161, **2004**.
- [12] Molyneux, P.; Franks, F. (editores). *Water: A comprehensive treatise*. Editora Plenum, New York, NY. v. 4, p. 569-757, **1975**
- [13] Matsuyama, H.; Teramoto, M.; Kudari, S, Kitamura, Y.; *Effect of diluents on membrane formation via thermally induced phase separation*. Journal of Applied Polymer Science, v. 82, p. 169-177, **2001**.

- [14] 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 aquosos bifásicos do tipo PEG/sal*. Campinas, SP: UNICAMP, **2003**. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, **2003**.
- [15] Carvalho, C. de P.; *Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por poli (etileno glicol), sais e água*. Viçosa, MG: UFV, **2004**. 70 f. Dissertação (Mestrado – Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. **2004**.
- [16] da Silva, M. C. H.; Da Silva, L. H. M.; Paggioli, F. J.; Coimbra, J. S. R. e Minim, L. A.. *Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons*. Química Nova, v. 29, n. 6, p. 1332-1339, **2006**.
- [17] Chung, B. H.; Kim, W. K.; Song, K.; Kim, C.; Rhee, S.. *Novel polyethylene glycol/levan aqueous two-phase system for protein partitioning*. Biotechnology Techniques, v. 11, n. 5, p. 327–329, **1997**.
- [18] Oliveira, R. S., *Interação de ácido algínico com surfactantes catiônicos em solução aquosa*. São José do Rio Preto, SP: UNESP. **2006**. 85 f. Tese (doutorado em Biofísica Molecular). Universidade Estadual Paulista – UNESP. São José do Rio Preto. SP. **2006**
- [19] Castellan, G., *Fundamentos de físico-química*, 1ª ed. Rio de Janeiro, editora LTC – Livros Técnicos e Científicos, **1986**. 527 p.
- [20] Zaslavsky, B. Y., *Aqueous two-phase partitioning: Physical chemistry and bioanalytical*. New York, NY. editora Marcel Dekker, **1995**. 696 p.

- [21] Mishima, K.; Matsuyama, K.; Ezawa, M.; Taruta, Y.; Takarabe, S.; Nagatani, N.. *Interfacial tension of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) and dipotassium hydrogenphosphate*. Journal of Chromatography B, v. 711, p. 313-318, **1998**.
- [22] Ryden, J.; Albertsson, P. A.; *Interfacial tension of dextran-polyethylene glycol-water two-phase systems*. Journal of Colloid and Interface Science, v. 37, p. 219-222, **1971**
- [23] Bamberg, S.; Geoffrey, V.; Seaman, F.; Sharp, K. A.; Brooks, D. E.. *The effects of salts on the interfacial tension of aqueous dextran poly(ethylene glycol) phase systems*. Journal of Colloid and Interface Science. v. 99, n. 1, p. 194-200, **1984**.
- [24] Mesquita, A. F.; *Estudo termodinâmico da partição de lactoproteínas em sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros blocos*. Viçosa, MG: UFV, **2004**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. **2004**.
- [25] Da Silva, L. H. M; Loh, W. *Calorimetric investigation of the formation of aqueous twophase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran)*. Journal Physical Chememistry B, v. 104, p. 10069-10073, **2000**.
- [26] 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**.
- [27] 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, n. 2, p. 333-353, **1993**.



- [28] Mishima, K.; Nakatani, N.; Nomiyama, T.; Matsuyama, K.; Nagatami, M.; Nishikawa, H.. *Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and dipotassium hydrogenphosphate*. Fluid Phase Equilibria, v. 107, n. 2, p. 269-276, **1995**.
- [29] Zafarani-Moattar, M. T.; Hamidi, A. A.. *Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Poly(ethylene glycol)-Potassium Citrate System*. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 48, p. 262-265, **2003**.
- [30] 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**.
- [31] OLIVEIRA, R. M., *Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por poli (etileno glicol), sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas*. Viçosa, MG: UFV, **2006**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, **2006**.
- [32] Tubío G.; Pellegrini, L.; Nerli, B. B.; Picó, G. A.. *Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate*. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 51, n. 1, p. 209-212, **2006**.
- [33] 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*. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 35, n. 4, p. 420-423, **1990**.
- [34] 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, n. 3, p. 243-262, **1991**.

- [35] 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*. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 42, n. 2, p. 398-401, **1997**.
- [36] Meller da Silva, L. H. ; Meirelles, A. J. A.. *PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning*. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 46, n. 2, p. 251-255, **2001**.
- [37] Kenkare, P. U.; Hall, C. K.. *Modeling of phase separation in PEG-salt aqueous two-phase systems*. AIChE Journal, v. 42, n. 12, p. 3508-3522, **1996**.
- [38] Murrell, J. N.; Jenkins, A. D. *Properties of Liquids and Solutions*, Second Edition. New York: J. Wiley, **1994**. 303 p.
- [39] 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**.
- [40] Vogel, A. I.; *Química Analítica Qualitativa*, 5 ed. São Paulo, SP. Editora Mestre Jou, **1981**. 665 p.
- [41] Russel, J. B.; *Química Geral*, São Paulo, Editora McGraw-Hill do Brasil, **1981**. 897 p.
- [42] MSDS – Material Safety Data Sheet. Disponível em : < <http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/z4560.htm> >. Acesso em: 10 maio 2006
- [43] EXTTOXNET – Extension Toxicology Network. Disponível em: < <http://exttoxnet.orst.edu/pips/coppersu.htm> >. Acesso em: 11 maio 2006.

## CAPÍTULO 2

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA NATUREZA DO SAL NO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR POLI (ETILENO GLICOL) 6000, SULFATO DE COBRE OU SULFATO DE ZINCO E ÁGUA.**

### RESUMO

Neste trabalho, foram preparados Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's) formados por polietileno glicol (PEG) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de zinco ou sulfato de cobre e água. Foram determinadas as composições das fases, em equilíbrio termodinâmico, em função da temperatura e da natureza do eletrólito formador dos SAB's. Em todos os sistemas, verificou-se um aumento da região bifásica com a elevação da temperatura. O sal com maior capacidade de indução de fases foi o ZnSO<sub>4</sub>.

Palavras-chave: Equilíbrio de Fases, poli (etileno glicol), sulfato de cobre, sulfato de zinco, temperatura.

## 1 – INTRODUÇÃO

Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's) foram primeiramente relatados na literatura por Beijerinck, em 1896. Ele descobriu que, misturando-se gelatina, ágar e água em certas concentrações, formava-se um sistema aquoso com duas fases, a fase superior rica em gelatina e a inferior rica em ágar. Em 1947, um estudo sistemático realizado por Dobry e Boyer verificou que a separação de fases era comumente encontrada em misturas contendo polímeros e diferentes solventes. Entretanto, somente em 1955, Albertsson observou que poli (etileno glicol) (PEG) + dextrana + água e PEG + fosfato de potássio + água formavam SAB's. Estes são os sistemas mais freqüentemente estudados e utilizados atualmente para a purificação de biomoléculas. Nos últimos 50 anos, muitos pesquisadores têm aplicado estes sistemas à separação em escala de laboratório de proteínas, células, organelas celulares, vírus, fragmentos da membrana celular, íons e outros materiais biológicos<sup>1-4</sup>.

Os dois tipos mais comumente encontrados de SAB's são os formados por, dois polímeros diferentes ou um polímero e um soluto de pequena massa molar, geralmente um sal.

São relatados dados de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 6000 e sais como  $\text{Na}_2\text{HPO}_4^5$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4^5$ ,  $\text{MgSO}_4^6$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4^6$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4^6$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4^7$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4^7$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7$  (citrato de potássio)<sup>2</sup>,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$  (succinato de sódio)<sup>8</sup> e  $\text{CHNaO}_2$  (formato de sódio)<sup>8</sup>. Para SAB's utilizando sulfato de zinco e PEG, foram encontrados dados sobre as seguintes massas molares do polímero; 1000<sup>9,10</sup>, 2000<sup>9,10,11</sup>, 3000<sup>9</sup>, 3400<sup>10</sup> e 8000<sup>12</sup>. Foi encontrado apenas um trabalho sobre sistemas aquosos bifásicos utilizando sulfato de cobre e PEG (3350 g.mol<sup>-1</sup>)<sup>13</sup>

Portanto, no presente trabalho foram determinados dados de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de zinco ou sulfato de cobre. Cada sistema foi estudado em quatro temperaturas diferentes, (5, 10, 35 e 45) °C, buscando-se avaliar os efeitos da variação da temperatura e do tipo de eletrólito no equilíbrio de fases.

## 2 – MATERIAS E MÉTODOS

Os materiais empregados foram o PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup> (ISO FAR, Brasil), sulfato de zinco heptaidratado (VETEC, Brasil) e o sulfato de cobre anidro (NUCLEAR, Brasil), todos de grau analítico. Os reagentes foram utilizados como recebidos, sem qualquer procedimento de purificação adicional.

**Preparo dos SAB's:** os sistemas aquosos bifásicos foram obtidos adicionando-se massas adequadas de PEG, sal e água, totalizando uma massa de 40 g. A mistura foi agitada mecanicamente por 30 min, sendo posteriormente centrifugada (Eppendorf, 5804, Alemanha) a 2000 g por 10 min, acelerando a separação das fases. Após os procedimentos anteriores, os tubos foram colocados em banho termostático (TECNAL, TE-184, Alemanha), mantendo sua temperatura constante, com uma incerteza de  $\pm 1$  °C, e deixados em repouso durante 24 h.

Foram determinados dados de equilíbrio partindo de cinco pontos de composições globais diferentes em cada uma das quatro temperaturas de estudo, (5, 10, 30 e 45 °C). Todos os SAB's, soluções e diluições, foram preparados cuidadosamente utilizando-se água ultra pura (Sistema Milli-Q, Millipore, EUA) e balança analítica (Denver Instrument, M-310, USA), com sensibilidade de 0,1 mg. A densidade foi determinada através do método do picnômetro.

**Quantificação dos teores de água, sal e PEG:** A quantidade de água presente em cada fase foi determinada utilizando a técnica da liofilização. As amostras foram mantidas no congelador à temperatura de -12 °C, durante um período não inferior a 24 h, e levadas ao liofilizador (Edwards do Brasil, Brasil), quando foram submetidas a uma temperatura de -52 °C e uma pressão de 12 N/m<sup>2</sup> durante 24 h. Após a liofilização todos os tubos foram imediatamente pesados e os valores usados para calcular a perda de massa. As concentrações de sulfato de cobre e sulfato de zinco, em cada uma das fases foram determinadas de forma indireta pela quantificação do teor de cobre e zinco, via espectrofotometria de absorção atômica (Espectrofotômetro Varian SpectrAA-200). A quantificação do PEG foi feita

utilizando os valores obtidos nas quantificações da água e do sal e, por diferença, encontrou-se a porcentagem de PEG. Todo experimento foi feito em triplicata.

### **3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As composições globais de equilíbrio, da fase superior e da fase inferior, dos SAB's formados por PEG 6000, sulfato de cobre e água, e PEG 6000, sulfato de zinco e água são mostradas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Para cada diagrama foram determinados dados para cinco linhas de amarração.

A estimativa dos desvios padrões encontrados para as análises dos SAB's formados por PEG 6000, sulfato de cobre e água, foram de 0,40 para a quantificação do sal e 0,36 para a quantificação da água. Já para os SAB's formados por PEG 6000, sulfato de zinco e água foram de 0,45 para a quantificação do sal e 2,67 para a quantificação da água. Na Tabela 2 os valores negativos de frações mássicas encontradas para o PEG em alguns pontos, foram substituídos por zero. Os valores negativos estavam dentro do erro experimental.

Tabela 1: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre e água, em diferentes temperaturas.

TOTAL			FASE SUPERIOR			FASE INFERIOR		
Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
<b>5 °C</b>								
9,01	13,38	77,60	5,38	18,97	72,28	14,91	6,19	75,39
9,26	13,88	76,86	4,81	21,05	71,45	15,73	7,04	74,43
9,50	14,38	76,12	4,07	22,76	70,59	17,25	6,56	73,51
9,75	14,87	75,38	4,09	23,24	69,72	17,39	6,74	72,79
10,00	15,37	74,63	3,79	23,80	69,12	18,58	5,35	72,61
<b>10 °C</b>								
8,39	11,87	79,74	5,13	17,95	74,16	13,83	6,06	77,23
8,75	12,62	78,63	4,32	19,77	72,51	14,85	5,58	76,00
9,13	13,38	77,50	3,78	21,53	71,16	15,67	6,10	74,54
9,50	14,13	76,37	3,66	23,03	69,85	16,42	6,55	73,38
9,87	14,87	75,26	3,42	24,20	69,40	18,08	6,05	72,74
<b>35 °C</b>								
8,04	11,06	80,90	5,20	16,62	74,43	11,82	4,95	79,24
8,55	12,14	79,31	4,08	19,04	72,20	14,72	2,87	77,40
9,04	13,11	77,85	3,75	21,22	70,10	15,36	3,47	75,83
9,55	14,13	76,32	3,55	23,26	67,90	16,18	4,06	74,00
10,06	15,14	74,80	2,47	26,32	65,85	17,74	3,99	72,38
<b>45 °C</b>								
8,98	13,02	78,00	3,25	22,91	69,36	14,80	3,82	76,44
9,54	14,11	76,35	2,63	25,25	67,20	16,26	3,98	74,33
9,98	15,02	75,00	2,44	26,38	65,22	17,34	3,23	72,76
10,53	16,10	73,37	2,00	28,05	63,44	19,02	2,95	70,76
11,04	17,12	71,84	1,77	30,40	61,93	20,37	4,01	69,05

Tabela 2: Frações mássicas (% m/m) para os sistemas formados por PEG 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de zinco e água, em diferentes temperaturas.

TOTAL			FASE SUPERIOR			FASE INFERIOR		
Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água	Sal	PEG	Água
<b>5 °C</b>								
10,30	13,18	76,52	4,06	21,85	70,34	17,17	3,67	75,21
10,76	15,25	73,99	3,20	26,16	67,48	19,15	4,09	73,37
11,30	17,48	71,22	1,68	30,55	64,56	22,36	3,53	70,64
11,81	19,61	68,58	1,51	33,72	61,34	24,01	4,22	68,00
12,30	21,76	65,94	1,59	35,78	59,41	25,37	4,95	66,12
<b>10 °C</b>								
9,55	11,50	78,96	5,39	20,20	72,75	14,09	3,46	80,17
10,06	13,97	75,97	3,66	24,00	67,98	17,62	2,09	77,42
10,59	16,49	72,92	2,41	30,18	64,78	19,71	1,34	76,57
11,07	18,97	69,95	1,80	32,36	61,59	22,59	0,46	71,80
11,58	21,44	66,98	1,19	35,55	58,59	24,68	4,55	69,50
<b>35 °C</b>								
11,24	21,24	67,52	1,31	38,21	56,92	23,26	0,00	72,69
11,75	21,82	66,43	1,08	40,73	53,95	24,85	0,00	71,45
12,26	22,33	65,41	0,95	44,81	51,52	25,51	0,00	69,92
12,77	22,82	64,42	0,89	37,23	52,09	26,73	0,00	67,36
13,26	23,32	63,41	0,63	45,80	48,57	28,15	0,00	67,85
<b>45 °C</b>								
14,57	21,64	63,79	0,41	41,38	50,60	26,79	0,57	67,18
15,09	22,71	62,20	0,37	44,67	47,65	27,67	0,82	65,83
15,56	23,81	60,63	0,28	45,44	45,34	28,95	0,96	64,47
16,09	24,89	59,02	0,19	47,43	45,41	29,93	3,73	61,27
16,57	25,98	57,45	0,15	55,16	36,97	32,23	0,00	62,93



Os diagramas de fases, Figuras de 1 a 4, apresentam a influência da temperatura sobre os sistemas estudados.

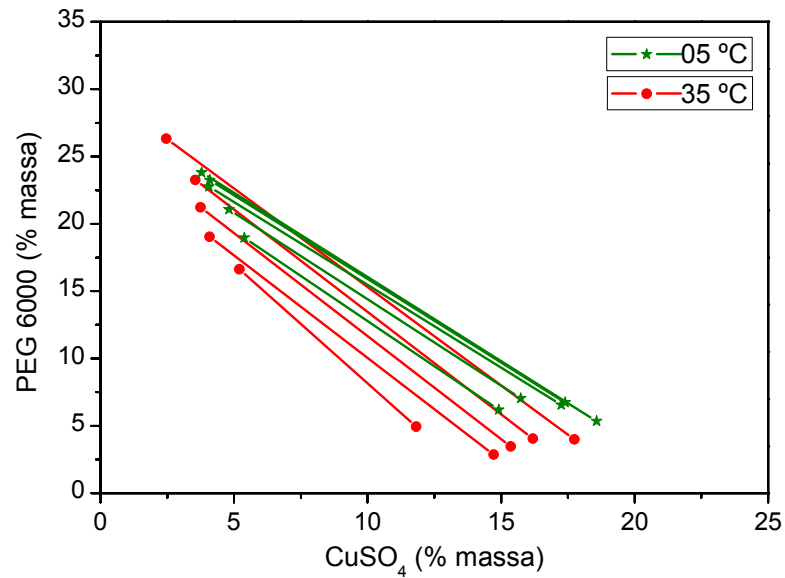


Figura 1: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre e água, nas temperaturas de 5 e 35 °C.

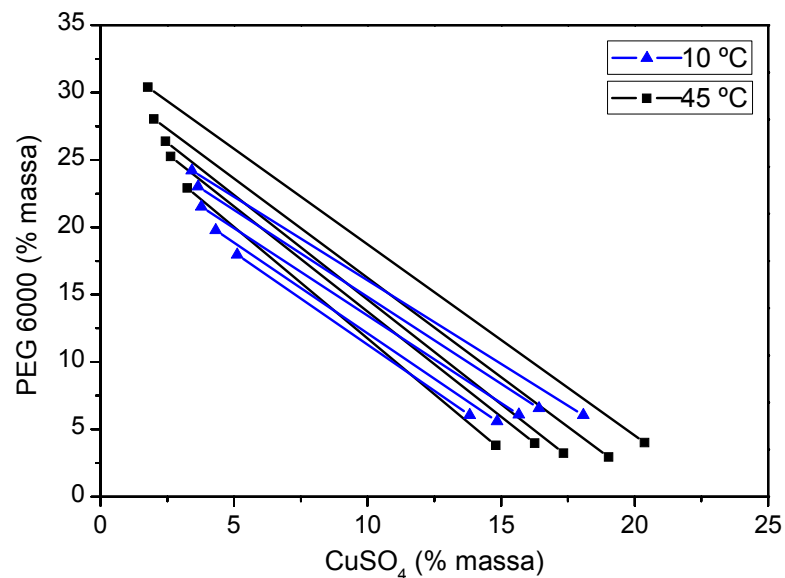


Figura 2: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de cobre e água, nas temperaturas de 10 e 45 °C.

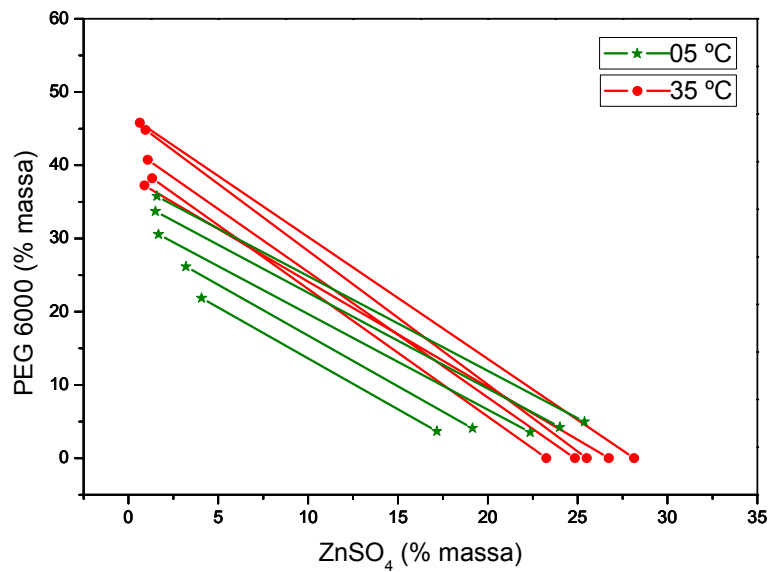


Figura 3: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de zinco e água, nas temperaturas de 5 e 35 °C.

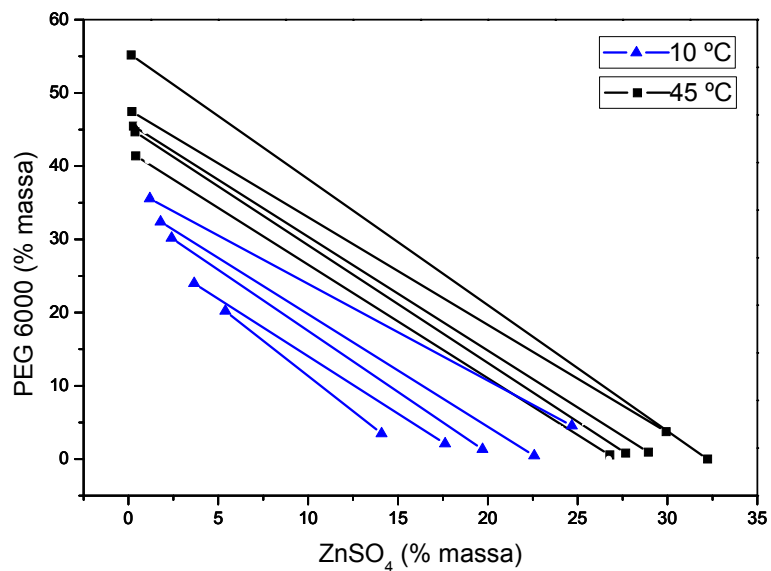


Figura 4: Dados de equilíbrio de fases para o sistema formado por poli (etileno glicol) 6000, sulfato de zinco e água, nas temperaturas de 10 e 45 °C.

Nos sistemas estudados, o aumento de temperatura provocou o aumento da região bifásica, caracterizando assim um processo de separação de fases endotérmico. Resultados semelhantes são encontrados na literatura para SAB's formados por PEG 6000 com citrato de potássio<sup>2</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><sup>5</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>5</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>7</sup> e NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>7</sup>.

Zafarani-Moattar e Gasemi<sup>7</sup>, que investigaram o efeito da temperatura nas curvas binodais, em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 6000 e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ou Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, verificaram também que a separação de fase ocorre com a absorção de energia.

Segundo da Silva e Loh<sup>15</sup>, com a mistura de soluções aquosas de sal e de polímero, ocorre uma interação específica Ion-Eo, induzida por um aumento da entropia do sistema. Devido a esta interação ser endotérmica, um aumento da temperatura desloca o equilíbrio do processo, em direção à formação do complexo sal-PEG, o que diminui a quantidade de sal necessária para a formação dos SAB's.

Na Figura 5 são mostradas, como exemplo, as linhas de amarração para os SAB's formados por PEG 6000, sulfato de cobre e água, em todas as temperaturas de trabalho (5, 10, 35 e 45) °C. Auxiliando a análise, as Tabelas de 3 a 6 trazem as inclinações e comprimentos das linhas de amarração, tanto para o sistema PEG 6000 + sulfato de cobre + água, quanto para o sistema PEG 6000 + sulfato de zinco + água.

O processo de separação de fase ocorre com a segregação do sal e do polímero. Um parâmetro que pode expressar esta segregação é a inclinação da linha de amarração (ILA). O valor da ILA pode ser calculado por:

$$ILA = \frac{[P^S] - [P^I]}{[S^S] - [S^I]} \quad (1)$$

sendo [P] e [S], as concentrações de polímero e sal, respectivamente. Os sobrescritos S e I representam a fase superior e a fase inferior, respectivamente<sup>14</sup>.

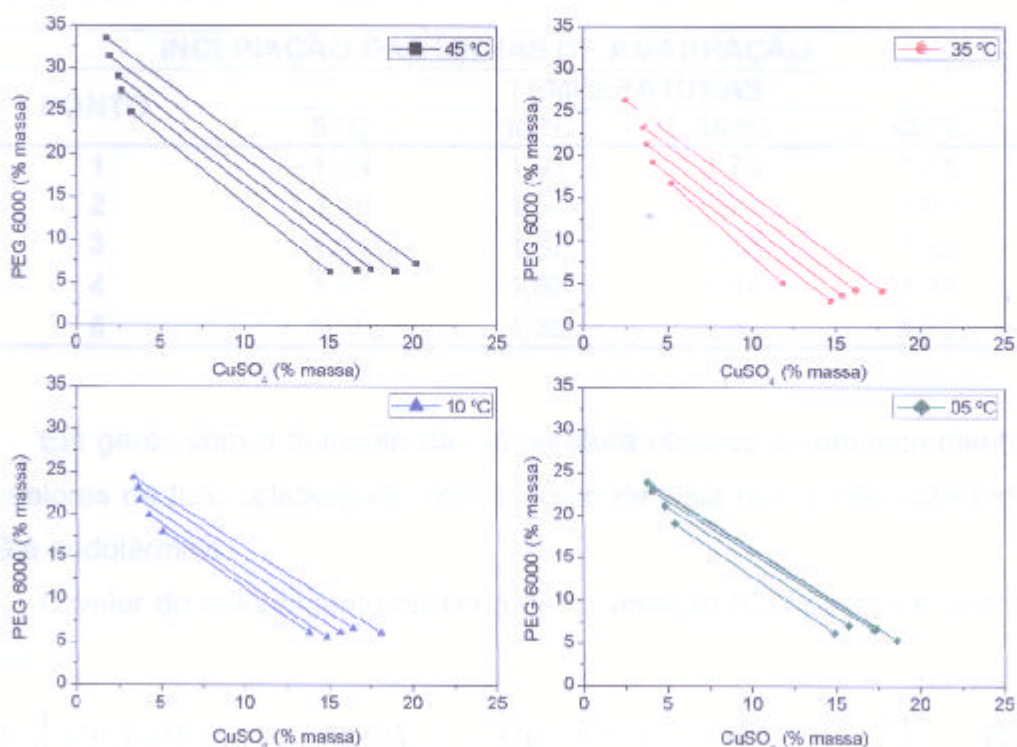


Figura 5: Linhas de amarração para o sistema formado por PEG 6000, sulfato de cobre e água.

Tabela 3: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 6000, sulfato de cobre e água.

INCLINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO				
PONTO	TEMPERATURAS			
	5 °C	10 °C	35 °C	45 °C
1	1,34	1,37	1,76	1,59
2	1,28	1,35	1,52	1,50
3	1,23	1,30	1,53	1,50
4	1,24	1,29	1,52	1,48
5	1,25	1,24	1,46	1,43

Tabela 4: Influência da temperatura sobre a inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema PEG 6000, sulfato de zinco e água.

PONTO	INCLINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO			
	TEMPERATURAS			
	5 °C	10 °C	35 °C	45 °C
1	1,39	1,93	1,74	1,55
2	1,38	1,57	1,71	1,61
3	1,31	1,67	1,83	1,55
4	1,31	1,53	1,44	1,47
5	1,30	1,32	1,67	1,72

Em geral, com o aumento da temperatura observa-se um incremento nos valores de ILA, colaborando com o ponto de vista que a interação Ion-PEG é endotérmica.

O valor do comprimento da linha de amarração (CLA) é obtido como segue:

$$CLA = \left\{ \left[ C(COMP_1)_{FS} - C(COMP_1)_{FI} \right]^2 + \left[ C(COMP_2)_{FS} - C(COMP_2)_{FI} \right]^2 \right\}^{0,5} \quad (2)$$

em que  $C(COMP_1)_{FS}$ ,  $C(COMP_1)_{FI}$ ,  $C(COMP_2)_{FS}$  e  $C(COMP_2)_{FI}$  são as concentrações (% m/m) dos componentes do SAB nas fases superior (FS) e inferior (FI), respectivamente. Com o aumento do CLA, aumenta a diferença entre a fase superior e a inferior, em termos de propriedades termodinâmicas intensivas<sup>3</sup>.

Tabela 5: Influência da temperatura sobre o comprimento das linhas de amarração (CLA) para o sistema PEG 6000, sulfato de cobre e água.

PONTO	COMPRIMENTO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO			
	TEMPERATURAS			
	5 °C	10 °C	35 °C	45 °C
1	15,94	14,73	13,42	22,13
2	17,76	17,67	19,36	25,29
3	20,89	19,49	21,21	27,08
4	21,20	20,84	22,99	30,29
5	23,65	23,33	27,06	32,13

Tabela 6: Influência da temperatura sobre o comprimento das linhas de amarração (CLA) para o sistema PEG 6000, sulfato de zinco e água.

COMPRIMENTO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO				
PONTO	TEMPERATURAS			
	5 °C	10 °C	35 °C	45 °C
1	22,42	18,87	44,06	48,60
2	27,24	25,98	47,16	51,66
3	34,02	33,64	51,10	52,92
4	37,11	38,08	45,32	52,87
5	38,94	38,90	53,43	63,81

Zafarani-Moattar e Gasemi<sup>7</sup>, verificaram que a inclinação e o comprimento das linhas de amarração aumentaram com o aumento da temperatura. Resultados similares foram obtidos por Voros e colaboradores<sup>16</sup>, Mishima e colaboradores<sup>17</sup>, e Zafarani-Moattar e Hamidi<sup>2</sup>, para outros SAB's contendo PEG e sal.

Nas Figuras de 6 a 9 são mostradas curvas binodais nas temperaturas investigadas, para cada um dos sais utilizados na formação dos SAB's.

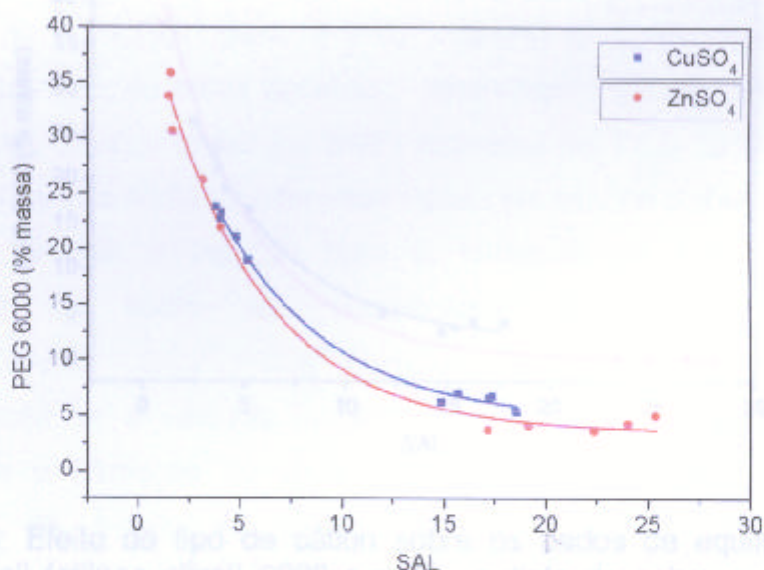


Figura 6: Efeito do tipo de cátion sobre os dados de equilíbrio para o sistema poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água a 5 °C.

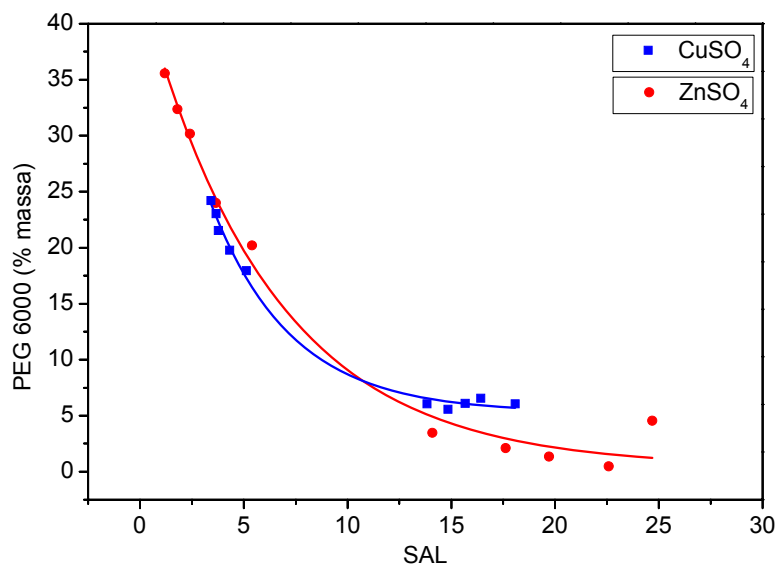


Figura 7: Efeito do tipo de cátion sobre os dados de equilíbrio para o sistema poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água a 10 °C.

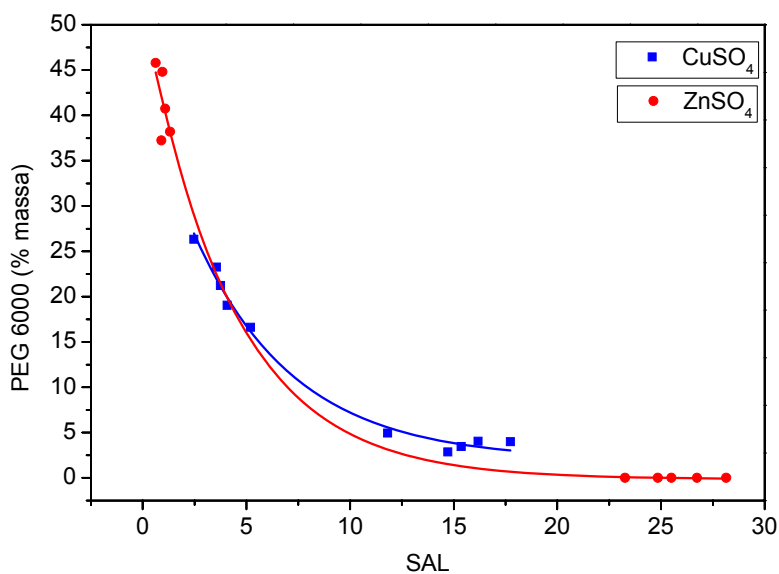


Figura 8: Efeito do tipo de cátion sobre os dados de equilíbrio para o sistema poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água a 35 °C.



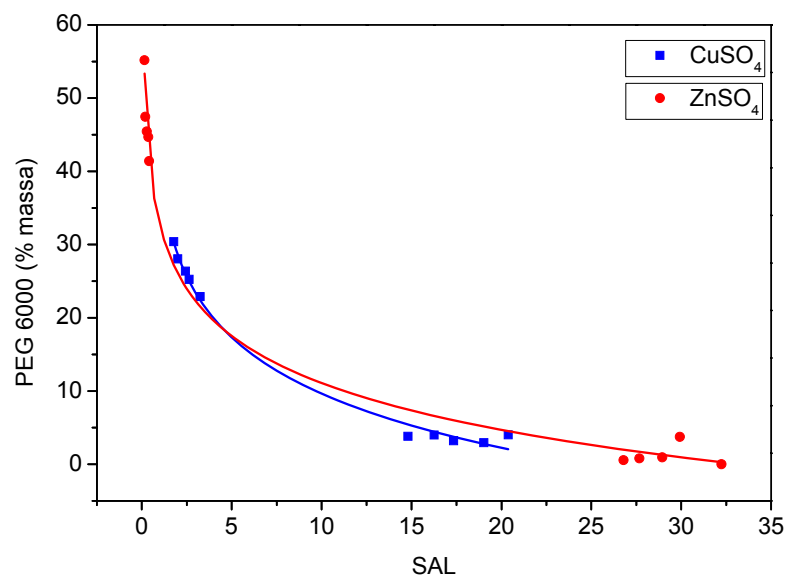


Figura 9: Efeito do tipo de cátion sobre os dados de equilíbrio para o sistema poli (etileno glicol) 6000 g.mol<sup>-1</sup>, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água a 45 °C.

Zafarani-Moattar e Sadeghi<sup>5</sup> estudaram SAB's contendo PEG 6000 e os sais NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, observando que o aumento da carga do ânion de -1 (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) para -3 (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) diminui a concentração de sal na qual a separação de fases acontece. Ananthapadmanabhan e Goddard<sup>13</sup> avaliaram as características dos SAB's formados por PEG 3350 e diferentes ânions em sais de sódio ou diferentes metais em sais de sulfato. Concluíram que, em relação à indução para a formação de SAB's, os ânions dos sais de sódio são classificados na ordem decrescente: PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>3-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> > C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup> > C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> > OH<sup>-</sup>. Deste modo, quanto maior for a valência do ânion, menor será a quantidade de sal necessária à formação do sistema aquoso bifásico. Quanto à tendência dos sais de sulfato de formarem SAB, a ordem decrescente é: Al<sup>3+</sup> > Na<sup>+</sup> > Mg<sup>2+</sup> > Fe<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Li<sup>+</sup>. Esses autores postularam que ânions com valências mais altas são melhores agentes formadores de SAB's do que ânions com valências menores, devido ao fato de que ânions de valências maiores necessitam de um número maior de moléculas de água



de solvatação do que os ânions de valências menores, diminuindo assim a quantidade de água disponível para solvatar o PEG. Considerando sais formados pelo mesmo cátion e ânions diferentes com a mesma valência ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{NaHSO}_4$ ) pôde ser verificado que a eficiência na formação de fases é aumentada de  $\text{NaHSO}_4$  para  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , devido a solubilidade do  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em água ser menor do que a do  $\text{NaHSO}_4$ .

Na intenção de avaliar o comportamento de diferentes cátions em SAB's formados por PEG 6000 e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Zafarani-Moattar e Gasemi<sup>7</sup> verificaram que o tamanho da região bifásica aumentava quando o tamanho do cátion diminuía. Os sais empregados compartilhavam o mesmo ânion e continham cátions monovalentes com raios iônicos de 0,137, 0,133 e 0,098 nm ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ , respectivamente).

Os sistemas estudados neste trabalho, apresentaram resultados condizentes com as considerações feitas acima. Os SAB's estudados compartilham o mesmo ânion ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e tem cátions com valências iguais ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ). Como esperado, para explicar a maior região bifásica para o sistema contendo o  $\text{Zn}^{2+}$ , o cátion do zinco tem um raio iônico menor. O íon cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ), em solução, forma um hexaaquocomplexo azul e seu raio iônico é de 0,087 nm. Já o íon do zinco,  $\text{Zn}^{2+}$ , em solução aquosa é um íon tetraaquo tetraédrico e seu raio iônico é de 0,074 nm<sup>18,19,20</sup>.

A habilidade de indução a formação de fases do sal pode ser relacionada com a energia livre de Gibbs de hidratação dos íons ( $\Delta_{\text{hid}}G$ )<sup>21</sup>. Considerando sais que compartilham o mesmo cátion ( $\text{Na}^+$ ), mas possuem diferentes ânions, pode ser verificado que a habilidade de indução de formação de fases dos ânions obedece à seguinte ordem:  $\text{HPO}_4^{-2} > \text{SO}_4^{-2} > \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4^{-2} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{OH}^- > \text{CHO}_2^-$ . Parece que o melhor efeito de indução para sistemas contendo PEG pode ser observado quando os íons do sal têm valor de  $\Delta_{\text{hid}}G$  mais negativo: ( $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $-1080 \text{ kJ.mol}^{-1} > \text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $-465 \text{ kJ.mol}^{-1} > \text{OH}^-$ ,  $-430 \text{ kJ.mol}^{-1} > \text{CHO}_2^-$ ,  $395 \text{ kJ.mol}^{-1}$ )<sup>8</sup>.

Os efeitos de indução de fases são aditivos e os cátions parecem seguir o mesmo comportamento descrito para os ânions. Quando são comparados sais contendo o mesmo ânion, aquele cujo cátion tem o valor

mais negativo de  $\Delta_{\text{hid}}G$  é o que tem o melhor efeito na indução de formação das fases para sistemas com PEG. Pode ser verificado que a capacidade indutora dos cátions observa a seguinte ordem:  $\text{Zn}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Na}^{+} > \text{NH}_4^{+}$ . Essa ordem segue diretamente a descrita para os valores de  $\Delta_{\text{hid}}G$ :  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $-1955 \text{ kJ.mol}^{-1} < \text{Mg}^{+2}$ ,  $-1830 \text{ kJ.mol}^{-1} < \text{Na}^{+}$ ,  $-365 \text{ kJ.mol}^{-1} < \text{NH}_4^{+}$ ,  $-285 \text{ kJ.mol}^{-1}$  <sup>8</sup>. Os dados relacionados acima, são citados por Marcus<sup>22</sup>, como valores experimentais de  $\Delta_{\text{hid}}G$ .

O  $\Delta_{\text{hid}}G$  para o  $\text{Cu}^{2+}$  é de  $-2010 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , que é um valor muito próximo ao  $\Delta_{\text{hid}}G$  do  $\text{Zn}^{+2}$  ( $-1955 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), indicando que a pequena variação na indução da formação de fases, observada nos resultados obtidos neste trabalho, tem sua origem em outras propriedades destes cátions.

#### 4 – CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi analisada a influência da temperatura e do tipo de sal nos dados de equilíbrio de sistemas formados por PEG 6000 + sulfato de cobre + água e PEG 6000 + sulfato de zinco + água, nas temperaturas de (5, 10, 35 e 45) °C.

Observou-se, de forma geral, o aumento da região bifásica com o aumento da temperatura.

Houve também um aumento na diferença entre as propriedades intensivas do sistema com a variação da temperatura, o que pode ser observado pelos dados de comprimento da linha de amarração.

Quanto ao efeito do tipo de sal, os SAB's estudados compartilham o mesmo ânion ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), tem cátions com valências iguais ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) e com valores de  $\Delta_{\text{hid}}G$  de,  $-2010 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e  $-1955 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ( $\text{Zn}^{2+}$ ). A maior capacidade de indução de fases foi observada para o sistema formado por  $\text{Zn}^{2+}$ . Seu  $\Delta_{\text{hid}}G$  é muito próximo ao do  $\text{Cu}^{2+}$  (embora um pouco menos negativo) o que indica que outros fatores, como menor raio iônico e a maior solubilidade em água do  $\text{ZnSO}_4$ , parecem contribuir de forma mais efetiva para o resultado encontrado.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) 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 aquosos bifásicos do tipo PEG/sal*. Campinas, SP: UNICAMP, **2003**. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, **2003**.
- (2) Zafarani-Moattar, M. T.; Hamidi, A. A.. *Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Poly(ethylene glycol)-Potassium Citrate System*. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 48, p. 262-265, **2003**.
- (3) da Silva, L. H. M.; Loh, W;. *Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas*. Química Nova, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, **2006**.
- (4) da Silva, M. C. H.; Da Silva, L. H. M.; Paggioli, F. J.; Coimbra, J. S. R. e Minim, L. A.. *Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons*. Química Nova, v. 29, n. 6, p. 1332-1339, **2006**.
- (5) 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**.
- (6) 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**.
- (7) 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**.

- (8) Zafarani-Moattar, M. T.; Hamzehzadeh, S.. *Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium formate*. Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry, v. 29, p. 1-6, **2005**.
- (9) Willauer, H. D.; Huddleston, J. G.; Rogers, R. D.. *Solute Partitioning in Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol and Salt: The Partitioning of Small Neutral Organic Species*. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 41, p. 1892-1904, **2002**.
- (10) Willauer, H. D.; Huddleston, J. G.; Rogers, R. D.. *Solvent Properties of Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol and Salt Characterized by the Free Energy of Transfer of a Methylene Group between the Phases and by a Linear Solvation Energy Relationship*. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 41, p. 2591-2601, **2002**.
- (11) Huddleston, J. G.; Willauer, H. D.; Rogers, R. D.. *Phase Diagram Data for Several PEG + Salt Aqueous Biphasic Systems at 25 °C*. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 48, n. 5, p. 1230-1236, **2003**.
- (12) Hey, M. J.; Jackson, D. P.; Yan, H.. *The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly(ethylene glycol)* *Polymer*, v. 46, p. 2567-2572, **2005**.
- (13) Ananthapadmanabhan, K. P.; Goddard, E. D.. *Aqueous Biphasic Formation in Polyethylene Oxide-Inorganic Salt Systems*. Langmuir, v. 3, p. 25-31, **1987**.
- (14) Carvalho, C. de P.; *Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por poli (etileno glicol), sais e água*. Viçosa, MG: UFV, **2004**. 70 f. Dissertação (Mestrado – Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. **2004**.

- (15) Da Silva, L. H. M; Loh, W. *Calorimetric investigation of the formation of aqueous twophase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran)*. Journal Physical Chememistry B, v. 104, p. 10069-10073, **2000**.
- (16) 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, n. 2, p. 333-353, **1993**.
- (17) Mishima, K.; Nakatani, N.; Nomiyama, T.; Matsuyama, K.; Nagatami, M.; Nishikawa, H.. *Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and dipotassium hydrogenphosphate*. Fluid Phase Equilibria, v. 107, n. 2, p. 269-276, **1995**.
- (18) Vogel, A. I.; *Química Analítica Qualitativa*, 5 ed. São Paulo, SP. Editora Mestre Jou, **1981**. 665 p.
- (19) Russel, J. B.; *Química Geral*, São Paulo, Editora McGraw-Hill do Brasil, **1981**. 897 p.
- (20) Barros, H. L. C., *Química inorgânica; uma introdução*, Belo Horizonte, MG, Editora UFMG, **1992**, 518p.
- (21) Roger, R. D.; Bond, A. H.; Bauner, C. B.; Zhang, J.; Griffin, S. T. J.. *Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 680, n. 1-2, p. 221-229, **1996**.
- (22) Marcus, Y. J.. *Thermodynamics of Solvation of Ions*. Journal of the Chemical Society Faraday Transactions. v. 87, n. 18, p. 2995-2999, **1991**.