

ANDRÉS FELIPE CHAMORRO RENGIFO

**DETERMINAÇÃO DAS FORÇAS MOTRIZES DE FORMAÇÃO E
PARTIÇÃO EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
MACROMOLÉCULA + SAL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C448d Chamorro Rengifo, Andrés Felipe, 1989-
2015 Determinação das forças motrizes de formação e partição
em sistemas aquosos bifásicos macromolécula + sal / Andrés
Felipe Chamorro Rengifo. – Viçosa, MG, 2015.
ix, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Sistemas aquosos bifásicos. 2. Separação (Tecnologia).
3. Extração (Química). 4. Purificação. 5. Enzimas. 6. Proteínas.
7. Quimosina. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Química. Programa de Pós-graduação em Agroquímica.
II. Título.

CDD 22. ed. 547

ANDRÉS FELIPE CHAMORRO RENGIFO

**DETERMINAÇÃO DAS FORÇAS MOTRIZES DE FORMAÇÃO E
PARTIÇÃO EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
MACROMOLÉCULA + SAL**

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

APROVADA: 20 de Julho de 2015

Prof.^a Ana Clarissa dos Santos Pires

Prof. Gustavo Costa Bressan

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Orientador)

Dedico à
Juliana Chamorro Rengifo e
Carlos Henrique Oliveira Silva.
Obrigado por tudo

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos;

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

Aos professores Luis Henrique Mendes da Silva e Maria do Carmo Hespanhol da Silva pela orientação, discussões teóricas e apoio;

À professora Ana Clarissa dos Santos Pires e ao professor Gustavo Costa Bressan pela participação na banca e suas sugestões.

Ao Guilherme Max e ao Gabriel Max pelo aporte experimental, conceitual e ortográfico nos três capítulos deste documento.

Aos integrantes do Grupo QUIVECOM e família pelo apoio.

RESUMO

CHAMORRO RENGIFO, Andrés Felipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2015. **Determinação das forças motrizes de formação e partição em sistemas aquosos bifásicos macromolécula + sal.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Siva. Coorientadora: Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Sistemas aquosos bifásicos (SABs) são reconhecidos como eficientes na extração e purificação de diferentes compostos. Entretanto, as forças motrizes que dirigem a distribuição de diferentes solutos nos SABs ainda são pouco estabelecidas, principalmente porque existem poucos trabalhos focados em estudar os parâmetros termodinâmicos de partição de diferentes solutos. Isso impede a obtenção de conhecimentos científicos necessários para a modulação das propriedades físico-químicas dos SABs afim de otimizar sua aplicação para a extração e purificação. Para abordar esta problemática, foram formados novos SABs com sais orgânicos (citrato de sódio, tartarato de sódio e succinato de sódio) ambientalmente seguros e poli(óxido de etileno), PEO, com massa molares 10000 e/ou 35000 g mol⁻¹ nas temperaturas de 283,15, 298,15 e 313,15 K (capítulo 2). Além disso, um conjunto de SABs reportados na literatura e obtidos neste trabalho foi utilizado para avaliar o comportamento de partição da enzima quimosina (capítulo 3), avaliando a variação da energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{tr}G^o$), a variação da entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H_{Cal}^o$) e a variação da entropia de transferência ($\Delta_{tr}S_{Cal}^o$). Os resultados do segundo capítulo mostram que o processo de segregação de fase para todos os SABs obtidos foi endotérmico e entropicamente dirigido. A região bifásica do diagrama de fases aumentou na ordem citrato > tartarato > succinato, tornando-se maior com o incremento da massa molar do PEO. No capítulo 3 foi descoberto que a transferência da quimosina da fase inferior para a fase superior dos SABs avaliados

foi entalpicamente dirigida com $-4,84 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{\text{tr}}H_{\text{Cal}}^{\circ} < -170,34 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $-11,69 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1} < \Delta_{\text{tr}}S_{\text{Cal}}^{\circ} < -558,95 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$. A transferência da quimossina é um processo entálpica-entropicamente compensado com valores do potencial termodinâmico de partição compreendidos entre, $-1,36 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{\text{tr}}G^{\circ} < -3,77 \text{ kJ mol}^{-1}$. Também foi observado que o processo de partição da enzima é dependente da linha de amarração, natureza do cátion e do ânion, balanço hidrofóbico/hidrofílico e a massa molar da macromolécula.

ABSTRACT

CHAMORRO RENGIFO, Andrés Felipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2015. **Determination of the driven forces in the formation and partition in macromolecule + salt aqueous two-phase systems.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Siva. Co-Adviser: Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Aqueous two-phase systems (ATPSs) are recognized as efficient for the extraction and purification of different compounds. However, the driving power that governs the distribution of different solutes in ATPSs are few understood, mainly because there are few researches focused on the study of the partition thermodynamic of different solutes in these systems. This makes difficult to obtain the scientific knowledge necessary to the physico-chemistry properties modulation of ATPSs for optimization of their application for extraction and purification of solutes. In this sense, new ATPSs formed by organic salts (sodium citrate, sodium tartrate and sodium succinate) environmentally safe and poly (ethylene oxide), PEO, with molar mass 10,000 or 35,000 g mol⁻¹ at 283.15, 298.15 and 313.15 K were formed (chapter 2). In addition, several ATPSs reported in the literature and obtained here were used to evaluate the behavior of enzyme chymosin (chapter 3). The transfer free energy change ($\Delta_{tr}G^o$), transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H_{Cal}^o$) and transfer entropy change ($\Delta_{tr}S_{Cal}^o$) were obtained. The second chapter results showed that the segregation process of phase for all ATPSs obtained was endothermic and entropically driven. The biphasic region on the phase diagrams increased in the following order: citrate > tartrate > succinate and increased as PEO molar mass increased. In the chapter 3, it was discovered that chymosin transfer from the bottom to top phase in the ATPS studies was enthalpically driven with $-4.84 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{tr}H_{Cal}^o < -170.34 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $-11.69 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1} < \Delta_{tr}S_{Cal}^o < -558.95 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$. The chymosin transfer process is enthalpy-entropy

compensate with the partition thermodynamic potential values, between $-1.36 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{tr}G^o < -3.77 \text{ kJ}$. It was also observed that the enzyme partition process depend of tie line, the cation/anion nature, hydrophobic/hydrophilic balance and macromolecule molar mass.

SUMARIO

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 <i>Quimosina</i>	2
2.1.1 Métodos de extração e obtenção de quimosina.....	4
2.2 <i>Sistemas aquosos bifásicos: Histórico e conceitos</i>	6
2.2.1 Diagrama de fases e características dos SABs	8
2.2.2 Extração de biosolutos com SABs.	10
2.3 <i>Termodinâmica de partição de solutos em SABs (ITC)</i>	17
2.4 <i>Determinação da entalpia de diluição de solutos ($\Delta_{dil}H$)</i>	23
2.5 <i>Modelo de Johansson (contribuição entálpica e entrópica para o valor K)</i> 24	
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO 1.....	28
4. REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2: PHASE DIAGRAMS, DENSITIES AND REFRACTIVE INDEXES OF POLY(OXIDE ETHYLENE) + ORGANIC SALTS + WATER AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS: EFFECT OF TEMPERATURE, ANION AND MOLAR MASS.....	32
ABSTRACT	32
1. INTRODUCTION	33
2. MATERIALS AND METHODS	34
2.1 <i>Materials</i>	34
2.2 <i>Preparation of ATPS</i>	34
2.3 <i>Construction of phase diagrams</i>	35
2.4 <i>Density and Refractive Index Measurements</i>	36
3. RESULTS AND DISCUSSION	36
4. CONCLUSION	50
5. REFERENCES.....	51
CAPÍTULO 3: DRIVING FORCES FOR CHYMOSIN PARTITIONING ON THE MACROMOLECULE-SALT AQUEOUS TWO PHASE SYSTEM.....	55
ABSTRACT	55
1. INTRODUCTION	56
2. EXPERIMENTAL SECTION	59
2.1 <i>Materials</i>	59
2.2 <i>Determination of chymosin partition coefficient</i>	59
2.3 <i>Thermodynamic parameters of chymosin transfer</i>	60
2.3.1 Chymosin transfer Gibbs free energy change ($\Delta_{tr}G^{\circ}$)	60
2.3.2 Chymosin transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H_{Cal}^{\circ}$)	61
2.3.3 Chymosin transfer entropy change ($\Delta_{tr}S_{Cal}^{\circ}$).....	62

2.4	<i>Dilution enthalpy change for the infinite dilution condition</i>	62
3.	RESULTS AND DISCUSSION	63
3.1	<i>Chymosin partition behavior</i>	63
3.2	<i>Cation effect on chymosin partition behavior</i>	69
3.3	<i>Anion effect on the chymosin partition behavior</i>	73
3.4	<i>Polymer hydrophobicity effect on the chymosin partition behavior</i>	77
3.5	<i>Polymer size effect on chymosin partition behavior</i>	80
4.	CONCLUSIONS.....	83
5.	REFERENCES	84
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

CAPÍTULO 1.

1. Introdução

Enzimas são substâncias orgânicas de natureza proteica produzida pelos organismos vivos. Tais substâncias têm a capacidade de diminuir a energia de ativação em diferentes reações químicas, atuando como catalisadores em importantes processos industriais como, por exemplo, na indústria de produtos lácteos.

A quimosina é uma enzima com ação catalítica sobre *k*-caseína o que a torna amplamente utilizada na indústria de produtos lácteos para a fabricação do queijo. Ela é extraída dos abomasos de ruminantes, existindo diferentes metodologias para sua obtenção. Entretanto todas essas metodologias são caracterizadas por apresentar múltiplas etapas (extração, separação e purificação), bem como tempos longos no processo de produção e alto custo. Os longos tempos associados ao processo têm como consequência a diminuição da atividade biológica da enzima e em alguns casos a sua desnaturação. Nesse sentido, torna-se necessário desenvolver novas metodologias com alta efetividade, reprodutibilidade, baixo custo e baixo impacto ambiental, substituindo as metodologias tradicionais.

Uma alternativa para extração e purificação de quimosina são os sistemas aquosos bifásicos (SABs). Os SABs provaram-se ser eficientes na purificação e extração de solutos biológicos (células, enzimas, vírus, proteínas, etc.). Estes sistemas são formados por compostos não inflamáveis e possuem facilidade de aplicação em grande escala industrial. Mas, para poder propor uma nova metodologia de extração utilizando SABs, é importante estudar e compreender como acontece a distribuição da quimosina nestes sistemas e que interações intermoleculares estão presentes durante seu processo de transferência. Isto significa analisar o

comportamento dos parâmetros termodinâmicos de transferência (variação de energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{tr}G$), variação de entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H$) e variação de entropia de transferência ($\Delta_{tr}S$)) como uma função das propriedades termodinâmicas do sistema. São poucas as pesquisas reportadas na literatura que determinam os parâmetros termodinâmicos de transferência da quimosina em SABs, sendo que estes parâmetros tem sido determinados por medidas indiretas e utilizando aproximações, como a aproximação de van't Hoff.

Este trabalho pretende abordar esta problemática por meio da obtenção de novos SABs com poli óxido de etileno (PEO) de massa molar 10000 e 35000 e com sais orgânicos (citrato de sódio, tartarato de sódio e succinato de sódio), avaliando o efeito da temperatura, do ânion e da massa molar do polímero sobre a composição química das espécies em cada fase. Posteriormente aplicá-los, juntamente com SABs já reportados na literatura, na partição da quimosina, avaliando o efeito do cátion, do ânion, pH e da massa molar do polímero sobre o processo de transferência desta enzima. Por fim, a partir dos dados de equilíbrio de partição e utilizando a calorimetria de titulação isotérmica pretende-se determinar os parâmetros termodinâmicos de transferência ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$) com o objetivo de conhecer as forças motrizes que dirigem o processo de partição e compreender as interações moleculares envolvidas no processo de transferência desta proteína.

2. Revisão de literatura

2.1 Quimosina

A quimosina (Figura 1, renina, EC 3.4.23.4) é uma protease aspártica estável em solução aquosa importante na fabricação de produtos lácteos, especialmente

queijo¹. Esta proteína apresenta uma estrutura globular contendo 323 resíduos de aminoácido e massa molecular de 36.000 g mol⁻¹. Sua estrutura secundária é 13% helicoidal (9 hélices e 44 resíduos) e 48 % de β -folhas (29 filamentos e 158 resíduos)². Seu ponto isoelétrico é de 4,6 e apresenta maior estabilidade em valores de pH entre 5 e 6,5. Em valores de pH maiores do que 7 ela perde rapidamente sua estabilidade e diminui sua atividade enzimática³.

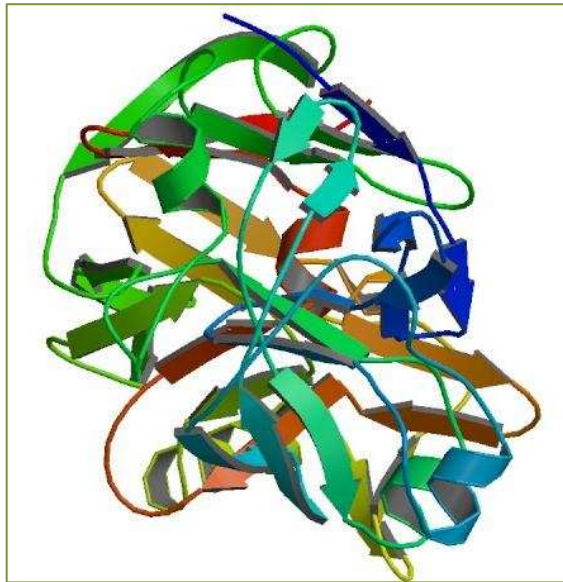


Figura 1. Estrutura da quimosina determinada por raios-x com resolução de 2.3 Å.

A quimosina tem a capacidade de quebrar a ligação phe 105 – Met 106 da *k*-caseína, sendo esta uma fosfoproteína presente na leite. No início da reação, a quimosina provoca a separação do enlace peptídico (processo de *k*-caseínas do leite)⁴, obtendo como produto duas cadeias carbônicas da *k*-caseína: uma insolúvel em solução (N terminal da *k*-caseína) formando agregados em solução, e a porção C terminal da fosfoproteína é uma caseína-glicopeptídeo solúvel em solução e é liberada no soro⁵. Esta reação enzimática é utilizada para coagular a leite no processo

da fabricação do queijo, por esse motivo a quimosina é uma enzima de interesse industrial.

No Brasil, a produção de queijo aumenta a cada ano. De acordo com ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo) o consumo de queijo subiu em 67,35 % de 2006 até 2014. Considerando estas estatísticas e o fato de que a quimosina é utilizada no processo de fabricação do queijo de coagulação enzimática, é necessário elevar sua produção. Para cumprir estes objetivos são necessárias novas metodologias de extração, que sejam eficientes, econômicas e ambientalmente responsáveis. Uma revisão das metodologias utilizadas recentemente é feita a seguir.

2.1.1 Métodos de extração e obtenção de quimosina

O processo de produção de queijo é altamente dependente da pureza da quimosina e de sua atividade enzimática (conformação estrutural): quanto maior a pureza da enzima, maior será a eficiência da ação enzimática sobre as ligações peptídicas da *k*-caseína⁶. Nesse sentido, é importante utilizar metodologias que preservem a estrutura molecular da enzima associados a um alto rendimento de extração e com pureza elevada. Na literatura, encontram-se vários métodos para extração e purificação de quimosina os quais podem ser divididos em dois grupos: i) com base na clonagem do gen da quimosina e sua posterior expressão numa bactéria e ii) na extração dos abomasos de bezerros lactentes, cerdos, cordeiros, búfalos⁷.

O método de clonagem do gem atualmente é muito utilizado, e bactérias tais como *Aspergillus oryzae* e *Mucor pussillus* são comumente utilizadas para expressar o gem da quimosina. Já os métodos de extração do abomasos apresentam normalmente 3 etapas: extração, separação e purificação⁸. Na etapa de extração, o abomaso é deixado em uma solução extratante por vários dias, como descrito na

metodologia utilizada por Houen e *et al.*⁹, que utilizaram água fria como solução extratora (5 mg/g de tecido). Outros trabalhos reportam a utilização de uma solução de NaCl com pH 5 com o objetivo de incrementar a porcentagem de extração. O inconveniente destes processos é o tempo de duração que pode chegar a aproximadamente 40 dias¹⁰.

Posteriormente à etapa de extração, a quimosina é separada por filtração ou mais comumente centrifugação (12000g durante 15 minutos e 5°C)⁹. Embora o segundo procedimento seja o mais efetivo, é também o mais caro pois necessita do uso de uma centrífuga com controle de temperatura, fazendo com que a filtração seja um procedimento mais viável.

Por último, o processo de purificação é o mais caro e que exige maior cuidado porque é onde pode ocorrer a maior perda da atividade biológica da enzima. Nesta etapa podem se utilizar procedimentos de precipitação com sulfato de alumínio e hidrogênio fosfato de sódio com posterior separação por diálise, cromatografia (cromatografia iônica e cromatografia de coluna) ou eletroforese⁹⁻¹¹.

Nas técnicas de separação e purificação utilizadas na última etapa, podem ser utilizados diferentes eluentes, como corantes¹² e solventes hidrofóbicos¹³, além de soluções contendo compostos inorgânicos como fosfato de sódio, acetato de amônio em pH 5,3, ácido clorídrico 10 mM e tampão acetato de sódio pH 5,6⁹.

Referente ao que foi discutido, as metodologias utilizadas tradicionalmente envolvem altos custos, diminuem a atividade enzimática da quimosina, além de terem uma eluição lenta na corrida cromatográfica, fazendo com elas não sejam adequadas para a purificação em grande escala^{11,14}.

Uma alternativa para substituir os procedimentos de filtração e separação nas metodologias tradicionais são os SABs. Estes são catalogados por RajniHatti-Kaul¹⁵

como sistemas com alta eficiência e de baixo custo para a extração e purificação de solutos biológicos.

2.2 Sistemas aquosos bifásicos: Histórico e conceitos

Os SABs consistem em duas fases imiscíveis formadas pela mistura de diferentes combinações: polímero-polímero, polímero-sal ou sal-sal, sob determinadas condições específicas de concentração dos componentes formadores, pressão e temperatura¹⁶. Estes sistemas utilizam compostos não inflamáveis e não voláteis, o que diminui o risco de acidentes de trabalho. Além disso, contém como componente principal água (60-90 %) reduzindo o impacto ambiental em comparação às metodologias utilizadas para a extração de quimosina¹⁷.

Os SABs foram primeiramente reportados por Beijerinck em 1896, que observou que a mistura de soluções aquosas de ágar e gelatina ou amido e gelatina em uma faixa de temperatura e concentrações específicas levava à formação de uma mistura turva que, após passar por um processo de segregação alcançava o equilíbrio termodinâmico com a coexistência de duas fases^{18,19}.

Posteriormente, Ostwald e Hertel, misturando soluções aquosas de diferentes amidos (com diferentes porcentagens de amilose e amilopectina) demonstraram que diferenças estruturais das espécies químicas misturadas possuem influência sobre as composições das fases no equilíbrio termodinâmico, porque mudam as interações intermoleculares entre os componentes do sistema^{20,21}. A partir destes descobrimentos, os trabalhos de pesquisa têm buscado novos sistemas aquosos e buscado determinar suas propriedades termodinâmicas. Por exemplo, Ryden e Albertsson em 1971, determinaram a tensão interfacial de sistemas formados com diferentes composições de poli(óxido de etileno) (PEO) e dextrana a fim de

encontrar sistemas com baixos valores desta propriedade os quais permitiriam a transferência de solutos biológicos de uma fase para outra sem alterar sua estrutura molecular como se verifica nos sistemas clássicos óleo/água¹⁷. Os autores encontraram que existe relação entre a concentração dos componentes em cada fase e a tensão interfacial entre as duas fases e verificaram que os SABs apresentam menores valores de tensão interfacial que os sistemas clássicos, sendo uma boa ferramenta para a partição destes solutos²².

Baseado no que foi exposto anteriormente, as propriedades termodinâmicas de um SAB dependem das interações intermoleculares presentes entre os componentes em solução e das variações entrópicas resultantes do processo de mistura. Esse balanço pode ser representado em termos do parâmetro energia livre de Gibbs de mistura ($\Delta_{\text{mix}}\mathbf{G}$) o qual expressa a diferença entre a energia livre de Gibbs da solução \mathbf{G}_{Sol} e o somatório da energia livre de Gibbs de cada componente puro \mathbf{G}_i^* (equação 1).

$$\Delta_{\text{mix}}\mathbf{G} = G_{\text{Sol}} - \sum_{i=1}^3 G_i^* = \sum_{i=1}^3 n_i \mu_i - \sum_{i=1}^3 n_i \mu_i^* = \sum_{i=1}^3 n_i (\mu_i - \mu_i^*) \quad (1)$$

em que μ_i e μ_i^* , são os potenciais químicos do componente i na solução e puro, respectivamente, e n_i é o número de mols do componente i .

Termodinamicamente, quando valores de ($\Delta_{\text{mix}}\mathbf{G} < 0$) são obtidos, um sistema homogêneo é formado. Caso contrário, o sistema se separará em duas ou mais fases, que posteriormente procurarão alcançar um estado de interações e configurações que leve à menor energia livre de Gibbs para o sistema (alcançar o equilíbrio termodinâmico)¹⁷.

Uma maneira de avaliar as condições termodinâmicas que levam a formação de SABs é através de seu diagrama de fases, como discutido a seguir.

2.2.1 Diagrama de fases e características dos SABs

As composições químicas de cada componente em um SAB são normalmente representadas por diagramas de fases de coordenadas retangulares (figura 2). Nestes diagramas é possível visualizar as faixas de concentrações onde ocorre a formação de um sistema bifásico ou de um sistema monofásico.

Normalmente nos diagramas retangulares, os eixos da abscissa e ordenada contém as composições de eletrólito e polímero em % (m/m), respectivamente, e cinco características e/ou parâmetros importantes podem ser destacados; a curva binodal (CB), a composição global (CG), a linha de amarração (LA), a composição da fase superior (FS) e a composição da fase inferior (FI).

A CB é a curva que separa a região monofásica da região bifásica; sua posição no diagrama depende dos componentes formadores do sistema (massa molar do polímero, eletrólito formador, etc) e das propriedades termodinâmicas do sistema (temperatura, pressão, pH, etc). As LA's são as linhas do digrama que unem as composições das fases que permanecem em equilíbrio termodinâmico.

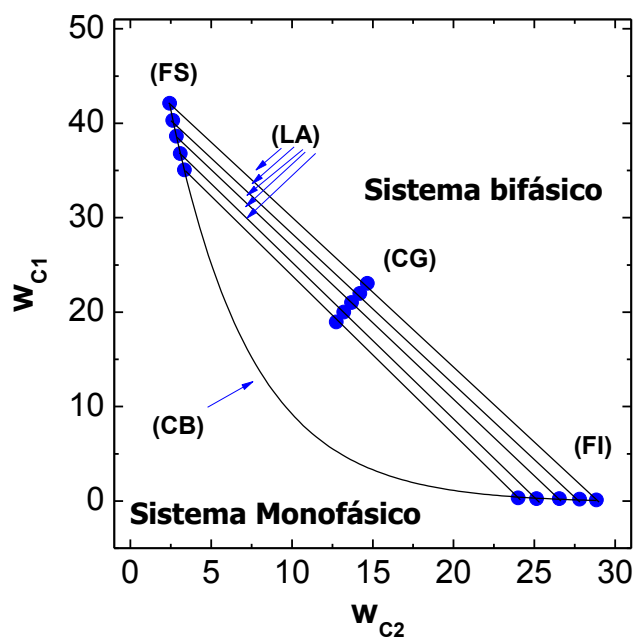


Figura 2. Diagrama de fase em coordenadas retangulares de um SAB. FS; Fase superior, FI; Fase inferior, CB; curva binodal, CG; composição global, LA; linhas de amarração.

O comprimento da linha de amarração (CLA) pode ser obtido a partir da equação 2.

$$CLA = \left[(C_P^S - C_P^I)^2 + (C_S^S - C_S^I)^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

Na equação 2, C_P^S e C_P^I são as concentrações de polímero em % (m/m) na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto C_S^S e C_S^I são as concentrações de sal em % (m/m) na fase superior e inferior, respectivamente²³. O CLA é um parâmetro muito importante porque permite comparar a capacidade de extração ou de partição de dois ou mais sistemas que apresentam o mesmo valor de CLA.

Quando se percorre no diagrama sobre uma mesma LA, todos os pontos sobre essa linha apresentam fases superior e inferior com mesmas propriedades termodinâmicas intensivas (composição, densidade, etc), no entanto contém diferentes

propriedades termodinâmicas extensivas (volumem, massa, etc). Por outro lado, quanto maior é o CLA, maior é a diferença das propriedades termodinâmicas intensivas das fases que coexistem em equilíbrio^{24,25}.

Apesar destas diferenças, os SABs apresentam baixos valores de tensão interfacial comparado aos sistemas clássicos (solventes orgânicos)/água. Esta característica facilita a transferência de um soluto biológico de uma fase para outra. A seguir uma breve revisão da aplicação dos SABs na extração de solutos biológicos.

2.2.2 Extração de biosolutos com SABs.

As vantagens dos SABs para purificação/extração de solutos biológicos foram utilizadas primeiramente em 1950 por Per-Åke Albertsson *et al.* para purificar e extrair solutos biológicos de interesse industrial, especialmente proteínas e células.

A distribuição e a capacidade de extração ou de purificação dos solutos em um SAB é normalmente expresso em termos de dois parâmetros principais: o coeficiente de partição e porcentagem de extração.

O coeficiente de partição é um parâmetro físico-químico que determina a distribuição do soluto nas duas fases, e é representado pela equação 3.

$$K_p = \frac{a_{FS}}{a_{FI}} \cong \frac{C_{FS}}{C_{FI}} \quad (3)$$

em que a e C fazem referência à atividade e à concentração do soluto nas fases. Os subscritos FS e FI representam a fase superior e inferior respectivamente.²⁶ A aproximação na equação anterior só pode ser utilizada em um regime de diluição infinita do soluto no sistema, pois é quando os valores de concentração e atividade

são muito próximos ¹⁷.

O mecanismo que governa a distribuição de um soluto entre as fases de um SAB é muito dependente das propriedades termodinâmicas do sistema e pode ser afetado por diversas variáveis. No entanto, Asenjo e Andrews ²⁷, publicaram quatro prováveis causas da partição:

- i. Diferença de hidrofobicidade: quando uma fase apresenta uma maior hidrofobicidade do que a outra e é usada para levar um soluto biológico hidrofóbico para essa fase.
- ii. Eletroquímica: Ocorre devido ao isolamento do soluto com carga elétrica definida em uma fase. Isto pode acontecer se existe uma ampla diferença de potencial elétrico entre fases.
- iii. Tamanho do soluto: Ocorre um processo de exclusão molecular do soluto de uma fase por seu tamanho.
- iv. Interações específicas: quando existem interações específicas entre o soluto e um componente presente majoritariamente em uma das fases.

Em um estudo de partição de um soluto em SABs é importante determinar qual das causas anteriores predomina em sua partição. Conhecer o mecanismo de partição do soluto nestes sistemas facilita desenvolver metodologias para aplicar SABs na extração e purificação em escala do laboratório ou escala industrial ²⁸.

Outro parâmetro utilizado é a porcentagem de extração que é calculada a partir da equação 4:

$$\%E = \frac{[n_{SB}]_S}{[n_{SB}]_T} \times 100 \quad (4)$$

em que $[n_{SB}]_S$ é a quantidade do soluto na fase superior e $[n_{SB}]_T$ é a quantidade total do soluto no sistema²⁹.

Na literatura é possível encontrar uma alta tendência na aplicação de SABs para a partição de solutos biológicos. Nestes estudos, destaca-se a utilização de sistemas formados com polímeros PEO de diferentes massas molares e sais inorgânicos (tabela 1). Além disso, nestes sistemas são avaliados diferentes fatores que facilitam a compressão das interações intermoleculares do processo de segregação, como também permitem a otimização das metodologias de extração ou purificação. Entre estes fatores, destaca-se: o efeito da massa molar do polímero formador do sistema, natureza dos sais (sais orgânicas, inorgânicas), pH, efeito do cátion e do ânion formador do SAB, o efeito da razão entre as fases, etc²⁷.

Outros sistemas reportados na tabela 1, são formados com líquidos iônicos (LIs) ou copolímeros tribloco com sais inorgânicos. Fatores expostos anteriormente, normalmente também são avaliados na partição de solutos nestes sistemas, mas até o momento, estes têm sido pouco explorados.

Os sistemas formados com PEO têm sido caracterizados como sistemas de alta capacidade de particionar os solutos para a fase superior ($K > 1$) com altas porcentagens de extração ($> 90\%$). Além disto, estes são mais econômicos que os sistemas formados com LIs ou copolímeros tribloco. Por outro lado, falando em termos de facilidade de trabalho, tem-se reportado na literatura que os sistemas formados por LIs são menos viscosos que os formados com polímeros e copolímeros facilitando o trabalho no laboratório, apesar de serem poucos os estudos das consequências dos LIs sobre o meio ambiente (meios naturais, animais, plantas, etc) sendo um possível problema ambiental utilizá-lo em escala industrial.

Tabela 1. SABs formados com três componentes e aplicados na partição de solutos biológicos.

SABs					
Componente 1	Componente 2	Soluto	K	% R	Ref
HO[C6mim][Cl]*	K ₂ CO ₃ , K ₂ HPO ₄ , K ₃ PO ₄	<i>chloramphenicol</i>	< 6,5	----	³⁰
PEO-PPO**	K ₃ PO ₄ , NaCl	<i>Lysozyme</i>	< 7,0	----	³¹
PEO600	KH ₂ PO ₄	<i>Avidin, Ovomuroid, Lysozyme, Ovotransferrin, Ovalbumin</i>	0,02 >K < 321,0	----	³²
	(NH ₄) ₂ SO ₄ /CitraNa	<i>DNA</i>	----	91,1	³³
PEO3000	K ₂ HPO ₄	<i>laccases</i>	2,7	96,0	³⁴
PEO1000	Na ₂ CO ₃	<i>proline dehydrogenase</i>	27,0	----	³⁵
	K ₂ HPO ₄	<i>catalase</i>	----	91,9	³⁶
PEO1500, PEO10000	K ₂ HPO ₄	<i>alkaline protease</i>	<5,0	----	³⁷
PEO1450, PEO2000, PEO 3350, PEO4000	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	<i>Bovine serum albumin (BSA)</i>	1,0>K<2,0	----	³⁸
PEO600, PEO800	Na ₂ SO ₄	<i>α-Chymotrypsin, Concanavalin A, Cytochrome c, β-Lactoglobulin B,</i>	0,027 > K < 65,3	----	³⁹
PEO4000	(NH ₄) ₂ SO ₄	<i>xylanase</i>	5,5	----	⁴⁰
PEO4000, PEO6000, PEO10000	MgSO ₄	<i>tannery</i>	<2,3	----	⁴¹
PEO8000	Na ₂ SO ₄	<i>Glucoside, Caffeine, Adenosine</i>	<18,8	----	⁴²
	CitraNa	<i>Absidia blakesleeana</i>	14,4	----	⁴³
PEO6000	(NH ₄) ₂ SO ₄	<i>phenylalanine dehydrogenase</i>	----	91,6	⁴⁴
PEO1500, PEO4000	Na ₂ SO ₄ , Li ₂ SO ₄	<i>glutenin flour</i>	<6,18	----	⁴⁵

*cloreto de 1-hidroxi-hexil-3-metilimidazolio , **copolímero de oxido de etileno-oxido de propileno

Outro tipo de sistemas aquosos bifásicos que merece destaque são aqueles formados por copolímeros, como os copolímeros triblocos, que podem ser aplicados na extração de solutos hidrofóbicos. Estas macromoléculas têm a capacidade de formar nanoestruturas com núcleos hidrofóbicos que encapsulam o soluto e o transferem de uma fase para outra ⁴⁶. Porém estes sistemas são caracterizados por serem muito viscosos, especialmente em valores de CLA altos. Além disso eles possuem tempos longos para o processo de segregação de fases em comparação com os sistemas de PEO. Esses pontos tornam-se negativos para a manutenção da estabilidade e atividade biológica dos solutos de interesse neste trabalho.

Outro inconveniente da maioria dos sistemas utilizados no estudo da partição de solutos biológicos são a contínua utilização de sais inorgânicos como fosfatos e sulfatos, o que em escala industrial pode causar diferentes problemas ambientais ⁴⁷.

Nesse contexto, uma alternativa para diminuir o impacto ambiental é a utilização de sais orgânicos tais como citrato de sódio, tartarato de sódio e succinato de sódio, que são catalogados como sais econômicos e de baixo impacto sobre o meio ambiente⁴⁸.

Existem diferentes sistemas formados com sais orgânicos entre os quais os formados por citrato de sódio e PEO de diferentes massas molares (600, 1500, 2000)^{33,48}, são os mais comuns. No entanto, estes sistemas têm sido pouco aplicados na partição de solutos biológicos. Um exemplo de aplicação é na extração de *Escherichia Coli*. em SAB de PEO1000-CitNa-H₂O, em que porcentagens de extração de 92% tem sido reportadas⁴⁹. Por outro lado, Gomes e colaboradores extraíram DNA de *Escherichia coli*. com sistemas formados com 4 componentes: PEO600-CitNa-(NH₄)₂SO₄-H₂O³³. Nestes experimentos utilizaram dois sais, um orgânico e outro inorgânicos com o objetivo de diminuir o impacto ambiental dos resíduos do processo sem afetar a efetividade na extração do DNA (91,1% de extração).

As pesquisas até então relatadas demonstram que SABs formados por sais orgânicos podem ser uma alternativa para a extração de solutos biológicos com altas porcentagens de recuperação. Deste modo, é importante propor novos SABs com sais orgânicos e polímeros de baixo impacto ambiental como o PEO para posteriormente aplicá-los na extração e purificação de solutos de interesse industrial, como a quimosina.

2.2.3 Aplicação de SABs na extração de quimosina

Os SABs foram aplicados para a extração de quimosina pela primeira vez no ano de 2005 por Spelzini *et al*⁵⁰. Nesta pesquisa eles estudaram o efeito da porcentagem de PEO no sistema para diferentes massas molares do polímero (1450,

3350 e 6000), em sistemas do tipo PEO-K₂HPO₄/KH₂PO₄-H₂O, em pH 7 e 4 °C. Na metodologia aplicada, os autores determinaram o coeficiente de partição e a porcentagem de extração utilizando espectroscopia de fluorescência molecular como técnica de detecção. Os pesquisadores encontraram coeficientes de partição na faixa de 10 a 20 (81-95% de extração), com um aumento linear do coeficiente de partição com a porcentagem de PEO no sistema. O comportamento anterior foi atribuído à interação favorável PEO-quimosina, que provoca a transferência de fase da enzima para a fase rica na macromolécula. Mas, contrariamente ao esperado, os pesquisadores reportaram valores de entalpia e entropia positivos calculados a partir da equação de van't Hoff, mostrando que o processo é entalpicamente desfavorável e entropicamente dirigido. Por outro lado, determinaram por meio de dicroísmo circular que o incremento da massa molecular gera uma maior estabilidade da enzima na fase superior. Isto foi confirmado por teste de atividade enzimática da proteína em cada fase.

Um ano depois¹⁴, os mesmos pesquisadores reportaram o efeito da massa molar (1450, 3350, 6000, 8000) e da razão da massa das fases em equilíbrio do mesmo sistema, mas com uma temperatura de 8 °C. Neste trabalho utilizaram a mesma metodologia e encontraram que para um mesmo CLA, o incremento da massa molar de 1450 até 3350 incrementa o coeficiente de partição de 38 até 48 e posteriormente diminuí com o incremento da massa molar até aproximadamente 30. Este comportamento foi atribuído à interação favorável PEO-enzima que provoca a transferência de fase em massas moleculares baixas. No entanto, com o incremento da massa molar, o efeito de exclusão molecular do polímero na fase superior aumenta, conseqüentemente promovendo o aumento da fração de quimosina na fase inferior. Os pesquisadores encontraram que o aumento da razão da massa entre as

fases de 0,2 até 1, aumenta a porcentagem de extração de aproximadamente 85 % para aproximadamente 96%, sendo este comportamento observado para todas as massas molares.

Reh *et al*⁵¹ também estudaram o efeito da concentração de NaCl na partição da quimosina em SABs de PEO (massas molares 1450, 3350 e 6000)- $K_2HPO_4/KH_2PO_4-H_2O$ e PEO-Maltodextrina1900 $g\text{mol}^{-1}-H_2O$. A metodologia aplicada foi similar àquela utilizada nos trabalhos de Spelzini^{14,50}, com a diferença de utilizar pH 6.5 e uma temperatura de 20 °C. Os resultados demonstraram que na ausência de NaCl o sistema de fosfato apresentam K entre 0 e 3 para as diferentes massas molares e para o sistema de maltodextrina um K de aproximadamente 3,5. Com o incremento da concentração de sal até 8 % (m/m), o K aumentou até 4 e 10 para os sistemas de fosfatos e para 6 no sistema de maltodextrina. Os resultados foram atribuídos à exposição de zonas da enzima que favorece a interação com os componentes da fase superior e assim aumenta sua distribuição nessa fase.

Estes trabalhos demonstram que são poucas as pesquisas avaliando a partição da quimosina em SABs e as interações dela com os componentes do sistema. Portanto, são necessárias pesquisas que avaliem fatores como o efeito da massa molecular do polímero formador do sistema, natureza dos sais (sais orgânicos, inorgânicos), pH, efeito do cátion e do ânion formador do SAB para compreender tais processo. Da mesma forma, determinar parâmetros termodinâmicos de transferência ($\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$, $\Delta_{tr}S$) utilizando técnicas diretas, como a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), é fundamental para compreender e otimizar estes processos.

2.3 Termodinâmica de partição de solutos em SABs (ITC)

Atualmente, por meio da análise estrutural de moléculas e um estudo computacional, é possível determinar que grupos de uma molécula ou macromolécula apresentem interação molecular em um processo termodinâmico. Como também é possível determinar valores aproximados de entalpia e entropias de uma interação. Mas estes procedimentos podem gerar valores com altas porcentagens de erro e, além disso, requer um tratamento matemático que só pode ser realizado por computadores ⁵².

Para determinar a força motriz que provoca um processo termodinâmico, é necessário analisar o processo de interação em termos energéticos. Para que um processo termodinâmico (interação intermolecular, transferência de um soluto em um SABs, etc.) ocorra espontaneamente, a energia livre de Gibbs do processo $\Delta_{\text{Proc}}G$ deve ser negativa na temperatura de estudo.

No processo de partição de um soluto em um SABs, o potencial químico do soluto i na fase superior (μ_i^{FS}) é igual ao potencial químico do componente i na fase inferior (μ_i^{FI}), quando o sistema se encontra no equilíbrio termodinâmico, ou seja:

$$\mu_i^{\text{FS}} = \mu_i^{\text{FI}} \quad (5)$$

O potencial químico do soluto na fase superior e inferior são expressos pela equações 6 e 7 respectivamente:

$$\mu_i^{\text{FS}} = \mu_i^0(\text{FS}) + RT \ln a_i^{\text{FS}} \quad (6)$$

$$\mu_i^{\text{FI}} = \mu_i^0(\text{FI}) + RT \ln a_i^{\text{FI}} \quad (7)$$

Sendo $\mu_i^0(\text{FS})$ e $\mu_i^0(\text{FI})$ o potencial químico padrão do soluto i na fase superior e inferior respectivamente, a_i^{FS} e a_i^{FI} a atividade do soluto i em cada uma das fases, R é a constante dos gases ideais e T a temperatura absoluta do sistema. Ao igualar as equações 6 e 7, é possível obter a equação 8:

$$\mu_i^0(\text{FS}) - \mu_i^0(\text{FI}) = RT \ln \frac{a_i^{\text{FI}}}{a_i^{\text{FS}}} \quad (8)$$

Nesta equação o termo da esquerda representa a variação da energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{tr}G$), quando um mol de soluto no sistema bifásico é transferido da fase inferior para a fase superior do sistema. Como foi mostrado na equação 3, a razão das atividades do soluto particionado em cada fase é igual a K (equação 9).

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln K \quad (9)$$

Portanto, conhecendo a constante de partição do soluto em uma temperatura específica é possível determinar a $\Delta_{tr}G$. Esta função de estado é dependente i) das interações intermoleculares no sistema e ii) dos estados configuracionais dos componentes do sistema.

No processo de transferência da quimosina em um SAB, a variação de entalpia de transferência, $\Delta_{tr}H$, é uma função de estado que permite conhecer em que fase encontram-se os componentes com os quais a quimosina apresenta interações intermoleculares mais favoráveis. A $\Delta_{tr}H$, pode ser determinada por uma metodologia indireta, utilizando a equação de van't Hoff (equação 10).

$$\ln \frac{K(T_2)}{K(T_1)} \approx \frac{\Delta_{tr}H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (10)$$

em que $K(T_1)$ e $K(T_2)$ são as constantes de partição do soluto na temperatura T_1 e na temperatura T_2 , respectivamente, R é a constante dos gases ideais. Esta equação foi desenvolvida a partir da equação fundamental de Gibbs e com a consideração que $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$ não variam com a temperatura.

Spelzini e Reh utilizaram a equação de van't Hoff para determinação de $\Delta_{tr}H$ na partição da quimosina em SABs^{50,51}. Mas apesar de sua ampla utilização, esta metodologia não é precisa, sobretudo em processos onde a temperatura tem uma influência no resultado⁵⁰.

Outra forma de determinar $\Delta_{tr}H$ é utilizando a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) que determina diretamente e sem aproximações o valor da variação de entalpia de interação. Para compreender o funcionamento do calorímetro e que determina, é necessário demonstrar a que é numericamente igual à entalpia em um processo a pressão constante. Consideremos a equação 11, que é a equação simplificada da primeira lei da termodinâmica:

$$dU = dq + dw \quad (11)$$

em que dU , dq e dw são a variação infinitesimal da energia interna do sistema, a energia na forma de calor transferido ou absorvido pelo sistema e o trabalho realizado pelo ou sobre sistema, respectivamente. Se o sistema estiver restrito a realizar trabalho de expansão e compressão com pressão constante, tem-se:

$$du = dq - P_{ext}dV \quad (12)$$

Em que P_{ext} é a pressão externa no sistema e dV é a variação infinitesimal do volume do sistema. Para uma variação finita nas propriedades do sistema, têm-se o desenvolvimento matemático das equações 13 até a16:

$$\int_f^i dU = \int dq - \int_f^i P_{\text{ext}} dv \quad (13)$$

$$U_f - U_i = q - P_{\text{ext}}(V_f - V_i) \quad (14)$$

$$U_f - U_i = q - P_{\text{ext}}V_f + P_{\text{ext}}V_i \quad (15)$$

$$(U_f + P_{\text{ext}}V_f) - (U_i + P_{\text{ext}}V_i) = q \quad (16)$$

Agrupando os termos, encontram-se e denominando a soma $U + P_{\text{ext}}V$ entalpia, tem-se na equação 16 uma entalpia final e uma inicial resultando na equação 17, em outras palavras uma variação de entalpia (equação 18).

$$H_F - H_i = q \quad (17)$$

$$\Delta_{\text{pro}}H = q \quad (18)$$

A partir da equação 18, é importante esclarecer que a variação de entalpia em um processo termodinâmico apresenta o mesmo valor numérico que a quantidade de energia trocada na forma de calor entre sistema e vizinhança quando o sistema só pode realizar trabalho de compressão e expansão a pressão constante. Esta energia é proveniente da energia interna do sistema (variação da energia translacional, vibracional, rotacional e eletrônica) mais o trabalho de compressão ou expansão que o sistema realiza. Isto demonstra que é possível conhecer o valor da entalpia determinando-se a quantidade de energia na forma de calor absorvida ou liberada em

um processo termodinâmico ocorrendo no interior de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC) (figura 3).

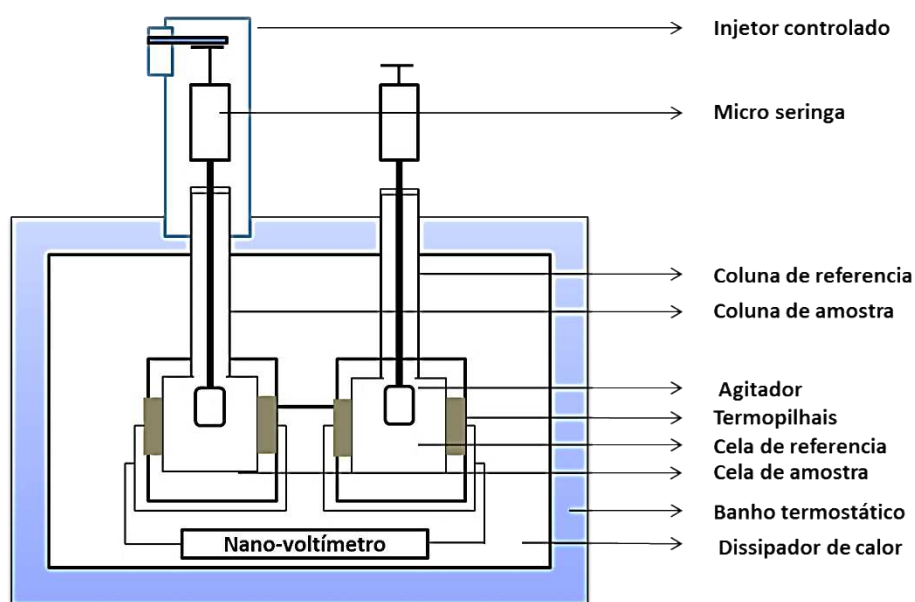


Figura 3. Calorímetro de titulação isotérmica (ITC).

Em um calorímetro de titulação isotérmica, ocorre à mistura de duas soluções dentro de uma cela calorimétrica que se encontra em equilíbrio térmico com suas vizinhanças num ambiente de temperatura altamente controlada. A solução titulante é adicionada dentro da cela calorimétrica por meio de um injetor controlado mecanicamente. A solução no interior da cela se encontra em constante agitação. Quando as duas soluções são misturadas, processos termodinâmicos envolvendo o rompimento e a formação de interações intermoleculares passa a ocorrer e a temperatura do sistema é variada de uma dada quantidade. O equilíbrio térmico é novamente alcançado quando é transferida energia na forma de calor entre o sistema e vizinhança⁵³.

Esta quantidade de energia é detectada por termopilhas localizadas lateralmente às celas calorimétricas, provocando uma diferença de potencial elétrico entre seus terminais, permitindo determinar a quantidade de energia na forma de calor que foi absorvida ou liberada pelo sistema por unidade de tempo (equação 19). Desta maneira, é possível plotar um gráfico de potência em função do tempo (figura 4).

$$P = \frac{dq}{dt} \quad (19)$$

A integral da curva de potência versus tempo fornece a quantidade de energia da forma de calor para cada injeção e conseqüentemente a variação de entalpia.

$$\Delta_{pro}H = q = \int_{t_1}^{t_2} P dt \quad (20)$$

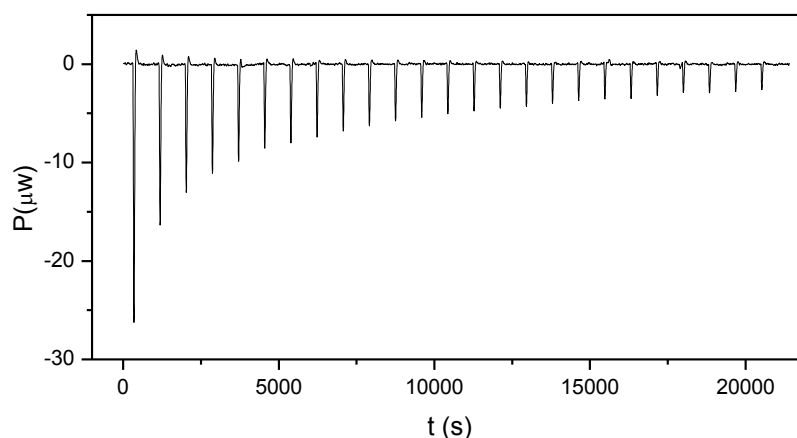


Figura 4. Termograma de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC).

Com base na equação 21 e os valores de $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}G$ determinados por ITC e a equação 9, se pode determinar os valores de $\Delta_{tr}S$ para a partição de um soluto em um SAB.

$$T\Delta_{tr}S = \Delta_{tr}H - \Delta_{tr}G \quad (21)$$

O termo $\Delta_{tr}H^o$ determinado por ITC é o somatório das diferentes contribuições entálpicas das interações intermoleculares; quimosina-sal ($\Delta_{chy-s}H^o$), água-sal ($\Delta_{w-s}H^o$), quimosina-macromolécula ($\Delta_{chy-Mac}H^o$) e água – macromolécula ($\Delta_{w-Mac}H^o$), como expresso na equação 22.

$$\Delta_{tr}H^o = \Delta_{chy-s}H^o + \Delta_{w-s}H^o + \Delta_{chy-Mac}H^o + \Delta_{w-Mac}H^o \quad (22)$$

A partir da determinação de entalpia de diluição ($\Delta_{dil}H$) dos componentes envolvidas nas interações é possível determinar a contribuição de cada termo ($\Delta_{i-j}H^o$) sobre a $\Delta_{tr}H^o$, como descrito a seguir.

2.4. Determinação da entalpia de diluição de solutos ($\Delta_{dil}H$)

No processo de dissolução de um soluto em um determinado solvente, energia na forma de calor é absorvida ou liberada no processo. A troca de energia neste processo à pressão constante é conhecida como entalpia de solução. Portanto, a entalpia de solução é definida como a variação de entalpia que ocorre quando um mol de soluto é dissolvido em uma quantidade definida de solvente em uma temperatura dada. Quando se deseja comparar as energias de interação soluto-solvente sem ter em conta a quantidade de solvente, o calor de solução é usualmente definido para uma solução infinitamente diluída. Assim, a entalpia de diluição infinita ($\Delta_{dil}H^\infty$) é a energia na forma de calor liberada ou absorvida pelo sistema quando um mol de soluto é dissolvido em uma grande quantidade de solvente.

A $\Delta_{dil}H^\infty$ é determinada a partir de medidas de titulação isotérmica, no qual é titulado um solvente com uma solução do soluto no solvente, permitindo obter um termograma como aquele mostrado na figura 3. Utilizando a equação 23 é possível determinar a entalpia de diluição molar para cada pico da figura 3, onde n é o número de mols do soluto adicionado em cada injeção.

$$\Delta_{dil}H = \frac{q}{n} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} P dt}{n} \quad (23)$$

Através de um gráfico de $\Delta_{dil}H$ do soluto versus concentração do soluto [soluto], é possível realizar um ajuste da curva obtida a uma equação polinomial, sendo que o limite da curva de $\Delta_{dil}H$ versus [soluto] quando [soluto] tende a zero é o valor da $\Delta_{dil}H^\infty$ do soluto no solvente (intercepto da curva polinomial ajustada).

2.5 Modelo de Johansson (contribuição entálpica e entrópica para o valor K)

Além, dos métodos experimentais para determinar os parâmetros termodinâmicos de transferência da quimosina em SABS, existem na literatura modelos matemáticos, como o modelo proposto por Johansson et al., que explicam a contribuição entrópica e entálpica sobre a constante de partição de um soluto. Quando um soluto se particiona em um sistema bifásico, no equilíbrio termodinâmico $\mu_i^{FS} = \mu_i^{FI}$, sendo que μ_i^{FS} é expresso pela equação 24.

$$\mu_i^{FS} = \left(\frac{\partial \Delta G_{mix}^{FS}}{\partial n_i^{FS}} \right)_{T,P,n_i \neq n_j} = \mu_i^o + RT \ln \phi_i^{FS} + (\mu_i^{ex})^{FS} \quad (24)$$

em que μ_i^o é o potencial químico do componente puro i , ΔG_{mix}^{FS} é a variação da

energia livre de Gibbs da fase com i , n_i^{FS} é o número de mols de i na fase superior, ϕ_i^{FS} é a fração do soluto na fase (definido como $\phi_i^{FS} = M_i n_i^{FS} / N$, sendo M_i o grau de polimerização e N é o numero total de moléculas) e $(\mu_i^{ex})^{FS}$ é o excesso de potencial químico de i na fase superior. Mas se assumimos que o soluto a particionar-se encontra diluído infinitamente, este não afetará a composição do SAB no equilíbrio de fase. Assim K , pode ser determinado a partir do diagrama de fase sem soluto (equação 25).

$$\ln K = \ln \frac{\phi_i^{FS}}{\phi_i^{FI}} = \frac{1}{RT} [(\mu_i^{ex})^{FI} - (\mu_i^{ex})^{FS}] \quad (25)$$

Onde, $(\mu_i^{ex})^{FI}$ é o excesso de potencial químico de i na fase inferior associado ao excesso de entropia de mistura dos componentes para formar a fase e as improváveis interações não ideais entre os componentes na fase inferior (soluto-polímero, polímero-solvente, etc). De acordo com o modelo de Johansson et al. a energia livre de Gibbs de mistura é dada pela equação 26.

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S^c = NRT \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i}{M_i} \ln \phi_i + N \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m \phi_i \phi_j w_{ij} \quad (26)$$

Estabelecendo que a contribuição de ΔH_{mix} é zero, e aplicando a equação 24, tem-se:

$$\mu_i - \mu_i^o = T \left(\frac{\partial \Delta S^c}{\partial n_i} \right)_{T,P,n_i \neq n_j} = RT \left[\ln \phi_i - \phi_i + 1 - M_p \sum_{i \neq j} \frac{\phi_j}{M_j} \right] \quad (27)$$

em que o termo $RT \ln \phi_i$ representa a variação ideal da entropia molar parcial

quando ocorre o processo termodinâmico de mistura, enquanto os outros três termos da equação 27 representam o μ_i^{ex} da fase.

No modelo de Johansson et al. a constante de partição é definida pela equação 28

$$\ln K_i = -(\Phi_i^{FS} - \Phi_i^{FI}) + M_i \left(\sum_{j \neq i}^m \frac{\Phi_j^{FS}}{M_j} - \sum_{j \neq i}^m \frac{\Phi_j^{FI}}{M_j} \right) \quad (28)$$

Em diluição infinita, Φ_i^{FS} e Φ_i^{FI} devem de ter valores semelhantes e pequenos. Portanto, os termos $(\Phi_i^{FS} - \Phi_i^{FI}) = 0$ e $(\Phi_j^{FS}/M_j) = (n_j^{FS}/N^{FS}) = (n_j^{FS}/\rho V^{FS})$, em que N^{FS} é o número de sítios da rede da fase superior, ρ é o número de sítios da rede por unidade de volume, V^{FS} o volume da fase superior, e M_i é a massa molar do soluto i . Logo a contribuição entrópica sobre a constante de partição fica expressa pela equação 29.

$$\ln K = \frac{M_i}{\rho} \left(\frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right) \quad (29)$$

De acordo com essa equação, quando o processo é entropicamente dirigido, a quimosina se distribuirá entre ambas as fases devido a diferença do número de moléculas por unidade de volume (densidade numérica) entre a fase superior e a inferior. Como os SABs são caracterizados por apresentar uma maior densidade numérica na fase inferior que na fase superior (principalmente causada pela diferença de moléculas de água entre as fases), um soluto particionado nestes sistemas se concentrará na fase inferior.

Quando o processo de partição é entalpicamente dirigido (em ausência de contribuição entrópica) a constante de partição é representada pela equação 30.

$$\ln K = \frac{M_Q}{RT} \left[\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{iQ} + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^T \Phi_i^T - \Phi_i^B \Phi_i^B) w_{ij} \right] \quad (30)$$

em que Φ_i^T e Φ_i^B são as frações de volume do componente i na fase superior e inferior, respectivamente (sendo i água, polímero ou sal); M_Q é a massa molar da quimosina e w_{ij} e w_{iQ} são a energia potencial do par i - j e i -chymosin. O termo de w_{ij} ou w_{iQ} é definido pela seguinte equação:

$$w_{ij} = z(\varepsilon_{ij} - \frac{1}{2}(\varepsilon_{ii} + \varepsilon_{jj})) \quad (31)$$

em que z é o número de moléculas vizinhas que interagem com o componente i , enquanto que ε_{ij} , ε_{ii} e ε_{jj} representam a energia envolvida na formação de um par potencial i - j e rompimento da interação i - i e j - j , respectivamente. Da equação 30, o termo $\sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^T \Phi_i^T - \Phi_i^B \Phi_i^B) w_{ij}$, representa a energia do processo de formação de uma cavidade (rompimento de interação intermolecular) na fase superior e o fechamento de uma cavidade (formação de interação intermolecular) na fase inferior quando a quimosina se transfere da fase inferior e vai para a fase superior. Esta energia é denominada como auto-energia do sistema. Por outro lado, o termo $\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{iQ}$ representa a energia absorvida ou liberada no processo de interação da quimosina com os componentes da fase superior e inferior.

3. Considerações finais do capítulo 1

Neste capítulo, fez-se uma revisão de literatura abordando aspectos da formação dos SABs, a sua aplicação na extração e purificação de solutos biológicos e de diferentes modelos e aproximações que tentam explicar as variações dos parâmetros termodinâmicos de transferência de solutos nos SABs. Este resumo de literatura científica nesta área de pesquisa mostrou que existem poucas pesquisas focadas em determinar os parâmetros termodinâmicos de transferência. Assim, os capítulos posteriores fornecem a obtenção de novos SABs macromolécula + sal orgânica + água para aplicação na determinação dos parâmetros termodinâmicos de transferência da enzima quimosina. Esta é uma questão estratégica no sentido de podermos modular as propriedades físico-químicas dos SABs pra otimizá-los como sistemas de extração de solutos biológicos.

4. Referências

1. Frerix, A.; Schönewald, M.; Geilenkirchen, P.; Müller, M.; Kula, M. R.; Hubbuch, J. *Langmuir* **2006**, *22*.
2. Palmer, D. S.; Christensen, A. U.; Sørensen, J.; Celik, L.; Qvist, K. B.; Schiøtt, B. *Biochemistry*. **2010**, *49*, 2563-2573.
3. Narita, Y.; Oda, S. I.; Moriyama, A.; Kageyama, T. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *404*, 177-185.
4. Kulaguin-Chicaroux, A.; Zeiner, T. *Fluid Phase Equilibr.* **2014**, *362*, 1-10.
5. Callebaut, I.; Schoentgen, F.; Prat, K.; Mornon, J. P.; Jollés, P. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1749*, 75.
6. Hsieh, J. F.; Pan, P. H. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2039-2045.
7. Chitpinyol, S.; Crabbe, M. J. C. *Food Chem.* **1998**, *61*, 395-418.
8. Rampilli, M.; Larsen, R.; Harboe, M. *Int. Dairy. J.* **2005**, *15*, 1130-1137.
9. Houen, G.; Madsen, M. T.; W., H. K.; Foltmann, P. B. *Int. J. Biochem. Cell Bid.* **1996**, *28*, 667-675.
10. Abdel, M. C. A.; Abou, I. F. G.; Vukashinovic, V.; Zalunin, I. A.; Timokhina, E. A.; Lavrenova, G. I.; Stepanov, V. M. *Comp. Biochem. Physiol.* **1996**, *113B*, 57-62.
11. Burton, S. C.; Haggarty, N. W.; Harding, D. R. K. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *56*, 45-55.
12. Strop, P.; Sedlacek, J.; Stys, J.; Kaderabkova, Z.; Blaha, I.; Pavlickova, L.; J., P. *Biochemistry*. **1990**, *29*, 9863-9871.
13. Voutsinas, L. P.; Nakai, S. *J. Dairy. Sci.* **1983**, *66*, 694-703.
14. Spelzini, D.; Picó, G.; Farruggia, B. *Colloid. Surface. B.* **2006**, *51*, 80-85.
15. Zafarani-Moattar, M. T.; Hamzehzadeh, S. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52*, 1686-1692.
16. Freire, M. G.; Claudio, A. F.; Araujo, J. M.; Coutinho, J. A.; Marrucho, I. M.; Canongia Lopes, J. N.; Rebelo, L. P. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4966-4995.
17. da Silva, L. H. M.; Loh, W. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1345-1351.
18. Beijerinck, M. W. *Zbl. Bakt. II Natur.* **1896**, *627*, 698.
19. Beijerinck, M. W. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1910**, *7*, 16.
20. Ostwald, W.; Hertel, R. H. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1929**, *47*, 258.

21. Ostwald, W.; Hertel, R. H. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1929**, *47*, 357.
22. Ryden, J.; Albertsson, P. A. *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, *37*, 219.
23. Mageste, A. B.; Rodrigues, L.; Ferreira, G. M.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Ferreira, R. C.; Minim, L. A. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7623-7629.
24. da Silva, T. L. Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG-Brazil, 2009.
25. Oliveira, R. L. L. Termodinâmica de partição do corante natural carmim de cochonilha em diferentes sistemas aquosos bifásicos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG-Brasil, 2010.
26. Waziri, S. M.; Abu-Sharkh, B. F.; Ali, S. A. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 526.
27. Asenjo, J. A.; Andrews, B. A. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 8826-8835.
28. Rito-Palomares, M. *J. Chromatogr. B.* **2004**, *807*, 3-11.
29. da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Paggioli, J. F.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. *Quim. Nova*, **2006**, *29*, 1332-1339.
30. Liu, C.; Ren, C. *J. Chem. Eng. Data* **2009**, *54*, 3296-3299.
31. Govindarajan, R.; Perumalsamy, M. *J. Chem. Eng. Data.* **2013**, *58*, 2952-2958.
32. de Andrade, V. M.; Rodrigues, G. D.; de Carvalho, R. M. M.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H. *Chem. Eng. J.* **2011**, *171*, 9-15.
33. Gomes, G. A.; Azevedo, A. M.; Aires-Barros, M. R.; Prazeres, D. M. F. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *65*, 22-30.
34. de Lemos, L. R.; Patrício, P. R.; Rodrigues, G. D.; de Carvalho, R. M. M.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M. *Fluid Phase Equilib.* **2011**, *305*, 19-24.
35. Martins, J. P.; Coimbra, J. S. R.; de Oliveira, F. C.; Sanaiotti, G.; da Silva, C. A. S.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, *55*, 1247-1251.
36. Rodrigues, G. D.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Teixeira, L. S.; de Andrade, V. M. *J. Chem. Eng. Data* **2009**, *54*, 1894-1898.
37. Patrício, P. R.; Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; de Carvalho, R. M. M.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H. *Fluid Phase Equilib.* **2011**, *305*, 1-8.
38. Martins, J. P.; Mageste, A. B.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Patrício, P. R.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. *J. Chem. Eng. Data* **2009**, *54*, 2891-2894.

39. Rodrigues, G. D.; da Silva, L. T.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; de Carvalho, R. M. M. *J. Chem. Eng. Data* **2010**, *55*, 1158-1165.
40. Othmer, D. F.; Tobias, P. E. *Ind. Eng. Chem.* **1942**, *34*, 693-696.
41. Saravanan, S.; Rao, J. R.; Murugesan, T.; Nair, B. U.; Ramasami, T. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62*, 969-978.
42. Santos, I. J. B.; de Carvalho, R. M. M.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M. *J. Chem. Eng. Data* **2012**, *57*, 274-279.
43. Neves, M. L. C.; Porto, T. S.; Souza-Motta, C. M.; Spier, M. R.; Soccol, C. R.; Moreira, K. A.; Porto, A. L. F. *Fluid. Phase. Equilibr.* **2012**, *318*, 34-39.
44. Mohamadia, H. S.; Omidiniab, E. *J. Chromatogr. B* **2007**, *854*, 273-278.
45. Barberino, I. S.; Coimbra, J. S.; Martins, J. P.; da Silva, L. H. M.; Ferreira, R. C.; Pirozzi, M. R.; Cinquini, A. *J. Cereal. Sci.* **2010**, *52*, 270-274.
46. da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Júnior, J. A.; Martins, J. P.; Reis Coimbra, J. S.; Minim, L. A. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *60*, 103-112.
47. Regupathi, I.; Srikanth, C. K.; Sindhu, N. *J. Chem. Eng. Data.* **2011**, *56*, 3643-3650.
48. Patrício, P. R.; Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; de Carvalho, R. M. M.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H. *Fluid. Phase. Equilibr.* **2011**, *305*, 1-8.
49. Callebaut, I.; Schoentgen, F.; Prat, K.; Mornon, J. P.; Jolles, P. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1749*, 75-80.
50. Spelzini, D.; Farruggia, B.; Pico, G. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2005**, *821*, 60-66.
51. Reh, G.; Spelzini, D.; Tubío, G.; Picó, G.; B., F. *J. Chromatogr. B.* **2007**, *860* 98-105.
52. Reh, G.; Spelzini, D.; Tubio, G.; Pico, G.; Farruggia, B. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, *860*, 98-105.
53. Freire, E.; Mayorga, O. L.; Straume, M. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 949-959.

CAPÍTULO 2: Phase diagrams, densities and refractive indexes of poly(oxide ethylene) + organic salts + water aqueous two-phase systems: effect of temperature, anion and molar mass

ABSTRACT

The application of aqueous two-phase systems (ATPS) at the industrial level requires systems formed by non-toxic substances to decrease the negative impact on the environment. Organic salts such as sodium citrate, sodium tartrate and sodium succinate have been utilized in order to fulfill this objective. In this work, ATPS formed by poly(oxide ethylene), PEO, with molar mass 10,000 or 35,000 g mol⁻¹, organic salts and water, namely PEO10000 + sodium citrate + water, PEO10000 + sodium tartrate + water, PEO10000 + sodium succinate + water and PEO35000 + sodium citrate + water ATPS at (283.15, 298.15 and 313.15) K have been studied. Effects of temperature, anion and molar mass of the ATPS, as well as, the densities and refractive indexes of both phases of the ATPS were evaluated. The segregation process was endothermic and entropically driven for all ATPS. The biphasic region on the phase diagrams increased as the molar mass of PEO increased. In addition, the biphasic region also increased in relation to the anions studied: citrate > tartrate > succinate. The consistency of the tie-line data was ascertained by applying the Othmer-Tobias correlation.

Keywords: Aqueous two-phase system, organic salts, poly(ethylene oxide), phase diagram, liquid-liquid equilibrium.

1. Introduction

Aqueous two-phase system (ATPS) have been used for the extraction, separation and purification of biological solutes such as proteins [1], enzymes [2], amino acids [3], antibiotics [4], nucleic acids [5], ions [6-9] and nanomaterials [10], as well as, of organic molecules [11-13].

ATPS can be formed by mixing water, in high concentration, 55 - 90 % (m/m), with two structurally different polymers [14], or a polymer and an electrolyte [15,16], or two electrolytes [17], under specific thermodynamic conditions. Some of the important characteristics of ATPS include low cost and toxicity, low value of interfacial tension, and high water content, which allow for a friendly environment in which solutes can be separated and purified [1, 18].

The transfer of the solute from one phase to the other phase, in the ATPS, depends strongly on the components within the system, as well as, of the intensive thermodynamic properties of the two phases in equilibrium [19] In this sense, modulating these thermodynamic properties is fundamental in order to obtain the best conditions for the purification of solutes and the creation of news ATPS.

ATPS formed with polymer (or copolymer) and inorganic salt have been reported in the literature since these components are inexpensive, highly soluble in water, nonflammable and nonvolatile [20-22]. Nevertheless, continuous application of inorganic salts, mainly phosphate and sulfate salts, in industrial processes can lead to several environmental problems. In view of decreasing the negative impact on the environment and increasing the application of ATPS at the industrial level, organic salts such as sodium citrate, sodium tartrate and sodium succinate have been employed [15, 16, 21, 23-25]. These systems have allowed the study of the effect of

hydrophobicity on the partitioning of different solutes in ATPS formed with organic salts. However, to our best knowledge, there is no research in literature that describes phase diagrams of ATPS composed of poly(ethylene oxide), PEO, with a high molar mass of 10,000 or 35,000 g mol⁻¹ (PEO10000 or PEO35000).

In this work, the phase equilibrium data for PEO10000 + organic salts + water and PEO35000 + sodium citrate + water ATPS were obtained at different temperatures (283.15, 298.15, 313.15) K. The anion effect on the binodal curve was evaluated using the electrolytes sodium citrate, sodium tartrate and sodium succinate. Densities and refractive index for both phases of the ATPS also were obtained.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Poly(ethylene oxide), PEO, molar mass 10000 g mol⁻¹ and 35000 g mol⁻¹ were obtained from Aldrich (USA). Sodium tartrate (Na₂C₄H₄O₆·2H₂O), sodium succinate (Na₂C₄H₄O₄·6H₂O) and sodium citrate (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) were purchased from Vetec (Brazil). Milli-Q water (Millipore, USA) was used to prepare all ATPS.

2.2 Preparation of ATPS

Stock solutions of polymer and salt were prepared using an analytical balance (Shimadzu, AG 220 with an uncertainty of ±0.0001 g). Appropriate amount of these stock solutions were weighed in glass vessels, and were vigorously stirred. The systems became turbid and were allowed to settle for (24–72) h at (283.15, 298.15 or 313.15) K in a temperature controlled bath (Microquimica, MQBTC 99-20, with an uncertainty of ±0.1 K). When the systems reached the thermodynamic equilibrium,

aliquot of the top phase (TP) and of the bottom phase (BP) were collected with a syringe for quantification of the components of the system.

2.3 Construction of phase diagrams

The polymer concentration was measured by refractive index (Analytic Jena AG Abbe, model 09-2011, Germany, with a resolution ± 0.0001) and the salt concentration was obtained by conductimetry (Schott CG853, Mainz, Germany, with an uncertainty of ± 0.01). Each phase of the ATPS was appropriately diluted with water and the measurements were performed at 298.15 K. Salt solutions showed the same conductivity in water or diluted polymer solutions and the salt concentration was determined in the range of $1.00 \cdot 10^{-3}$ to $2.50 \cdot 10^{-2}$ % (m/m).

The polymer concentration was determined by subtracting the salt concentration, w_{salt} , from the total concentration (salt concentration plus polymer concentration), w_{total} , (equation 1). w_{total} was determined by total refractive index.

$$w_{Polymer} = w_{total} - w_{salt} \quad (1)$$

Equation 1 can be used because the validity of the principle of refractive index addition was confirmed within the interval of concentration studied. Standard curves of refractive index versus polymer composition (or salt composition) in aqueous medium were obtained and the refractive index of an aqueous mixture containing “X” % (m/m) of polymer and “Y” % (m/m) of salt was equal to the refractive index of a “X” % (m/m) polymer solution (in the absence of salt) plus the refractive index of a “Y” % (m/m) salt solution (in the absence of polymer) [26], with X and Y varying between 0.0 and 6.0 % (m/m).

For the determination of water, 1.000 ± 0.100 g of each phase of ATPS was transferred into 2 mL glass vials and allowed to dry at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the mass of the system was constant. Then, mass percentage of water was calculated by equation 2.

$$w_{water} = \frac{m_{phase} - m_{dry}}{m_{phase}} \cdot 100 \quad (2)$$

In this equation, m_{phase} is the mass of phase and m_{dry} is the phase mass after drying.

For each phase, in all ATPS, mass balances were determined by sum of concentrations of salt, polymer and water with values in the range of 98-101 % (m/m).

2.4 Density and Refractive Index Measurements

Density measurements were realized for each phase of the ATPS using a density meter (Anton Par, model DMA 5000M, Austria) with an uncertainty of $\pm 0.001\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. The density meter was calibrated with the surrounding air and water. Refractive indexes for each phase were carried out using the refractometer. All measurements were repeated at least three times with no appreciable variation and the temperature was thermostatically controlled at 298.15 K .

3. Results and Discussion

Formation of the ATPS depends on the molecular interactions among the components of the system (salt, polymer and water) and can be expressed in terms of Gibbs free energy of the mixture ($\Delta_{Mix}G$). When two or more components are

mixed, negative or positive $\Delta_{Mix}G$ values can be obtained leading to the formation of homogeneous or two phases systems. Phase diagrams can be used to determine the concentrations of polymer, salt and water that are necessary to obtain positive, negative or zero values of $\Delta_{Mix}G$, by referring to the concentrations of the components of system on the binodal curve [27]. When $\Delta_{Mix}G > 0$, a segregation process between polymer molecules and salt ions occurs and leads to the formation of a top phase and a bottom phase that are enriched with polymer and salt, respectively [28]. The phase diagram also provides the tie-line length (TLL). The tie-line connects the composition of the top phase to the composition of the bottom phase when the two phases are in thermodynamic equilibrium.

The tie-line length numerically expresses the difference of intensive thermodynamic properties between both phases in equilibrium, at a constant pressure and temperature, and is calculated using equation 3 [29].

$$TLL = \left[(C_p^T - C_p^B)^2 + (C_s^T - C_s^B)^2 \right]^{1/2} \quad (3)$$

In this equation, C_p^T and C_p^B are the polymer concentrations in the TP and BP, respectively, and C_s^T and C_s^B are salt concentrations in the TP and BP, respectively. The concentrations are mass percentages.

The experimental liquid-liquid equilibrium data for PEO 10000 + sodium citrate + water, PEO10000 + sodium tartrate + water, PEO10000 + sodium succinate + water and PEO35000 + sodium citrate + water obtained at (283.15, 298.15, 313.15) K are show in tables 1 through 4. Concentrations are reported when the system is in thermodynamic equilibrium condition. For all ATPS, an increase in the global mass

fractions of PEO and salt leads to an increase in TLL and the increase in TLL values can be attributed to the change in mass fraction of each phase, mainly of the mass fraction of PEO in TP and the mass fraction of salt in BP.

Table 1.
Equilibrium Data for the PEO10000 (w_{PEO}) + Sodium Citrate (w_S) + Water (w_W) system from 283.15 K to 313.15 K.

tie-line	TLL	overall			top phase			bottom phase		
		w_{PEO}	w_S	w_W	w_{PEO}	w_S	w_W	w_{PEO}	w_S	w_W
283.15 K										
1	30.22	14.03	10.00	75.98	27.30	3.88	68.99	0.14	17.12	83.00
2	33.32	15.42	10.50	74.09	29.73	3.45	66.71	0.11	18.72	81.56
3	36.48	16.81	10.99	72.19	32.24	3.02	64.16	0.07	20.22	80.06
4	39.97	18.22	11.60	70.18	34.96	2.60	61.71	0.02	22.02	78.43
5	42.73	19.64	12.00	68.36	37.07	2.27	60.01	0.02	23.56	76.94
298.15 K										
1	30.27	18.49	7.51	73.99	27.85	3.88	68.49	0.20	16.19	84.19
2	33.36	19.97	7.99	72.04	30.55	3.28	66.16	0.16	17.03	82.86
3	37.75	21.39	8.50	70.10	34.25	2.77	62.36	0.10	18.86	81.33
4	40.74	22.86	9.01	68.13	36.63	2.40	60.29	0.07	20.38	79.71
5	43.52	24.08	9.50	66.42	38.69	2.12	58.84	0.02	22.09	78.34
313.15 K										
1	35.77	13.97	10.06	75.98	33.21	2.67	63.82	0.13	16.28	83.75
2	38.28	15.35	10.59	74.06	35.22	2.42	62.16	0.08	17.61	82.27
3	41.11	16.73	11.08	72.19	37.37	2.09	59.89	0.05	19.34	81.09
4	43.97	18.15	11.69	70.15	39.75	1.82	57.06	0.02	20.65	79.47
5	46.57	19.36	12.20	68.45	42.02	1.65	55.22	0.02	21.77	78.24

Table 2.

Equilibrium Data for the PEO10000 (w_{PEO}) + Sodium Tartrate (w_{S}) + Water (w_{W}) system from 283.15 K to 313.15 K.

tie-line	TLL	overall			top phase			bottom phase		
		w_{PEO}	w_{S}	w_{W}	w_{PEO}	w_{S}	w_{W}	w_{PEO}	w_{S}	w_{W}
283.15 K										
1	40.42	18.95	12.74	68.31	35.05	3.35	61.25	0.31	24.01	74.90
2	42.68	20.00	13.21	66.79	36.79	3.09	59.60	0.25	25.14	74.07
3	45.14	21.01	13.70	65.29	38.63	2.84	57.91	0.23	26.56	72.28
4	47.37	21.96	14.21	63.83	40.31	2.62	56.55	0.19	27.81	70.88
5	49.64	23.05	14.67	62.28	42.12	2.43	54.65	0.09	28.85	69.82
298.15 K										
1	41.92	18.88	12.49	68.63	37.38	3.16	58.83	0.23	22.57	75.97
2	44.18	19.93	12.96	67.11	39.07	2.89	57.59	0.20	23.89	74.50
3	46.43	20.90	13.44	65.66	40.81	2.70	55.50	0.12	25.07	73.43
4	48.64	21.86	13.93	64.21	42.51	2.51	54.37	0.11	26.34	71.46
5	50.92	22.97	14.40	62.63	43.89	2.36	53.39	0.05	28.27	69.85
313.15 K										
1	45.88	18.89	12.73	68.38	41.68	2.55	54.59	0.21	22.17	76.59
2	48.03	19.94	13.20	66.86	43.47	2.42	53.37	0.17	23.21	75.12
3	50.00	20.94	13.70	65.36	44.80	2.28	52.08	0.13	24.75	73.60
4	52.17	21.92	14.18	63.89	46.30	2.11	50.46	0.04	26.23	71.71
5	54.33	23.02	14.70	62.28	48.08	1.99	48.87	0.02	27.33	70.52

Table 3.

Equilibrium Data for the PEO10000 (w_{PEO}) + Sodium Succinate (w_{S}) + Water (w_{W}) system from 283.15 K to 313.15 K.

tie-line	TLL	overall			top phase			bottom phase		
		w_{PEO}	w_{S}	w_{W}	w_{PEO}	w_{S}	w_{W}	w_{PEO}	w_{S}	w_{W}
283.15 K										
1	29.20	13.01	11.09	75.90	28.55	5.86	65.04	1.05	15.67	81.65
2	33.11	14.04	11.50	74.46	31.62	5.40	62.14	0.53	16.79	81.06
3	36.27	15.11	11.90	73.00	34.35	4.97	60.01	0.42	17.78	79.80
4	39.98	16.15	12.30	71.54	37.49	4.50	57.61	0.23	19.00	78.77
5	43.55	17.25	12.77	69.98	40.62	4.06	55.21	0.10	20.01	77.63
298.15 K										
1	18.68	9.66	10.18	80.17	20.15	7.24	71.73	2.29	12.73	83.25
2	26.37	11.36	10.69	77.96	25.75	6.11	67.17	0.76	14.52	83.03
3	33.68	13.06	11.20	75.74	32.66	5.03	61.67	0.67	15.57	81.76
4	37.52	14.77	11.68	73.55	35.63	4.56	59.49	0.31	17.21	80.46
5	42.57	16.47	12.20	71.33	40.36	4.07	55.40	0.23	18.29	79.03
313.15 K										
1	33.17	9.51	10.07	80.43	32.73	4.18	62.65	0.80	13.17	84.55
2	37.69	11.28	10.69	78.02	36.85	3.76	58.93	0.64	14.21	83.61
3	41.73	13.00	11.20	75.80	40.66	3.49	55.96	0.60	15.18	82.41
4	45.92	14.70	11.70	73.60	44.44	3.03	52.19	0.57	16.60	80.87
5	49.45	16.40	12.19	71.41	47.50	2.74	49.41	0.41	17.85	78.95

Table 4.

Equilibrium Data for the PEO35000 (w_{PEO}) + Sodium Citrate (w_S) + Water (w_W) system from 283.15 K to 313.15 K.

tie-line	TLL	Overall			top phase			bottom phase		
		w_{PEO}	w_S	w_W	w_{PEO}	w_S	w_W	w_{PEO}	w_S	w_W
283.15 K										
1	20.17	9.97	8.51	81.52	18.92	5.34	76.91	0.16	12.75	87.12
2	24.41	11.44	8.98	79.58	22.52	4.58	73.78	0.11	14.25	85.83
3	28.32	13.00	9.49	77.51	25.77	3.95	70.87	0.07	15.84	84.34
4	31.37	14.49	10.01	75.50	28.29	3.60	68.46	0.06	17.29	82.84
5	34.58	16.04	10.48	73.47	30.98	3.25	66.15	0.01	18.64	81.32
298.15 K										
1	22.49	9.99	8.50	81.51	21.49	4.77	75.04	0.28	12.24	87.52
2	27.14	11.71	9.00	79.29	25.57	3.98	71.30	0.21	13.64	86.15
3	31.27	13.39	9.50	77.11	29.25	3.45	67.90	0.17	14.95	84.65
4	35.14	15.11	10.01	74.88	32.53	2.93	64.87	0.15	16.58	83.14
5	38.45	16.78	10.50	72.71	35.19	2.59	62.51	0.05	18.20	81.56
313.15 K										
1	28.53	10.07	8.46	81.47	27.21	3.24	70.03	0.19	12.39	87.35
2	32.26	11.47	9.00	79.52	30.49	2.82	66.87	0.11	13.67	86.50
3	35.33	12.96	9.49	77.55	33.15	2.55	64.22	0.04	14.87	85.27
4	38.44	14.49	10.00	75.51	35.78	2.16	62.13	0.02	16.26	83.94
5	40.74	16.02	10.48	73.50	37.59	1.94	59.88	0.01	17.68	82.54

The position of the binodal curve in phase diagram can be affected by the temperature at which the segregation process occurs [23]. In this sense, the effect of temperature on the equilibrium data has been evaluated. Figure 1 shows the effect of temperature on the phase separation for the PEO10000 + sodium tartrate + water ATPS. Tie-lines are present and were obtained by a linear regression of the corresponding sets of overall, bottom phase, and top phase concentrations. In this figure, it can be seen that the biphasic region is practically the same with increasing temperature. Similar results are observed in ATPS formed by citrate salt.

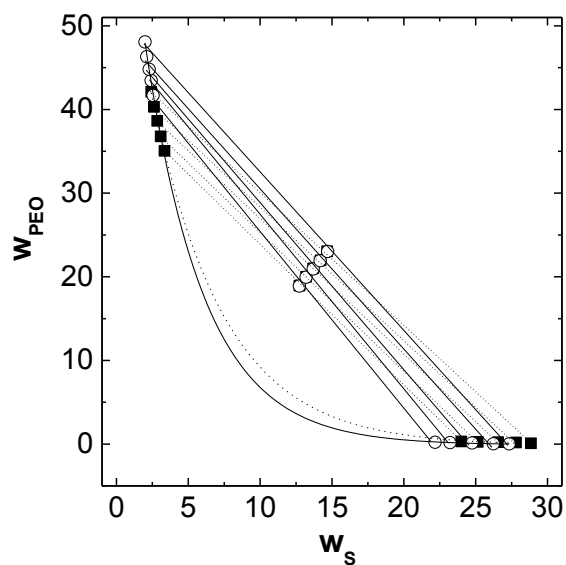


Fig. 1. Temperature effect on the phase diagram for the PEO10000 (PEO) + Sodium Tartrate (S) + Water (W) system: (filled squares and dotted lines) 283.15 K and (unfilled circles and solid lines) 313.15 K.

Figure 2 shows the effect of temperature on the phase separation for the PEO10000 + sodium succinate + water ATPS and an increase in temperature promotes a remarkable shift in biphasic region.

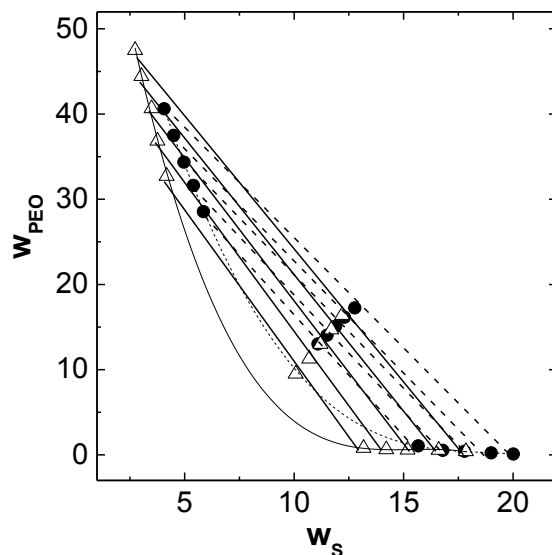


Fig. 2. Temperature effect on the phase diagram for the PEO10000 (PEO) + Sodium Succinate (S) + Water (W) system: (filled circles and dotted lines) 283.15 K and (unfilled triangles and solid lines) 313.15 K.

The increase in the biphasic region promoted by increasing the equilibrium temperature is an indication that the phase-separation process is endothermic and agrees with the idea that ATPS formation is entropically driven [24].

The temperature effect on the phase-equilibrium compositions also can be analyzed through the slopes of the tie-line (STL). The STL can be calculated according to equation 4:

$$STL = \frac{C_p^T - C_p^B}{C_s^T - C_s^B} \quad (4)$$

where C_p^T and C_p^B are the polymer concentrations (% (m/m)) in the top and bottom phase, respectively, and C_s^T and C_s^B are the corresponding salt concentrations (% (m/m)) in the top and bottom phase, respectively. STL values are reported in Table 5.

It can be noted that for all ATPS, an increase in the temperature leads to an increase in STL absolute values, and under constant temperature the STL values decrease with increasing TLL values. This behavior shows that an increase in temperature promotes the spontaneous transfer of water molecules from the top to the bottom phase [24]. In this process, the concentration of salt in the BP decreases and the concentration of polymer in the TP increases.

Figure 3 shows the influence of anions on the position of the binodal curve for ATPS formed by PEO10000 + organic salt + water. It is possible to observe the capacity of anions to promote the segregation process by the following order: citrate > tartrate > succinate. This tendency is the same in ATPS formed by PEO of low molar mass [16] or L64 copolymer [25].

Table 5.

STL values for PEO + organic salts + water ATPS at (283.15, 298.15 and 313.15) K.

tie-line	PEO10000 + Sodium Citrate		
	T / K		
	283.15	298.15	313.15
1	-2.05	-2.22	-2.44
2	-1.94	-2.21	-2.32
3	-1.87	-2.11	-2.17
4	-1.80	-2.03	-2.11
5	-1.74	-1.93	-2.09

tie-line	PEO10000 + Sodium Tartrate		
	T / K		
	283.15	283.15	283.15
1	-1.68	-1.91	-2.12
2	-1.66	-1.85	-2.08
3	-1.62	-1.82	-1.99
4	-1.59	-1.78	-1.92
5	-1.59	-1.69	-1.90

tie-line	PEO10000 + Sodium Succinate		
	T / K		
	283.15	283.15	283.15
1	-2.81	-3.27	-3.60
2	-2.73	-2.97	-3.50
3	-2.65	-3.04	-3.45
4	-2.57	-2.80	-3.25
5	-2.55	-2.83	-3.13

tie-line	PEO35000 + Sodium Citrate		
	T / K		
	283.15	283.15	283.15
1	-2.52	-2.84	-2.97
2	-2.31	-2.63	-2.81
3	-2.16	-2.53	-2.70
4	-2.06	-2.37	-2.54
5	-2.01	-2.25	-2.39

This result can be interpreted based on a model proposed by da Silva and Loh [30] which suggest that the ATPS formation process is based on the interaction and formation of electrolyte-polymer binding. First, when the salt and polymer solutions are mixed, the ions interact with the polymer, causing desolvation of the molecular chain of the polymer and entropy increase of system. Second, the interaction of the ions and polymer continues until it reaches a saturation point from which there is no increase entropy and the phase separation is favored.

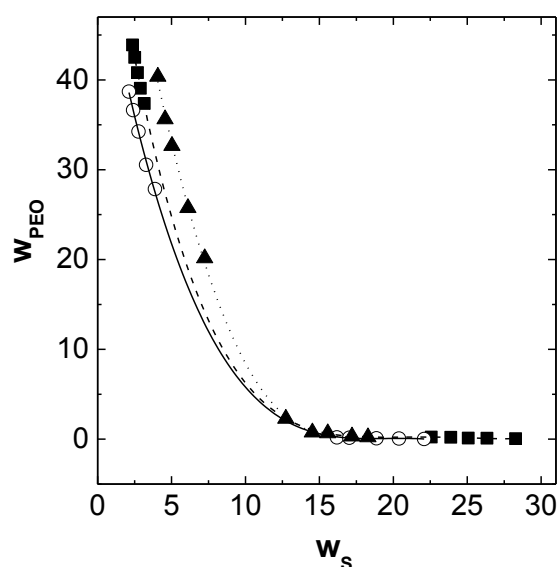


Fig. 3. Influence of anion on phase diagram for PEO10000 (PEO) + Salt (S) + Water (W) systems, at 298.15 K: (\circ) Citrate; (\blacktriangle) Succinate and (\blacksquare) Tartrate.

According to this model, as the salt-PEO interaction becomes more intense, the salt can more effectively induce phase separation. Based on this phenomenon, the interaction between PEO and the succinate anion is weaker than tartrate anion and, the citrate anion provides the strongest interaction. This is due to the higher negative charge of the citrate anion, as well as the greater number of carboxylic groups in its molecular structure making the formation of a hydrogen bond possible [16]. The biphasic region using the succinate anion is smaller than the tartrate anion and the

citrate anion produces the largest biphasic region. This can be attributed to the lack of hydroxyl groups in the succinate ion and the increasing number of hydroxyl groups between the tartrate ion and citrate ion, which favor the intermolecular interaction between the anion and PEO macromolecules.

Figure 4 shows the influence of the molar mass of poly(ethylene oxide) on the phase equilibrium in PEO + sodium citrate + water. PEO1500 + citrate sodium + water ATPS that was reported by Patricio and coworkers [16] also is presented. As can be noted, an increase in the molar mass of PEO promotes an increase of biphasic region. This effect is attributed to a decrease in the contribution of configurational entropy caused by enlargement of the molecular chain of the polymer [31].

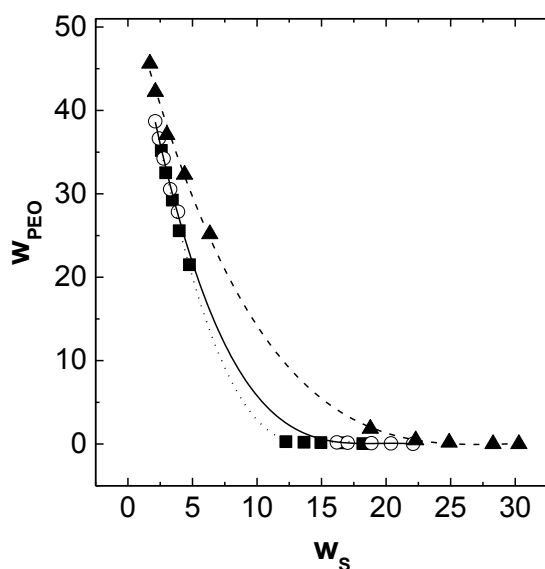


Fig. 4. Effect of molar mass of PEO on phase diagram for PEO + Sodium Citrate (S) + Water (W) systems, at 298.15 K: (▲) PEO1500, (○) PEO10000 and (■) PEO35000.

Table 6 reports the values of density and refractive index of the top and bottom phases of the ATPs studied, at 298.15 K. The magnitude of these intensive thermodynamic properties was different between the phases in equilibrium (TP and BP) and varied in both phases when TLL value increased.

Table 6.

Density (ρ) and Refractive Index (n_D) of the top and bottom phases of PEO + organic salt + water systems, at 298.15 K.

TLL	ρ (kg• m ⁻³)		n_D	
	Top phase	Bottom phase	Top phase	Bottom phase
PEO35000 + Sodium Citrate + water				
22.49	1065.943	1089.464	1.3704	1.3548
27.14	1068.680	1099.704	1.3756	1.3572
31.27	1070.548	1110.487	1.3801	1.3596
35.14	1073.424	1122.016	1.3839	1.3624
38.45	1076.197	1134.529	1.3876	1.3655
PEO10000 + Sodium Citrate + water				
30.27	1073.503	1111.605	1.3796	1.3599
33.36	1075.538	1122.865	1.3833	1.3625
37.75	1078.007	1136.211	1.3876	1.3653
40.74	1080.481	1147.419	1.3910	1.3684
43.52	1082.678	1158.626	1.3941	1.3709
PEO10000 + Sodium Tartrate + water				
41.92	1087.205	1164.264	1.3940	1.3704
44.18	1088.735	1175.937	1.3956	1.3725
46.43	1090.436	1185.187	1.3983	1.3748
48.64	1091.418	1199.969	1.4012	1.3771
50.92	1093.914	1210.938	1.4032	1.3799
PEO10000 + Sodium Succinate + water				
18.68	1087.739	1102.152	1.3785	1.3608
26.37	1090.973	1114.320	1.3861	1.3627
33.68	1093.053	1121.736	1.3905	1.3644
37.52	1096.946	1131.337	1.3958	1.3669
42.57	1100.657	1144.457	1.4012	1.3700

Figure 5 shows refractive index versus TLL and density versus TLL curves for the top and bottom phases of all ATPSs. In all systems, for both phases, the increasing of TLL values promotes an increase in density and refractive index. This is because these properties depend on the concentration of PEO and salt in the phases. The slopes of the curves of density in the bottom phase are higher than in top

phase and densities in top phase are almost independent of TLL. In contrast, refractive index versus TLL curves present similar slopes in both phases. The higher values of refractive indexes in top phase are due to the higher concentration of polymer in this phase compared to the concentration of salt in bottom phase. This difference also contributes to the molecular structure of polymer that presents a greater opposition to the propagation of light. Increasing the refractive index while increasing TLL shows that the propagation of light becomes more difficult with the increasing of concentration of the system components. These results are similar to those found by Santos and coworkers [31] in PEO1500 + thiosulfate + water ATPS.

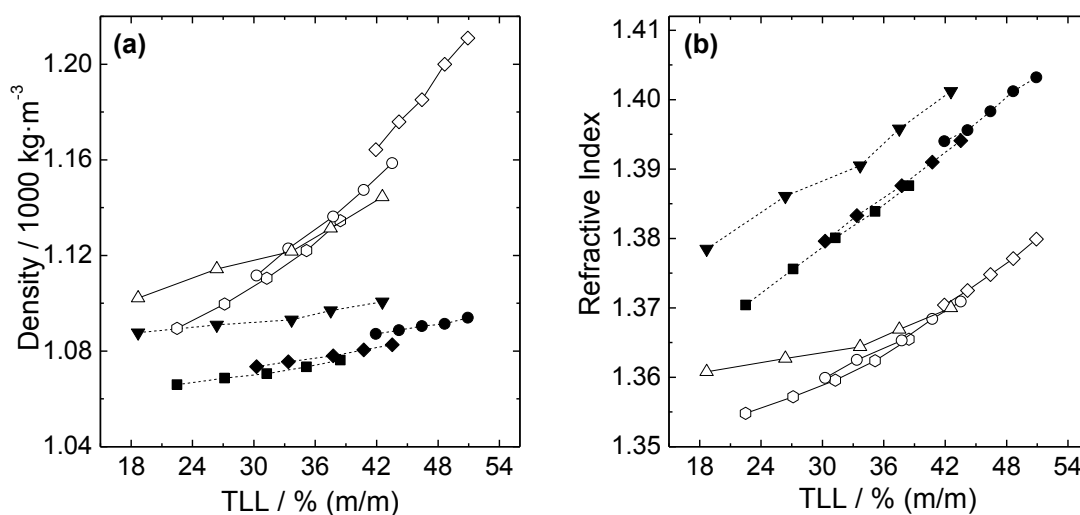


Fig. 5. (a) Density versus TLL curves and (b) Refractive index versus TLL curves for top phase ((■) PEO35000 + Sodium Citrate, (◆) PEO10000 + Sodium Citrate, (●) PEO10000 + Sodium Tartrate, (▼) PEO10000 + Sodium Tartrate) and bottom phase ((□) PEO35000 + Sodium Citrate, (◇) PEO10000 + Sodium Citrate, (○) PEO10000 + Sodium Tartrate, (Δ) PEO10000 + Sodium Tartrate) of studied ATPSs.

The reliability of the experimental tie-lines were verified through the Othmer-Tobias correlation [32]. This correlation is given by equation 5.

$$\ln\left(\frac{100 - w_{sb}}{w_{sb}}\right) = B \ln\left(\frac{100 - w_{pt}}{w_{pt}}\right) + A \quad (5)$$

where w_{sb} and w_{pt} represent the mass percentages of salt in the bottom phase and the mass percentages of polymer in the top phase, respectively, and the values of A and B are constants for an individual system at a certain temperature. The Othmer-Tobias correlation has been used by several researchers [25,28] and is measured through the linearity of the data. The constants (A and B) and the determination coefficients (R^2) are shown in Table 7. R^2 values for all systems are greater than 0.97 indicating a high degree of consistency of the experimental data.

Table 7. Othmer-Tobias constants and regression coefficients.

T/K	PEO10000 + Sodium Citrate		
	A ₁	B ₁	R ²
283.15	0.7148	0.8803	0.9995
298.15	0.9294	0.7756	0.9780
313.15	0.9530	0.9635	0.9887
T/K	PEO10000 + Sodium Tartrate		
	A ₁	B ₁	R ²
283.15	0.6260	0.8522	0.9974
298.15	0.6878	1.0678	0.9845
313.15	0.8822	1.1287	0.9864
T/K	PEO10000 + Sodium Succinate		
	A ₁	B ₁	R ²
283.15	1.1699	0.5581	0.9992
298.15	1.3388	0.4255	0.9766
313.15	1.4829	0.5767	0.9907
T/K	PEO35000 + Sodium Citrate		
	A ₁	B ₁	R ²
283.15	0.9242	0.6945	0.9962
298.15	1.1184	0.6715	0.9861
313.15	1.1247	0.8601	0.9886

4. Conclusion

Equilibrium data for PEO10000 + sodium citrate + water, PEO10000 + sodium tartrate + water, PEO10000 + sodium succinate + water and PEO35000 + sodium citrate + water ATPSs have been obtained at (283.15, 298.15 and 313.15) K using a gravimetry, conductometry and refractometry techniques.

For all systems, an increase in temperature promotes the increase in the biphasic region as well as the increase of the slope of tie-lines. This result suggests that the phase separation process is endothermic and ATPS formation is entropically driven. The capacity of an anion to induce the phase separation follows the following order: citrate > tartrate > succinate and this tendency is attributed to intensity of the salt-PEO interaction. The study of the influence of the molar mass of poly(ethylene oxide) on phase equilibrium shows that an increase in molar mass of PEO promotes an increase in the biphasic region and this result is attributed to an entropic contribution.

The reliability of the experimental equilibrium data was ascertained using the Othmer–Tobias correlation. The results were satisfactory and showed consistency in the data obtained.

5. References

- [1] J.A. Asenjo, B.A. Andrews, Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8826-8835.
- [2] S.C. Silvério, L.A. Ferreira, J.A. Martins, J.C. Marcos, E.A. Macedo, J.A. Teixeira, Lysozyme and bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol–phenylalanine conjugate polymer/salt aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilibr.* 322-323 (2012) 19-25.
- [3] D.P. de Barros, S.R. Campos, P.P. Madeira, A.M. Azevedo, A.M. Baptista, M.R. Aires-Barros, Modeling the partitioning of amino acids in aqueous two phase systems, *J. Chromatogr. A* 1329 (2014) 52-60.
- [4] P.A. Rosa, I.F. Ferreira, A.M. Azevedo, M.R. Aires-Barros, Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 2296-2305.
- [5] S.C. Silverio, O. Rodriguez, J.A. Teixeira, E.A. Macedo, Solute partitioning in polymer-salt ATPS: The Collander equation, *Fluid Phase Equilibr.* 296 (2010) 173-177.
- [6] R.D. Rogers, C.B. Bauer, Partitioning behavior of Group 1 and 2 cations in poly(ethylene glycol)-based aqueous biphasic systems, *J. Chromatogr. B* 680 (1996) 237-241.
- [7] L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, K.R. Francisco, M.V.C. Cardoso, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, PEO-[M(CN)₅NO]^{x-} (M = Fe, Mn, or Cr) interaction as a driving force in the partitioning of the pentacyanonitrosylmetallate anion in ATPS: Strong effect of the central atom, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 11669-11678.
- [8] P.D. Patricio, M.C. Mesquita, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Application of aqueous two-phase systems for the development of a new method of cobalt(II), iron(III) and nickel(II) extraction: a green chemistry approach, *J. Hazard. Mater.* 193 (2011) 311-318.
- [9] L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, J. Amin, J.P. Martins, J.S.D. Coimbra, L.A. Minim, Hydrophobic effect on the partitioning of [Fe(CN)₅(NO)]²⁻ and [Fe(CN)₆]³⁻ anions in aqueous two-phase systems formed by triblock copolymers and phosphate salts, *Sep. Purif. Technol.* 60 (2008) 103-112.

- [10] M.S.Y. Tang, P.L. Show, Y.K. Lin, K.L. Woon, C.P. Tan, T.C. Ling, Separation of single-walled carbon nanotubes using aqueous two-phase system, *Sep. Purif. Technol.*, 125 (2014) 136-141.
- [11] R.D. Rogers, H.D. Willauer, S.T. Griffin, J.G. Huddleston, Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems, *J. Chromatogr. B.* 711 (1998) 255-263.
- [12] A.B. Mageste, T.D.A. Senra, M.C.H. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.H.M. da Silva, Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts, *Sep. Purif. Technol.*, 98 (2012) 69-77.
- [13] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, P.D. Patricio, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, Aqueous two-phase systems: A new approach for the determination of p-aminophenol, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 292-298.
- [14] A. Kulaguin-Chicaroux, T. Zeiner, Novel aqueous two-phase system based on a hyperbranched polymer, *Fluid Phase Equilibr.* 362 (2014) 1-10.
- [15] R. Govindarajan, M. Perumalsamy, Phase equilibrium of PEG 2000 + triammonium citrate + water system relating PEG molecular weight, cation, anion with effective excluded volume, Gibbs free energy of hydration, size of cation, and type of anion at (298.15, 308.15, and 318.15) K, *J. Chem. Eng. Data* 58 (2013) 2952-2958.
- [16] P.D. Patricio, A.B. Mageste, L.R. de Lemos, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO+organic salts+H₂O and PPO+organic salts+H₂O aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilibr.* 305 (2011) 1-8.
- [17] M.T. Zafarani-Moattar, S. Hamzehzadeh, Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and potassium phosphate or dipotassium hydrogen phosphate at 298.15 K, *J. Chem. Eng. Data* 52 (2007) 1686-1692.
- [18] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Application of hydrophobic extractant in aqueous two-phase systems for selective extraction of cobalt, nickel and cadmium, *J. Chromatogr. A* 1279 (2013) 13-19.

- [19] F. Ruiz-Ruiz, J. Benavides, O. Aguilar, M. Rito-Palomares, Aqueous two-phase affinity partitioning systems: current applications and trends, *J. Chromatogr. A* 1244 (2012) 1-13.
- [20] J.P. Martins, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, T.D.A. Senra, G.M.D. Ferreira, J.S.D. Coimbra, L.A. Minim, Liquid-liquid phase equilibrium of triblock copolymer F68, poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide), with sulfate salts, *J. Chem. Eng. Data* 55 (2010) 1618–1622.
- [21] S.C. Silverio, O. Rodriguez, J.A. Teixeira, E.A. Macedo, The effect of salts on the liquid–liquid phase equilibria of PEG600+salt aqueous two-phase systems, *J. Chem. Eng. Data* 58 (2013) 3528-3535.
- [22] L.R. de Lemos, P.D. Patricio, G.D. Rodrigues, R.M.M. de Carvalho, M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene oxide) 1500 and different electrolytes ((NH₄)₂SO₄, ZnSO₄ and K₂HPO₄): Experimental and correlation, *Fluid Phase Equilib.* 305 (2011) 19-24.
- [23] G.D. Rodrigues, L.D. da Silva, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.M.M. de Carvalho, Phase diagrams of aqueous two-phase systems with organic salts and F68 triblock copolymer at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 55 (2010) 1158-1165.
- [24] J.P. Martins, A.B. Mageste, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, P.D. Patricio, J.S.D. Coimbra, L.A. Minim, Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 54 (2009) 2891–2894.
- [25] V.M. de Andrade, G.D. Rodrigues, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Aqueous two-phase systems of copolymer L64+organic salt+water: Enthalpic L64-salt interaction and Othmer-Tobias, NRTL and UNIFAC thermodynamic modeling, *Chem. Eng. J.* 171 (2011) 9-15.
- [26] M. Svensson, P. Linse, F. Tjerneld, Phase behavior in aqueous twophase system containing micelle-forming block copolymers, *Macromolecules* 28 (1995) 3597-3603.
- [27] L.R. de Lemos, I.J.B. Santos, G.D. Rodrigues, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da

- Silva, L.H.M. da Silva, R.M.M. de Carvalho, Phase compositions of aqueous two-phase systems formed by L35 and salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 55 (2010) 1193–1199.
- [28] I.J.B. Santos, R.M.M. de Carvalho, M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, Phase diagram, densities, and the refractive index of new aqueous two-phase system formed by PEO1500 + thiosulfate + H₂O at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 57 (2012) 274-279.
- [29] J.P. Martins, J.S.D. Coimbra, F.C. de Oliveira, G. Sanaiotti, C.A.S. da Silva, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol) 400 and sulfate salts, *J. Chem. Eng. Data* 55 (2010) 1247–1251.
- [30] L.H.M. da Silva, W. Loh, Calorimetric Investigation of the Formation of Aqueous Two-Phase Systems in Ternary Mixtures of Water, Poly(ethylene oxide) and Electrolytes (Or Dextran), *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 10069-10073.
- [31] L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, R.A.N. de Aquino, K.R. Francisco, M.V.C. Cardoso, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 23540-23546.
- [32] D.F. Othmer, P.E. Tobias, Tie line correlation, *Ind. Eng. Chem.* 34 (1942) 693-696

CAPÍTULO 3: Driving forces for chymosin partitioning on the macromolecule-salt aqueous two phase system.

ABSTRACT

Aqueous two-phase systems (ATPSs) are recognized as efficient and strategic liquid–liquid systems for extraction and purification of different compounds. However, the motriz power for the solute transfer process in ATPS is not well understood, because only a few studies have evaluated the thermodynamic parameters that allow comprehension of the partition process. Here, we investigated the chymosin (Chy) partitioning behavior in macromolecule + salt + H₂O ATPSs by obtaining the partition coefficient (K), free energy change of transfer ($\Delta_{tr}G^o$), enthalpy change of transfer ($\Delta_{tr}H_{Cal}^o$), and entropy change of transfer ($\Delta_{tr}S_{Cal}^o$), and their dependence on the ATPS properties. Chy transfer from the bottom to the top phase of the ATPS was enthalpically driven, with $-4.84 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{tr}H_{Cal}^o < -170.34 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $-11.69 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1} < \Delta_{tr}S_{Cal}^o < -558.95 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ characterizing an enthalpy–entropy compensation process; $-1.36 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{tr}G^o < -3.77 \text{ kJ mol}^{-1}$. The value of $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ became more negative as the tie line length increased, showing that specific macromolecule–Chy interactions determine the enzyme concentration in the ATPS top phase. The nature of the cation/anion, hydrophobic/hydrophilic balance of the top phase, and macromolecule molar mass influence the intermolecular interaction between Chy and top phase components, changing the enzyme partition behavior. Negative $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ parameters were attributed to the Chy transfer from a higher (bottom phase) to the lower (top phase) configurational entropy region.

1. Introduction

Aqueous two-phase systems (ATPSs) are recognized as efficient, economic, and environmentally safe liquid–liquid systems for extraction and purification of a great number of solutes, such as metals^{1,2}, proteins³, enzymes^{4,5}, genetic material⁶, natural dyes^{7,8}, cells⁹, nanoparticles¹⁰, and carbon nanotubes^{11,12}. However, the driving forces that determine the partitioning behavior of the solutes in these ATPSs are not very well understood, mainly because there are few thermodynamic studies describing the motriz power for solute distribution in both ATPS phases. To optimize the application of the ATPSs in the purification of solutes, it is important to develop a systematic thermodynamic approach, from a theoretical and experimental point of view, to determine the intermolecular interactions responsible for the solute transfer process in these systems.

Theoretical models explaining the solute distribution in ATPS are derived mainly from the Flory-Huggins theory, and use a thermodynamic statistical approach to determine how the transfer thermodynamic parameters depend on the ATPS properties¹³, such as the tie line length (TLL), pH, and temperature. Madeira et al.¹⁴ used a mathematical function (linear solvation energy relationship) to describe the solute–solvent interactions that govern solute transfer. Other authors, such as Berggren et al.¹⁵, used a linear function associated with the protein surface hydrophobicity and/or to electrostatic contribution to describe the protein ATPS component interaction within this approach, to determine biopolymer partition behavior. Johansson et al.¹⁶ have proposed a model that describes the ATPS solute transfer process in terms of an entropic and enthalpic contribution to the solute partition coefficient values, allowing an understanding of the motriz power that drives the distribution process of different species in ATPSs. However, this semi-

qualitative model constitutes only a guide to a better realization of the intermolecular interactions governing partitioning behavior of the solute in those systems. To confirm and/or to improve these theoretical models, obtaining the experimental thermodynamic parameters of transference, such as $\Delta_{tr}G^o$, $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$, and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$, for different solutes in distinct ATPSs is fundamental, however there are few systematic studies determining the thermodynamics of the transfer process of solutes in ATPS. Da Silva et al.¹⁷ used the van't Hoff approximation to determine $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ for $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ions in ATPSs formed by triblock copolymers and phosphate salts, showing that the transfer process for these anions is exothermic and enthalpically driven ($\Delta_{tr}S_{vH}^o < 0$). Like those inorganic complexes, biological solutes, such as the glutenin protein from flour¹⁸, partitioned in ATPSs of poly(ethylene oxide) (PEO) + sulfate salts + H₂O release enthalpic energy during the transfer processes, with $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ values between -21.39 and -16.21 kJ mol⁻¹. However, exothermicity of biopolymer transfer processes is not a general trend. For example, Pico and coworkers¹⁹⁻²¹ reported three studies of chymosin (Chy) partition in a PEO + phosphate salt + H₂O ATPS. The authors finding in two of these papers that the enzyme partition is endothermic, with $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ values between 32 kJ mol⁻¹ and 96 kJ mol⁻¹, concluding that the Chy partitioning in this ATPS is entropically driven.

Isothermal titration microcalorimetry is the only technique capable of directly determining the change of transfer enthalpy ($\Delta_{tr}H_{Cal}^o$), and various papers report a discrepancy between the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ values for various thermodynamic process²². For the ATPS solute transfer process specifically, da Silva et al.²³ determined the $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ and $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ values of pentacyanonitrosylmetalate complexes ($[\text{M}(\text{CN})_5\text{NO}]^{3-}$, where M = Fe, Mn, Cr), showing that a great difference exists

between the two methodologies, where the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ decreases and $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ is practically constant with increasing TLL. Thus, it is important to measure the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ values for biopolymers, and to compare their values with $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ results found in literature. Chy (EC 3.4.23.4) can be used as a model biopolymer for this purpose. Chy is a neonatal gastric aspartic proteinase important in the cheese industry²⁴. This enzyme is obtained from bovine calf stomachs or by the gene chymosin cloned and expressed in suitable bacteria. It causes the rupture of the Phe 105 – Met 106 bond of *k*-casein, generating two carbon chains; one chain is a portion of the insoluble N-terminal casein (cheese) and the other is the C-terminal casein that is soluble in solution²⁵. Many studies have described the structure, conformation, and stability of Chy in solution. It has a molar mass equal to 36000 g mol⁻¹, with 323 amino acid units structured in a globular form. It is stable at pH values between 5.3 and 6.3. At pH values lower than 3, Chy loses its activity, and at pH above 9.8, an irreversible conformational change occurs^{20,26,27}.

The aim of this paper is to discover the motriz power for Chy partitioning in a macromolecule (PEO or Copolymer) + electrolyte (organic or inorganic salts) + H₂O ATPS, determining Chy thermodynamic parameters ($\Delta_{tr}G^o$, $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$) and their dependence on the following ATPS properties; i.e., TLL values, cation and anion structure, hydrophobic/hydrophilic balance, and the molar mass of the macromolecule.

2. Experimental section

2.1 Materials

PEO, with a molar mass of 1500 g mol^{-1} was purchased from Synth (Brazil). PEO with molar masses of 10000 g mol^{-1} and the triblock copolymer F68 with a molar mass equal to 8400 g mol^{-1} were purchased from Aldrich (Germany). The organic salts sodium tartrate (TartNa; $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 99.5%), and sodium citrate (CitNa; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 99.0%), and the inorganic salts sodium sulfate (Na_2SO_4 ; 99.0%) and lithium sulfate (Li_2SO_4 ; 99.0%) were all purchased from Vetec (Brazil). Chy was obtained from DSM (99.0%). All chemicals were used without further purification. Distilled water was used to prepare all aqueous solutions.

2.2 Determination of chymosin partition coefficient

Chy partition coefficients were determined as follows. ATPSs with a desired global composition and a total mass of 5.00 g were prepared by mixing stock solutions of a polymer (or copolymer) and a salt. The global compositions of the ATPSs (PEO 1500 + sodium tartrate + H_2O , PEO 1500 + sodium citrate + H_2O , PEO 1500 + sodium sulfate + H_2O , PEO 1500 + lithium sulfate + H_2O , PEO 10000 + sodium citrate + H_2O and F68 + sodium citrate + H_2O) were obtained from phase diagrams reported in the literature²⁸⁻³⁰. At least four different global compositions were chosen from each phase diagram. The stock solutions were mixed with 50 μL of Chy, and the obtained systems were stirred. The system was allowed to equilibrate for 24 h in a temperature controlled bath (Microquimica, MQBTC 99-20, $298.15 \pm 0.1 \text{ K}$). Aliquots of the top and the bottom phases were collected with a syringe, and adequately diluted with distilled water for a spectrophotometric analysis at 260 nm

using a Shimadzu digital double beam spectrometer (UV-2550). The Chy partition coefficient (K) was calculated using the following equation:

$$K = \frac{(Abs_{260\text{ nm}}^T) \cdot (fd^T)}{(Abs_{260\text{ nm}}^B) \cdot (fd^B)} \quad (1)$$

where $Abs_{260\text{ nm}}^T$ and $Abs_{260\text{ nm}}^B$ are the absorbances of the diluted top phase and the diluted bottom phase, respectively, discounting the absorbances of the corresponding blanks, and fd^T and fd^B are the dilution factors of the phases.

K was studied for different TLL values of each ATPS investigated. The TLL numerically expresses the difference in the intensive thermodynamic functions between the top and the bottom phases, at constant pressure and temperature. It is calculated using equation 2:

$$TLL = \left[(C_p^T - C_p^B)^2 + (C_s^T - C_s^B)^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

where C_p^T and C_p^B are the polymer concentrations in the top and bottom phases, respectively, and C_s^T and C_s^B are the corresponding salt concentrations in the top and bottom phases, respectively.

2.3 Thermodynamic parameters of chymosin transfer

2.3.1 Chymosin transfer Gibbs free energy change ($\Delta_{tr}G^o$)

The transfer Gibbs free energy change ($\Delta_{tr}G^o$) is the molar Gibbs free energy change associated with the transfer of Chy from the bottom phase to the top phase of

the ATPS. This thermodynamic parameter was calculated from values of the Chy partition coefficient of all TLL values using the equation 3:

$$\Delta_{tr}G^o = -RT \ln K \quad (3)$$

where R is the real gas constant, T is the absolute temperature, and K is the Chy partition coefficient.

2.3.2 Chymosin transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H_{Cal}^o$)

The $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ value for each ATPS studied was determined by isothermal titration calorimetry (ITC) measurements using a microcalorimeter CSC-4200 (Science Corp. Calorimeter). The $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ values were obtained after three titration experiments. Aliquots containing 0.90 mL of the top and the bottom phase were first added to the reference and sample cells of the microcalorimeter. Five injections of 5 μL of Chy 1.50 mmol L⁻¹ prepared in the bottom phase were then titrated into the sample cell. A gastight Hamilton syringe (250 μL) controlled by an instrument was utilized for the injections, and a stirrer helix stirring at 300 rpm was used throughout the experiment. The flow of energy registered during the whole process was recorded as a power versus time curve, which was integrated to obtain the heat flow associated to the enthalpy change of each system ($\Delta_{ob}H_{T-B}$). To discount the energy associated with friction effects ($\Delta_{ob}H_f$), a similar procedure was performed by titrating the bottom phase in the absence of the enzyme in the sample cell containing the ATPS. Additionally, the energy associated with dilution effects ($\Delta_{ob}H_{dil}$) was determined by filling the reference and the sample cells with 1.80 mL of the bottom phase and titrating the solution with five injections of 5 μL of Chy 1.50 mmol L⁻¹ prepared in

the bottom phase. The $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ values were then calculated by using the following relationship:

$$\Delta_{tr}H_{Cal}^o = \frac{\Delta_{ob}H_{t-b} - \Delta_{ob}H_{dil} - \Delta_{ob}H_f}{n} \quad (4)$$

where n is the amount of Chy transferred from the bottom to the top phase after each injection.

2.3.3 Chymosin transfer entropy change ($\Delta_{tr}S_{Cal}^o$)

The $\Delta_{tr}S^o$ values were determined through the classic thermodynamic relationship:

$$\Delta_{tr}G^o = \Delta_{tr}H_{Cal}^o - T\Delta_{tr}S_{Cal}^o \quad (5)$$

where $\Delta_{tr}G^o$ and $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ are values already known.

2.4 Dilution enthalpy change for the infinite dilution condition

The dilution enthalpy change of Chy for the infinite dilution condition ($\Delta_{dil,chy}H^\infty$) was determined in different solvents using ITC. A 2.97 mmol L⁻¹ Chy solution was diluted titrating 5 μ L aliquots of the Chy solution in 2.70 mL of solvent in the sample cell of the calorimeter. The solvents utilized were pure water, 0.72 mol L⁻¹ aqueous citrate solution, 0.72 mol L⁻¹ aqueous tartrate solution, the top phase of the PEO 1500 + tartrate + water [TLL = 34.95% (w/w)] system, and the top phase of the PEO 1500 + citrate + water [TLL = 36.54% (m/m)] system. The molar enthalpy changes (ΔH_{obs}) were plotted as a function of the Chy concentration ([Chy]), and the $\Delta_{dil,chy}H^\infty$ values were calculated extrapolating [Chy] to zero. A similar procedure

was used to determine the dilution enthalpy change for infinite dilution of citrate, tartrate, and PEO in pure water.

3. Results and discussion

3.1 Chymosin partition behavior

To evaluate the potential application of ATPSs for the extraction and purification of Chy, and to determine the motriz power of this preferential transfer process, it is necessary to study the enzyme partition behavior in these systems in addition to obtaining the change in Gibbs free energy for Chy transfer, $\Delta_{tr}G^o$. Fig. 1 shows K and $\Delta_{tr}G^o$ values versus TLL for the ATPS comprising PEO 1500, Li_2SO_4 , and H_2O at 298.15 K. As the TLL increased, the difference in intensive thermodynamic properties between the top and bottom ATPS phases became enlarged tunneling the solute transfer.

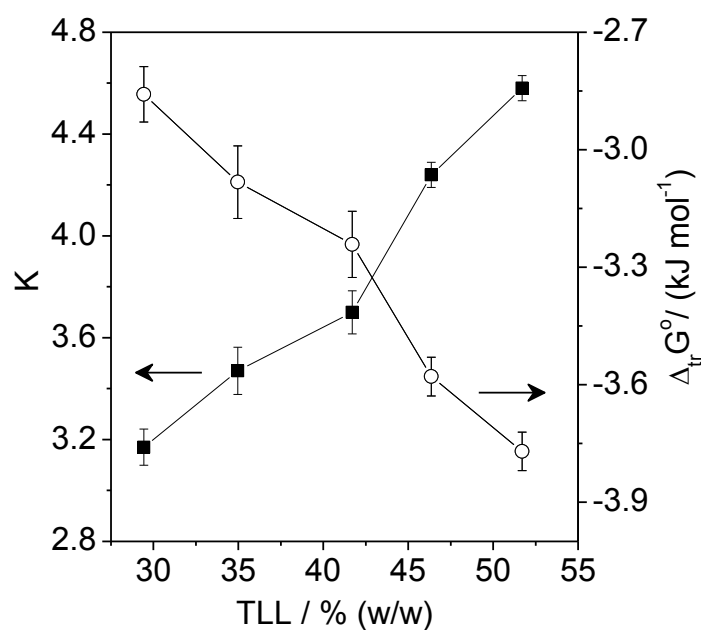


Fig. 1. Chymosin partition behavior in the PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O ATPS: (■) partition coefficient, K , and (○) $\Delta_{tr}G^o$.

Chy is distributed unevenly between the ATPS phases, with concentrations three to five times greater in the top phase than in the bottom phase. K increased almost linearly with increasing TLL, showing that the greater the difference in phase composition, the more Chy moves to the polymer-rich phase. The $\Delta_{tr}G^o$ value calculated from the classical relationship ($\Delta_{tr}G^o = -RT \ln K$) ranged from -2.86 ± 0.10 to -3.77 ± 0.05 kJ mol⁻¹, decreasing almost linearly with the increase in TLL. The $\Delta_{tr}G^o$ values express the free energy change of the system when one mole of Chy is transferred from the bottom phase to the top phase. In the PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS, the $\Delta_{tr}G^o$ values are low, suggesting that there is not a chemical reaction or a substantial conformational change in Chy during partitioning processes, showing that does not occur Chy denaturation in the transfer process. To understand the driven forces governing the Chy partition process it is necessary to determine the enthalpic and entropic contributions to the $\Delta_{tr}G^o$ values. Fig. 2 shows the Chy transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H_{Cal}^o$) and the Chy transfer entropy change ($\Delta_{tr}S_{Cal}^o$) versus TLL for PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS.

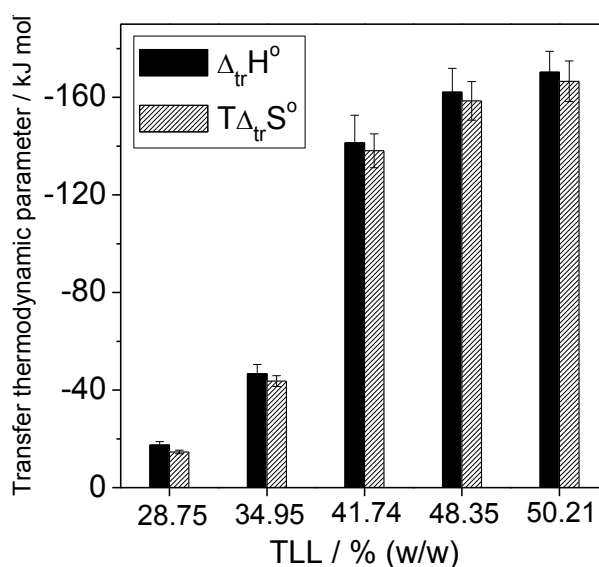


Fig. 2. Enthalpic and entropic contributions for chymosin partition in the PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS.

While the $\Delta_{tr}G^o$ values are low, the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ values have almost the same magnitude as $T\Delta_{tr}S_{Cal}^o$, and the partition process occurs with an enthalpic-entropic compensation. Both the enthalpic and entropic transfer parameters are negative, and their values decrease as the TLL values increase, showing that the Chy transfer process is enthalpically driven. To the best of our knowledge, these results are the first direct enthalpic measurement of the Chy transfer process in an ATPS. Spelzini and coworkers^{19,20} used the van't Hoff approximation to determine the Chy transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H_{vH}^o$) in the ATPS formed by PEO (molar mass of 1450, 3350, and 6000 g mol⁻¹) + potassium phosphate + H₂O or diblock copolymer PEO-PPO (molar mass of 8400 g mol⁻¹) + maltodextrin + H₂O, and reported values of that parameter ranging from 32 kJ mol⁻¹ to 96 kJ mol⁻¹. These endothermic values were attributed to the breaking of intermolecular water-enzyme and macromolecule-water interactions when the enzyme is transferred from the bottom phase to the top phase. In addition, the authors concluded that Chy partitioning in these ATPSs is entropically driven. Despite the difference between the ATPSs used here and in the previous studies^{19,20}, our thermodynamic results lead to distinct conclusions with respect to the mechanisms involved in the Chy partition in ATPSs. In general, the van't Hoff and calorimetric enthalpies of transference are different in magnitude and/or signal. For instance, da Silva et al.²³ found $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ values ranging from -101 kJ mol⁻¹ to 7 kJ mol⁻¹, and $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ values between -28 kJ mol⁻¹ and 7 kJ mol⁻¹ for the partition of pentacyanonitrosylmetalate anions in the PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O ATPS. The authors attributed the differences obtained between $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ and $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$

values to changes in the entropic state of the system when the transfer process occurs. When $\Delta_{tr}H_{vH}^o = \Delta_{tr}H_{Cal}^o$, the transfer process is considered to be a two-state process in which the entropic difference is great and finite. Conversely, when $\Delta_{tr}H_{vH}^o \neq \Delta_{tr}H_{Cal}^o$, the transfer process is considered to take place in a sequence of multistep processes, occurring between consecutive states with a very small entropy difference^{31,32}. The Chy partition probably occurs in a multistep process associated with the conformational changes of both the enzyme and the ATPS-macromolecule, the molecular dehydration of ATPS components, aggregate formation, and water transfer between the ATPS phases.

To understand the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ values from a molecular view point, we have interpreted all of these thermodynamic parameters through a molecular model developed by Johansson et al.¹⁶ These authors have suggested that the partition process of a solute in ATPS can be divided into entropic and enthalpic contributions to the K values, and demonstrated that the entropic contribution to the Chy partition can be expressed by equation 6.

$$\ln K_N = \frac{M_{Chy}}{\rho} \left(\frac{n^T}{V^T} - \frac{n^B}{V^B} \right) \quad (6)$$

where n^T and n^B are the total number of molecules in the top and bottom phase, respectively, M_{Chy} is Chy molar mass, ρ is the number of lattice sites per unit volume, and V^T and V^B are the volumes of the top phase and bottom phase, respectively. According to equation 6, when the entropy is the solely responsible for the solute transfer; i.e., the system entropy increases during the partition process; the solute will concentrate in the phase with the higher molecular numerical density. The

phase diagram of the PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS shows that the numerical density in the bottom phase is higher than that in the top phase, mainly due to the greater number of water molecules found in the phase with lower density³⁰. Thus, based on Johansson's model, the configurational entropic contribution should cause Chy to be spontaneously concentrated in the bottom phase, producing *K* values between 0 and 1. However, as the Chy partitioning coefficient in the PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS ranged between 3 and 5, the enzyme transfer should be driven by the intermolecular interaction contribution; i.e., the enthalpic contribution (negative enthalpic change). In addition, the TLL increase promotes an increase in the *K* values, which is a partitioning behavior that is contrary to an entropically driven transfer process. This result is opposite to that in the entropically driven Chy transfer process, because as TLL values increase the difference in water concentration between the bottom phase and top phase is enlarged, making the Chy transfer process less entropically favorable. Thus, we can conclude that the Chy partition process must be enthalpically driven, as showed by the negative $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ obtained in this work (contrary to the $\Delta_{tr}H_{vH}^o$ reported by Spelzini). The enthalpy contribution to *K* values in Johansson's model is described by equation 7.

$$\ln K = \frac{M_{Chy}}{RT} \left[\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{iQ} + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^T \Phi_i^T - \Phi_i^B \Phi_i^B) w_{ij} \right] \quad (7)$$

where Φ_i^T and Φ_i^B are the volume fraction of component *i* [*i* = W (water), M (macromolecule), or S (salt)] in the top and in the bottom phases, respectively, and w_{ij} and w_{ichy} are the energies of effective potential pair (*i*-*j* pair and *i*-Chy pair).

The term $\sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^T \Phi_i^T - \Phi_i^B \Phi_i^B) w_{ij}$ represents the net energy absorbed or released when Chy is transferred from the bottom phase to the top phase due to a closed-cavity process in the bottom phase (Chy move-out) and an open-cavity process in the top phase (Chy move-in). This net energy difference does not consider the interactions between Chy and the ATPS components. It essentially arises from the molecular interactions that occur between the bottom phase components and the molecular interactions broken between top-phase components when the enzyme is transferred. Its value depends on the solute molecular volume and makes little contribution to K values, as shown by da Silva et al.³³ Therefore, the term $\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{ichy}$ should determine the Chy partition in the ATPS.

The term $\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{ichy}$ expresses Chy partitioning in the ATPS, and is the principal contribution to the $\Delta_{tr} H_{Cal}^o$ parameter, because it represents the difference in energy between Chy-top phase components and Chy-bottom phase components interactions. According to this term, the negative $\Delta_{tr} H_{Cal}^o$ values (Fig. 2) indicate that the interactions between the Chy-top phase components are more enthalpically favorable than those of the Chy-bottom phase components. Since water is the major component in both phases, it is reasonable to think that the Chy hydration shell is not greatly changed by the enzyme partitioning. Thus, these $\Delta_{tr} H_{Cal}^o$ values should be attributed to the difference between the Chy–macromolecule interactions and the Chy–salt interaction, showing that the energy of the effective potential pair that is predominant in the top phase ($w_{chymosin-M}$) is more intense (i.e., more negative, or less positive) than the energy of the potential pair that is predominant in the bottom phase (w_{Chy-S}). Furthermore, as TLL values

increase, the terms $(\Phi_M^T - \Phi_M^B)$ and $(\Phi_S^T - \Phi_S^B)$ increase, making the enzyme transfer process more enthalpically favorable.

The same analyses applied to the Chy transfer process in the PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O ATPS discussed above will be applied to Chy transfer process in others ATPS investigated in this work.

3.2 Cation effect on chymosin partition behavior

The Chy K value and its dependence on the TLL values are affected by the nature of the ATPS electrolyte. Fig. 3 shows the K and $\Delta_{tr}G^o$ values plotted against TLL for the ATPS comprising PEO 1500 and different sulfate salts (Na_2SO_4 and Li_2SO_4) at 298.15 K.

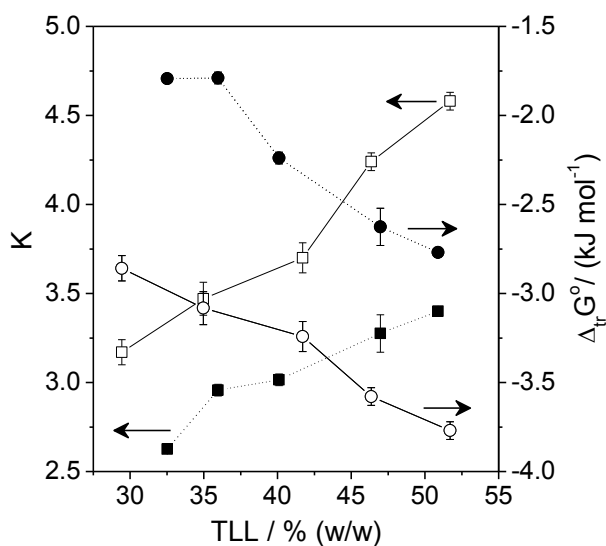


Fig. 3. Cation effect on K (squares) and $\Delta_{tr}G^o$ (circles) values for the chymosin partition in the PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O (open symbols) and PEO 1500 + Na_2SO_4 + H_2O (closed symbols) ATPSs, at 298.15 K.

The capacity of Li_2SO_4 salt to promote Chy transfer from the bottom phase to the top phase is higher than that of Na_2SO_4 salt. Since the anion of these salts is the same, we can attribute this salt effect on the Chy partitioning to the cation. The same cation effect ($K_{\text{Li}_2\text{SO}_4} > K_{\text{Na}_2\text{SO}_4}$) was observed in the partitioning of other solutes in ATPSs, e.g. caseinomacropptide³⁴, glutenin flour protein¹⁸, ovomucoid³⁵, carmine dye³⁶, and $[\text{M}(\text{CN})_5\text{NO}]^{-3}$ (M=Fe, Mn, Cr) anions²³. However, this trend has not previously been observed in Chy partitioning, since only three studies have applied ATPSs for Chy extraction, and each used only potassium phosphate salts ($\text{K}_2\text{PO}_4/\text{KHPO}_4$) as the electrolyte¹⁹⁻²¹.

The cation effect on the K values of Chy can be explained considering the model proposed by da Silva and Loh to describe the formation process of an ATPS³⁷. According to these authors, the determination of the enthalpy change of interaction between cation (M^+) and PEO segments ($\Delta_{\text{int}}H_{\text{M}^+ - \text{EO}}^o$) allows the following molecular mechanism for the splitting of phases in ATPS to be proposed. When an aqueous salt solution is mixed with an aqueous polymer solution, an intermolecular interaction between the cation and the ethylene oxide groups of the polymer occurs, which is entropically driven ($\Delta_{\text{int}}H_{\text{M}^+ - \text{EO}}^o > 0$) due mainly to the release of water molecules solvating the interacting particles. This electrolyte-polymer binding occurs until saturation of the polymer surface, after which no further entropy gain by the water release process is possible. In order to decrease the Gibbs free energy of the system, a separation producing a top phase enriched with polymer chains adsorbed by cations (pseudopolycation species) must occur. The authors have showed that lithium has a higher capacity to generate positive charge density on the PEO molecular chain than sodium.

As the enzyme partition experiment was performed with pH values of between 6 and 7, Chy (pI = 4.6) had a negatively charged globular structure³⁸, which favored its electrostatic molecular interaction with the pseudopolycation found in the polymer-rich phase (positively charged). As the strength of the Chy-PEO interaction is proportional to the pseudopolycation charge density, the K values depend only of the nature of the cation, with $K_{Li_2SO_4} > K_{Na_2SO_4}$ (Fig. 3a). The difference in the Gibbs free energy of transference caused by the cation ($\Delta\Delta_{tr}G_{CN}^o = \Delta_{tr}G_{Li}^o - \Delta_{tr}G_{Na}^o$), is around only -1.0 kJ mol^{-1} for all values of TLL. However, the cation effect on the values of $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ is pronounced, as can be seen in Fig. 4, which shows these thermodynamic parameters plotted against TLL for the ATPS comprised of PEO 1500 and different sulfate salts (Na_2SO_4 and Li_2SO_4) at 298.15 K.

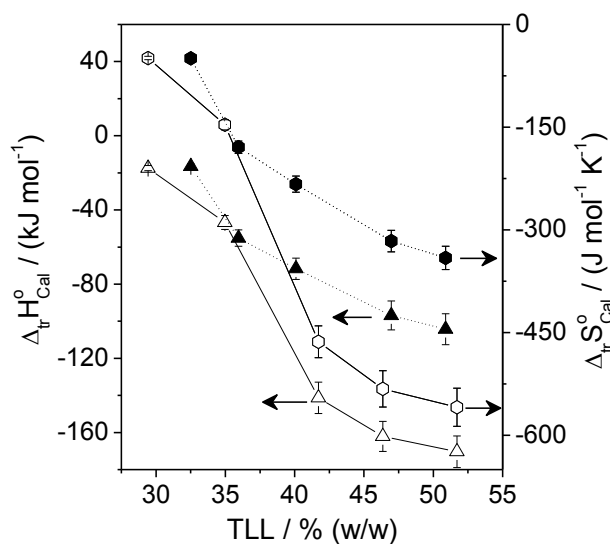


Fig. 4. Cation effect on the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ (triangle) and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ (hexagon) values for the chymosin partition in the PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O (open symbols) and PEO 1500 + Na_2SO_4 + H_2O ATPSs (close symbols), at 298.15 K.

The $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ values are negative, decreasing in magnitude with increasing TLL, showing that for both ATPSs the Chy transfer process is enthalpically driven. In addition, for all TLL values, $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ are more negative in the ATPS formed by Li_2SO_4 than that formed by Na_2SO_4 , demonstrating that Chy- Li^+ pseudopolycondensation interaction is more enthalpically intense than the Chy- Na^+ pseudopolycondensation interaction. The difference in enthalpy caused by replacing Li^+ with Na^+ ($\Delta\Delta_{tr}H_{CN}^o = \Delta_{tr}H_{Li}^o - \Delta_{tr}H_{Na}^o$) is dependent on the TLL value, varying from -1.00 ± 0.05 to $-66.00 \pm 4.60 \text{ kJ mol}^{-1}$, showing that the cation effect on the Chy- M^+ pseudopolycondensation interaction increases as the salt and polymer concentrations increase in the ATPS.

Regarding to $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ values, the Johansson model predicts that the decrease in the entropy of the system promoted by Chy transfer from the higher density phase to the lower density phase should be due to the small configurational entropy of the top phase caused by its lower water content. However, the difference in the water concentrations between the ATPS phases is similar for the $\text{PEO 1500} + \text{Li}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ and $\text{PEO 1500} + \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ systems, which negates the configurational entropy difference as the explanation for the more negative $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ in Li^+ ATPSs than in Na^+ ATPSs. This cation effect on the $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ values should probably be attributed to the greater strength of the Chy- Li^+ pseudopolycondensation interaction compared to the Chy- Na^+ pseudopolycondensation interaction, which causes two molecular processes to occur more intensively: firstly, the decrease of the degree of translational freedom for both enzyme and PEO; and secondly, the conformational change of the PEO from a random coil structure to more linear conformation.

3.3 Anion effect on the chymosin partition behavior

In order to determine the relative cation/anion contributions to the Chy transfer process in ATPSs, we also have evaluated the anion effect on the thermodynamic parameters associated with the Chy extraction process. Fig. 5a shows plots of K and $\Delta_{tr}G^o$ versus TLL, while Fig. 5b shows the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ parameters versus TLL for the PEO 1500 + TartNa + H₂O and PEO 1500 + CitNa + H₂O ATPSs.

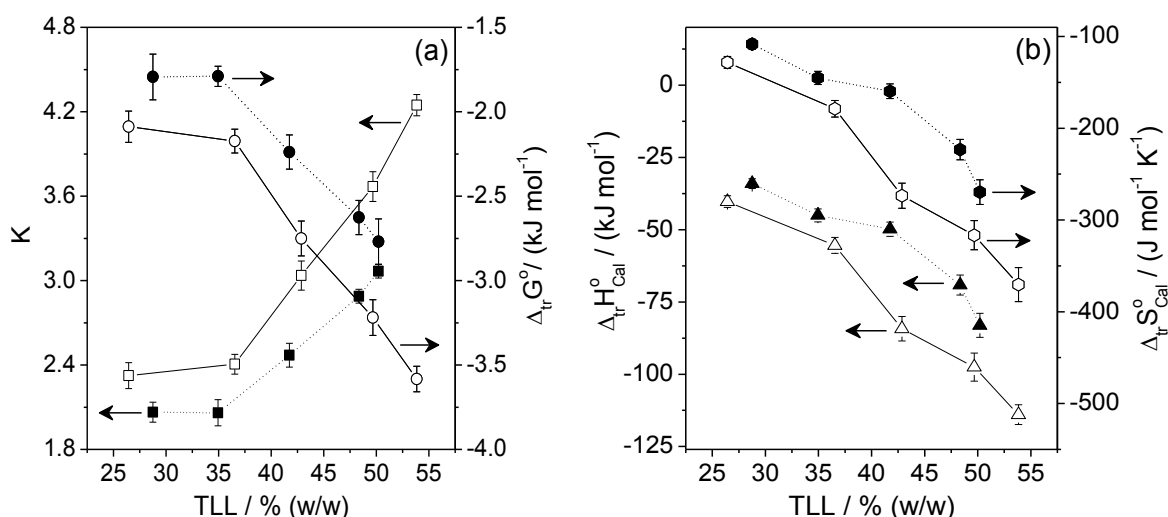


Fig. 5. Anion effect on the thermodynamic parameters of transference of chymosin in the PEO 1500 + TartNa + H₂O (closed symbols) and PEO 1500 + CitNa + H₂O (open symbols) ATPSs, at 298.15 K. (a) partition coefficient, K (squares) and $\Delta_{tr}G^o$ (circles); (b) $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ (triangles) and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ (hexagons).

The anion effect on the difference in the Gibbs free energy of Chy transfer ($\Delta\Delta_{tr}G_{AN}^o = \Delta_{tr}G_{Cit}^o - \Delta_{tr}G_{Tart}^o$) has the same magnitude to that found for the cation effect, approximately -1.0 kJ mol^{-1} for all values of TLL. Meanwhile, the anion effects on the differences in the enthalpy of Chy transfer ($\Delta\Delta_{tr}H_{AN}^o = \Delta_{tr}H_{Cit}^o - \Delta_{tr}H_{Tart}^o$) and entropy of Chy transfer ($\Delta\Delta_{tr}S_{AN}^o = \Delta_{tr}S_{Cit}^o - \Delta_{tr}S_{Tart}^o$)

are smaller than those of the cation effect; i.e., $(\Delta\Delta_{tr}H_{CN}^o = \Delta_{tr}H_{Li}^o - \Delta_{tr}H_{Na}^o > \Delta\Delta_{tr}H_{AN}^o = \Delta_{tr}H_{Cit}^o - \Delta_{tr}H_{Tart}^o)$ and $(\Delta\Delta_{tr}S_{CN}^o = \Delta_{tr}S_{Li}^o - \Delta_{tr}S_{Na}^o > \Delta\Delta_{tr}S_{AN}^o = \Delta_{tr}S_{Cit}^o - \Delta_{tr}S_{Tart}^o)$.

The increase in TLL promotes an increase in the K values and makes the $\Delta_{tr}G^o$, $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$, and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ values more negative. The thermodynamic parameters of Chy transfer for citrate ATPSs are more negative than those for tartrate ATPSs. As observed for the cation effect, $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ was negative, which makes enthalpy decrease the motriz power of Chy partition in the PEO 1500 + TartNa + H₂O and PEO 1500 + CitNa + H₂O ATPS.

Thus, to gain a better understanding of the anion effect, it is necessary to analyze the molecular interactions that drive the Chy distribution in both ATPS phases. We can consider that the magnitude of $\Delta_{tr}H^o$ arises from different interaction process, as showed by equation 8.

$$\Delta_{tr}H^o = \Delta_{Chy-S}H^o + \Delta_{w-S}H^o + \Delta_{Chy-Mac}H^o + \Delta_{w-Mac}H^o \quad (8)$$

where $\Delta_{i-j}H^o$ is the enthalpy change associated with the interaction between components i and j . Components i and j can be W, S, Mac or Chy, representing water, salts (cation and anion), macromolecules and Chy, respectively. When the enzyme is transferred from the bottom phase to the top phase, salt-Chy and macromolecule-water intermolecular interactions must be broken in the bottom and the top phase, respectively (endothermic process). Consequentially, the $\Delta_{w-Mac}H^o$ and $\Delta_{Chy-S}H^o$ terms contribute to positive $\Delta_{tr}H^o$ values. Conversely, because Chy-macromolecule interactions in the top phase and salt-water interactions in the bottom

phase are formed (exothermic processes), the $\Delta_{w-s}H^o$ and $\Delta_{Chy-Mac}H^o$ terms are negative and contribute to a more negative $\Delta_{tr}H^o$. Thus, negative values of $\Delta_{tr}H^o$ in the anion effect arise because $(|\Delta_{w-s}H^o + \Delta_{Chy-Mac}H^o|) > (|\Delta_{Chy-s}H^o + \Delta_{w-Mac}H^o|)$.

The relative magnitudes of $\Delta_{tr}H^o$ for Chy partitioning in the citrate and tartrate ATPSs should be analyzed considering that when citrate is exchanged for tartrate, the interactions involved in the Chy partition are modified and the relative contribution of each term in equation 8 is altered. In order to determine the magnitudes of the enthalpy change showed in the equation 8, we have measured the change in the enthalpy of dilution of Chy, salt, and macromolecule in different solvents by using an isothermal titration calorimeter.

With experiments that measure the solute dilution enthalpy change ($\Delta_{dil}H$) in different “solvents” it is possible to determine $\Delta_{Chy-citNa}H^o$, $\Delta_{Chy-tartNa}H^o$, $\Delta_{w-citNa}H^o$, $\Delta_{w-tart}H^o$, $\Delta_{Chy-Mac(tartNa)}H^o$, $\Delta_{Chy-Mac(CitNa)}H^o$, and $\Delta_{Chy-Mac}H^o$. At the limit of the $\Delta_{dil}H$ versus solute (Chy or salt or macromolecule) concentration curve, when the solute concentration goes to zero, $\Delta_{dil}H$ becomes $\Delta_{dil}H^\infty$ (change in solute dilution enthalpy at infinite dilution) which expresses the solute-“solvent” interaction. The solvent could be pure water, or an aqueous solution of sodium citrate or sodium tartrate, as well as the ATPS top phase. When the solvent is pure water, we determine the solute-water interaction, $\Delta_{dil,solute}H^{\infty,H2O}$. However, when the “solvent” is a sodium citrate or sodium tartrate aqueous solution, $\Delta_{dil,solute}H^{\infty,Salt\ aqueous\ solution}$ is determined, which represents the solute-water plus solute-salt interactions. In order to directly determine the Chy-salt interaction; i.e., $\Delta_{Chy-tartrate}H^o$ or $\Delta_{Chy-citrate}H^o$, we must apply equation 9.

$$\Delta_{solute-salt}H^{\circ} = \Delta_{dil,solute}H^{\infty,Salt\ aqueous\ solution} - \Delta_{dil,solute}H^{\infty,H_2O} \quad (9)$$

where $\Delta_{dil,solute}H^{\infty,Salt\ aqueous\ solution}$ is the dilution enthalpy change at infinite dilution for the solute dissolved in an aqueous salt solution (0.72 mol L^{-1}), while $\Delta_{dil,solute}H^{\infty,H_2O}$ is the same parameter for solute dissolved in pure water. The same procedure was applied for others solvents. Fig. 6 shows the $\Delta_{dil}H$ vs [solute] at 298.15 K and table 1 shows the thermodynamic contribution ($\Delta_{i-j}H^{\circ}$) to $\Delta_{tr}H^{\circ}$ for the PEO 1500 + CitNa + H₂O and PEO 1500 + TartNa + H₂O ATPSs, at 298.15 K.

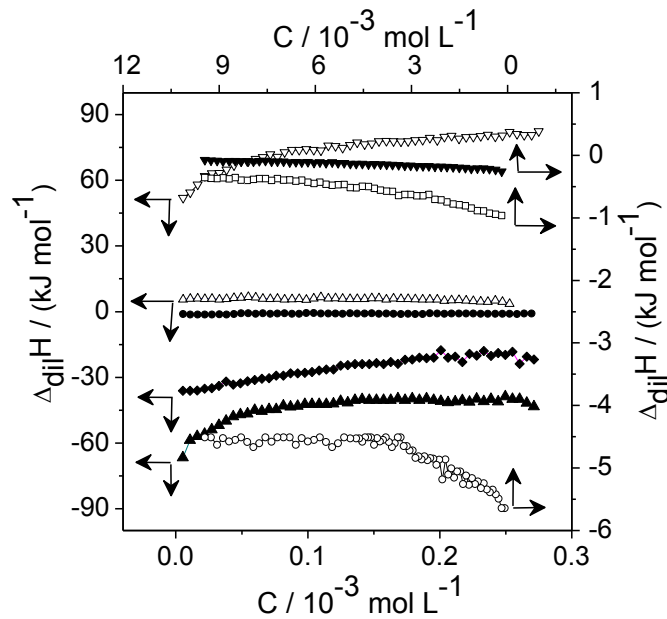


Fig. 6. Dilution enthalpy change for chymosin stock solution at 2.97 mmol L^{-1} dissolved in: pure water (∇), 0.72 mol L^{-1} aqueous sodium citrate solution (\bullet), 0.72 mol L^{-1} aqueous sodium tartrate solution (Δ), top phase citrate ATPS (\blacktriangle), top phase tartrate ATPS (\blacklozenge). $\Delta_{dil}H$ for salts: 0.10 mol L^{-1} aqueous sodium citrate solution in pure water (\square), 0.10 mol L^{-1} aqueous sodium tartrate solution in pure water (\blacktriangledown). $\Delta_{dil}H$ for PEO: 0.05 mol L^{-1} aqueous PEO 1500 solution in pure water (\circ).

Based on the values of $\Delta_{i-j}H^o$ shown in table 1, the main enthalpy interactions that drive Chy partition from the bottom phase to the top phase are $\Delta_{Chy-salt}H^o$ and $\Delta_{Chy-Mac}H^o$. The value of $\Delta_{tr}H^o$ for Chy is negative because $|\Delta_{Chy-Mac}H^o| > |\Delta_{Chy-salt}H^o|$; and is more negative for citrate ATPS because $|\Delta_{Chy-Mac}H^o|_{citrate} > |\Delta_{Chy-Mac}H^o|_{tartrate}$ i.e., less energy is expended to break the Chy-salt interaction than is released when the Chy-macromolecule interaction is produced. These enthalpy dilution results corroborate the supposition that the Chy-macromolecule interaction is the motriz power for concentration of Chy in the top phase of the ATPS.

Table 1. Thermodynamic contribution ($\Delta_{i-j}H^o$) to $\Delta_{tr}H^o$ for the PEO 1500 + CitNa + H₂O and PEO 1500 + TartNa + H₂O ATPSs, at 298.15 K.

$\Delta_{i-j}H^o$	$kJ\ mol^{-1}$	$\Delta_{i-j}H^o$	$kJ\ mol^{-1}$
PEO 1500 + CitNa + H ₂ O		PEO 1500 + TartNa + H ₂ O	
$\Delta_{Chy-citNa}H^o$	-57.92 ± 0.57	$\Delta_{Chy-tarNa}H^o$	-50.98 ± 1.02
$\Delta_{w-CitNa}H^o$	-0.98 ± 0.01	$\Delta_{w-tarNa}H^o$	-0.24 ± 0.01
$\Delta_{Chy-Mac(CitNa)}H^o$	-125.90 ± 3.70	$\Delta_{Chy-Mac(tarNa)}H^o$	-94.62 ± 2.83
$\Delta_{w-Mac}H^o$	-5.51 ± 0.11	$\Delta_{w-Mac}H^o$	-5.51 ± 0.05

3.4 Polymer hydrophobicity effect on the chymosin partition behavior

Chy molecules contain a great number a hydrophobic amino acid units, such as alanine (15), leucine (23), phenylalanine (17), proline (15), glycine (28), and tryptophan (4), giving the enzyme a hydrophobic character³⁹. The unfavorable interaction between the hydrophobic amino acids and water molecules could promote the extraction of Chy to a more hydrophobic top phase in ATPS. In order to verify

this hypothesis, we have evaluated the effect of increasing the ATPS top-phase hydrophobicity by replacing PEO with the copolymer triblock F68 as the macromolecular component on the Chy thermodynamic partition. The F68 structure $(EO)_{80}-(PO)_{30}-(EO)_{80}$ contains two hydrophilic blocks of PEO and one hydrophobic block of poly(propylene oxide) (PPO). The PO segment has an unfavorable interaction with water molecules, making the F68 chain hydrophobicity higher than that of the PEO chain. The F68 hydrophobic-hydrophilic balance between EO and PO blocks gives copolymer macromolecules the ability, at a specific temperature and concentration, to aggregate in nano-structures capable of interacting with the hydrophobic surfaces of biological solutes. Fig. 7a shows plots of K and $\Delta_{tr}G^o$ versus TLL, and Fig. 7b presents plots of the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ parameters versus TLL for the F68 + CitNa + H₂O and PEO 1500 + CitNa + H₂O ATPS, at 298.15 K.

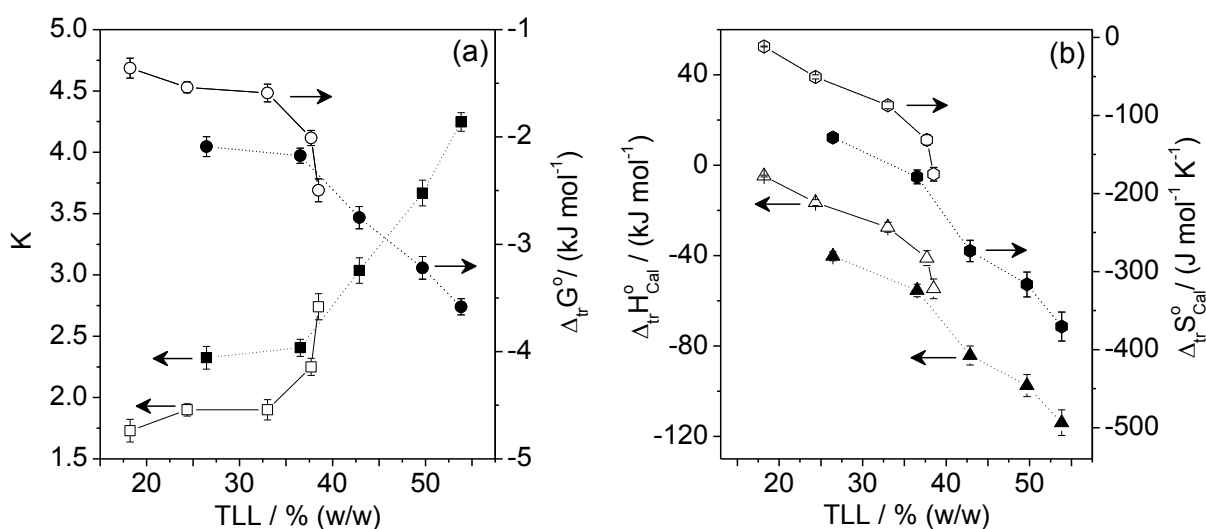


Fig. 7. Polymer hydrophobicity effect on the transfer thermodynamic parameters of chymosin in the PEO 1500 + CitNa + H₂O (closed symbols) and F68 + CitNa + H₂O (open symbols) ATPSs, at 298.15 K. **(a)** partition coefficient, K (squares) and $\Delta_{tr}G^o$ values (circles); **(b)** $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ (triangles) and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ (hexagons) parameters.

The K values obtained for the PEO ATPS vary from 2.32 ± 0.09 to 4.24 ± 0.08 , while for the F68 ATPS, the K values vary from 1.73 ± 0.09 to 2.74 ± 0.10 , showing that the increased hydrophobicity causes a decrease in the enzyme concentration in the ATPS top phase. This hydrophobicity effect on the K values is small, suggesting that the hydrophobic interactions have a small contribution to the Chy partition behavior. A hydrophobicity effect similar to this has been reported by de Oliveira et al.⁴⁰ for bovine serum albumin and α -lactalbumin in ATPSs formed from F68 + ammonium carbamate + H₂O and F38 + ammonium carbamate + H₂O. For both proteins, K is higher in the F68 ATPS than in those of the less hydrophilic F38. However, to describe the hydrophobic effect on the Chy partitioning in more detail requires analysis of the affected thermodynamic transfer parameters. The values of $\Delta_{tr}G^o$, $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ are more negative for the PEO 1500 ATPS than the F68 ATPS, showing that the more hydrophilic ATPS top phase improves the Chy-macromolecule interaction, increasing enzyme concentration in the ATPS macromolecule-rich phase.

The enthalpic contribution is independent of the hydrophobic/hydrophilic balance in the ATPS top phase, and is the motriz power for Chy extraction ($\Delta_{tr}H_{Cal}^o < 0$), because transfer of Chy from the bottom phase to the top phase promotes the decrease in the entropy of the system ($\Delta_{tr}S_{Cal}^o < 0$). Thus, to understand the hydrophobic effect on the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ values, we must analyze how the intermolecular interaction affects each term in equation 8. As salt-water and salt-Chy interactions in the bottom phase are equivalent in the F68 + CitNa + H₂O and PEO 1500 + CitNa + H₂O ATPSs, we can disregard the contributions of $\Delta_{Chy-S}H$ and $\Delta_{w-S}H$ in the term $\Delta\Delta_{tr}H_{PH}^o = \Delta_{tr}H_{PEO\ 1500}^o - \Delta_{tr}H_{F68}^o$, where PH refers to the

polymer hydrophobicity. On the other hand, because PO segments interact unfavorably with water molecules, more energy is expended to break the water–EO interaction than the water–PO interaction; i.e., $\Delta_{w-PEO1500}H > \Delta_{w-F68}H$. Consequently, the more negative $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ obtained for the PEO 1500 ATPS arises because $|\Delta_{Chy-PEO1500}H| > |\Delta_{Chy-F68}H|$.

The previous discussion regarding the hydrophobic effect on the $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ values for Chy partition demonstrates that the enzyme-macromolecule interaction is principally responsible for the transfer of Chy in both ATPSs. In the PEO 1500 ATPS, the macromolecule interacting with Chy is the pseudopolymer formed by Na^+ adsorption on the PEO 1500 chain. However, in the F68 ATPS, copolymer micelles with a PO segment core and EO shell structure decrease the extension of pseudopolymer formation, because the Na^+ cations are excluded from the hydrophobic core of the micelles. This leads to a reduction in the macromolecule charge density, reducing the strength of the Chy-F68 interactions in comparison to those of the Chy-PEO 1500 interactions.

3.5 Polymer size effect on chymosin partition behavior

It is well known that the size of the polymer inductor of the ATPS phase splitting affects the partition behavior of a great number of different proteins and enzymes⁴¹, including Chy in the PEO + phosphate + H₂O ATPS¹⁹. For this reason, the PEO molar mass effect on the Chy transfer thermodynamic parameters was determined. This effect was evaluated on the PEO 1500 + CitNa + H₂O and PEO 10000 + CitNa + H₂O ATPSs for several TLL values (Fig. 8a and 8b). The polymer size effect was dependent on the difference in composition of the ATPS phases. For TLL < 38% (w/w) we found that smaller PEO macromolecule produced the higher K

values ($K_{\text{PEO } 1500} > K_{\text{PEO } 10000}$) while for $\text{TLL} > 38\%$ (w/w) the reverse was true ($K_{\text{PEO } 10000} > K_{\text{PEO } 1500}$). To verify that the TLL dependence of the PEO size effect was not an experimental artifact, we repeated the analysis for the $\text{PEO } 1500 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ and $\text{PEO } 10000 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ ATPSs, observing the same PEO size effect (Fig.9)

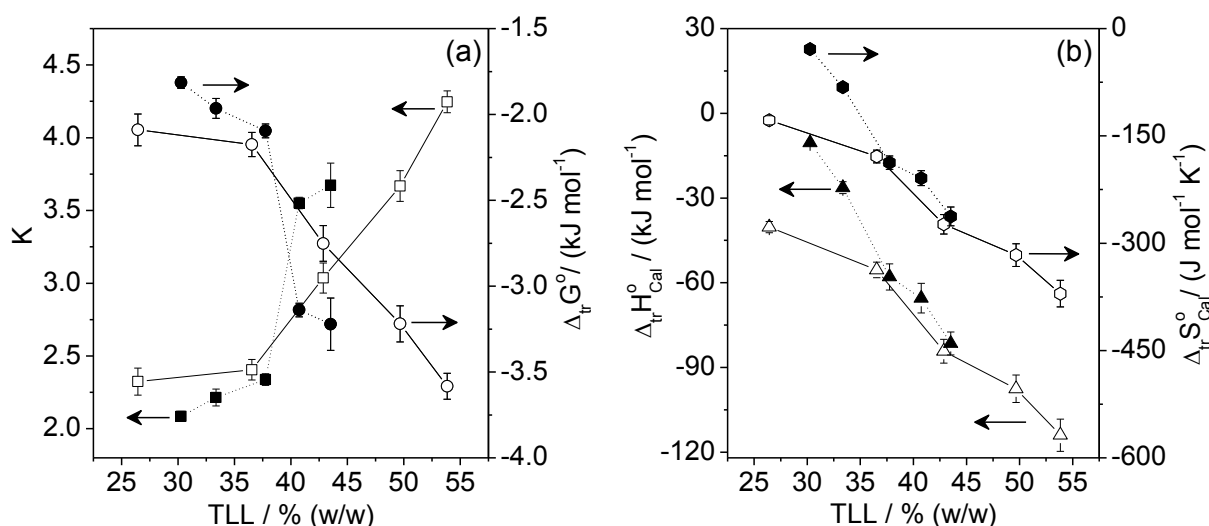


Fig.8. Polymer size effect on the chymosin transfer thermodynamic parameters in the $\text{PEO } 1500 + \text{CitNa} + \text{H}_2\text{O}$ (open symbols) and $\text{PEO } 10000 + \text{CitNa} + \text{H}_2\text{O}$ (closed symbols) ATPSs, at 298.15 K. **(a)** partition coefficient, K (squares) and $\Delta_{tr}G^\circ$ values (circles); **(b)** $\Delta_{tr}H_{Cal}^\circ$ (triangles) and $\Delta_{tr}S_{Cal}^\circ$ (hexagons) parameters.

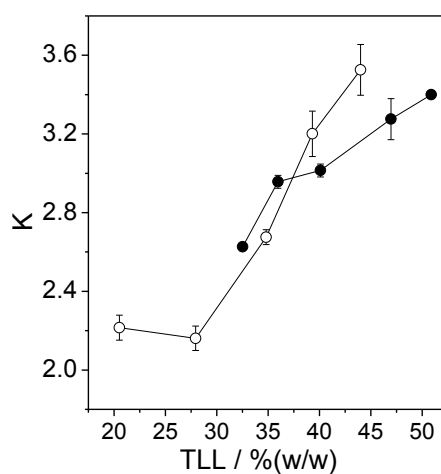


Fig.9. Polymer size effect on the chymosin partition coefficient (K) in the $\text{PEG } 1500 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ (●) and $\text{PEG } 10000 + \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ (○) ATPSs, at 298.15 K.

The PEO size effect on the Chy $\Delta_{tr}G^o$ values was very small, with $|\Delta\Delta_{tr}G_{PS}^o| = |\Delta_{tr}G_{PEO\ 1500}^o - \Delta_{tr}G_{10000}^o|$ around 0.5 kJ mol^{-1} , where subscript PS refers to the polymer size. For TLL < 38% (w/w), $\Delta\Delta_{tr}G_{PS}^o$ values are negative, while for TLL > 38% (w/w) they are positive. However, $\Delta\Delta_{tr}H_{PS}^o = \Delta_{tr}H_{PEO\ 1500}^o - \Delta_{tr}H_{10000}^o$ is negative for all TLL studied, with values ranging from -29.90 ± 1.06 to $-2.79\pm 0.83\text{ kJ mol}^{-1}$, and increasing as TLL values increase. The same trend with PEO size was observed for $\Delta\Delta_{tr}S_{PS}^o = \Delta_{tr}S_{PEO\ 1500}^o - \Delta_{tr}S_{10000}^o$, with values ranging from -157 ± 4.50 to $-11.57\pm 1.12\text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

Despite the substantial values of $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$, the values of $\Delta_{tr}G^o$ are small, showing that during the Chy transfer process an enthalpic-entropic compensation occurs. In general, thermodynamic processes, such as protein denaturation, which occur in multiple steps, lead to this entropy-enthalpy compensation⁴². For TLL < 38% (w/w) $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ is smaller for Chy-PEO 1500 system because it possesses more interaction sites than the Chy-PEO 10000 system. The smaller number of sites for Chy-PEO interaction observed with PEO 10000 is due to entanglement of the longer polymer chains. As macromolecule concentration increases; i.e., for TLL > 38% (w/w); the entanglement density in both PEO 1500 and PEO 10000 increased, causing a decrease in the number of interaction sites available for Chy-PEO interaction. Hence, $\Delta\Delta_{tr}H_{PS}^o$ decreased. However, $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$ for PEO 1500 system is even more negative than that for the PEO 10000 system. In general, it is recognized that PEO of higher molar mass decreases the partitioning of different solutes through a molecular exclusion mechanism, which is associated with the large decrease in entropy caused by the transfer process⁸. However, our results reveal that in the case of Chy the entropy decrease is higher for PEO 1500 than for

PEO 10000, demonstrating that factors other than the configurational entropy change, such as intermolecular interaction, determine the PEO size effect on the Chy transfer process and contribute to the motriz power of the system.

4. Conclusions

We evaluated the chymosin partition behavior by determining its transfer thermodynamic parameters in ATPSs of different macromolecules + salts + water. By analyzing $\Delta_{tr}G^o$, $\Delta_{tr}H_{Cal}^o$, and $\Delta_{tr}S_{Cal}^o$ it was possible to determine the driving forces responsible for concentrating the enzyme in the ATPS top phase. The motriz power for chymosin transfer from the bottom to the top ATPS phase was the specific and intense chymosin-macromolecule interaction, which increased with increasing TLL, increasing hydrophilicity in the ATPS top phase, decreasing macromolecule molar mass, and the use of lithium salts in ATPS. Our goal was the development of a thermodynamic approach based on the determination of the solute $\Delta_{dil}H$ that enables all of the chymosin-ATPS component interactions participating in the enzyme transfer process to be ascertained. We believe that this thermodynamic procedure can be applied to others studies investigating solute partition in different ATPSs. Finally, our detailed thermodynamic study of the chymosin partitioning in ATPSs can contribute to the development of new theoretical models that more precisely describe the driving forces associated with the partition of biological solutes in ATPSs.

5. References

- [1] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Application of hydrophobic extractant in aqueous two-phase systems for selective extraction of cobalt, nickel and cadmium, *J. Chromatogr. A.* 1279 (2013) 13-19.
- [2] L.R. de Lemos, R.A. Campos, G.D. Rodrigues, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Green separation of copper and zinc using triblock copolymer aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* 115 (2013) 107-113.
- [3] L.A.P. Alcântara, I.V. Amaral, R.C.F. Bonomo, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, V.P.R. Minim, L.A. Minim, Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate, *Food. bioprod. process.* 92 (2014) 409–415.
- [4] S. Moreira, S.C. Silvério, E.A. Macedo, A.M.F. Milagres, J.A. Teixeira, S.I. Mussatto, Recovery of *Peniophora cinerea laccase* using aqueous two-phase systems composed by ethylene oxide/propylene oxide copolymer and potassium phosphate salts, *J. Chromatogr. A.* 1321 (2013) 14– 20.
- [5] H.S. Mohammadi, E. Omidinia, Process integration for the recovery and purification of recombinant *Pseudomonas fluorescens proline dehydrogenase* using aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. B.* 929 (2013) 11– 17.
- [6] T. Matos, H.O. Johansson, J.A. Queiroz, L. Bulow, Isolation of PCR DNA fragments using aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* 122 (2014) 144-148.
- [7] J.M. de Alvarenga, R.A. Fideles, M.V. da Silva, G.F. Murari, J.G. Taylor, L.R. de Lemos, G.D. Rodrigues, A.B. Mageste, Partition study of textile dye Remazol Yellow Gold RNL in aqueous two-phase systems, *Fluid. Phase. Equilibr.* 391 (2015) 1-8.
- [8] A.B. Mageste, T.D.A. Senra, M.C.H. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.H.M. da Silva, Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts, *Sep. Purif. Technol.* 98 (2012) 69-77.
- [9] L.M. Dominak, E.L. Gundermann, C.D. Keating, Microcompartmentation

- in artificial cells: pH-induced conformational changes alter protein localization, *Langmuir*. 26(8) (2010) 5697-5705.
- [10] I. Fischer, C. Morhardt, S. Heissler, M. Franzreb, Partitioning behavior of silica-coated nanoparticles in aqueous micellar two-phase systems: evidence for an adsorption-driven mechanism from QCM-D and ATR-FTIR measurements, *Langmuir*. 28 (2012) 15789–15796.
- [11] G.Y. Ao, C.Y. Khripin, M. Zheng, DNA-controlled partition of carbon nanotubes in polymer aqueous two-phase systems, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 10383–10392.
- [12] N.K. Subbaiyan, A.N.G. Parra-Vasquez, S. Cambre, M.A.S. Cordoba, S.E. Yalcin, C.E. Hamilton, N.H. Mack, J.L. Blackburn, S.K. Doorn, J.G. Duque, Bench-top aqueous two-phase extraction of isolated individual single-walled carbon nanotubes, *Nano. Res.* 8(5) (2015) 1755–1769.
- [13] D.P.C. de Barros, S.R.R. Campos, P.P. Madeira, A.M. Azevedo, A.M. Baptista, M.R. Aires-Barros, Modeling the partitioning of amino acids in aqueous two phase systems, *J. Chromatogr. A.* 1329 (2014) 52– 60.
- [14] P.P. Madeira, A. Bessaa, D.P.C. de Barros, M.A. Teixeira, L. Álvares-Ribeiro, M.R. Aires-Barros, A.E. Rodrigues, A. Chaite, B.Y. Zaslavskye, Solvatochromic relationship: Prediction of distribution of ionic solutes in aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. A.* 1271 (2013) 10-16.
- [15] K. Berggren, A. Wolf, J.A. Asenjo, B.A. Andrews, F. Tjerneld, The surface exposed amino acid residues of monomeric proteins determine the partitioning in aqueous two-phase systems, *Biochim. Biophys. Acta.* 1596 (2002) 253-268.
- [16] H.O. Johansson, G. Karlstrom, F. Tjerneld, C.A. Haynes, Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. B.* 711 (1998) 3–17.
- [17] L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, J. Amin, J.P. Martins, J.S.D. Coimbra, L.A. Minim, Hydrophobic effect on the partitioning of $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ anions in aqueous two-phase systems formed by triblock copolymers and phosphate salts, *Sep. Purif. Technol.* 60 (2008) 103-112.
- [18] I.S.B. do Nascimento, J.S.R. Coimbra, J.P. Martins, L.H.M. da Silva,

- R.C.F. Bonomo, M.R. Pirozzi, A. Cinquini, Partitioning of glutenin flour of special wheat using aqueous two-phase systems, *J. Cereal Sci.* 52 (2010) 270-274.
- [19] G. Reh, D. Spelzini, G. Tubio, G. Pico, B. Farruggia, Partition features and renaturation enhancement of chymosin in aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 860 (2007) 98-105.
- [20] D. Spelzini, B. Farruggia, G. Pico, Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: chymosin and pepsin, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 821 (2005) 60-66.
- [21] D. Spelzini, G. Pico, B. Farruggia, Dependence of chymosin and pepsin partition coefficient with phase volume and polymer pausidispersity in polyethyleneglycol-phosphate aqueous two-phase system, *Colloid. Surface. B.* 51 (2006) 80-85.
- [22] W.Y. Chen, H.M. Huang, C.C. Lin, F.Y. Lin, Y.C. Chan, Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation, *Langmuir.* 19 (2003) 9395-9403.
- [23] L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, K.R. Francisco, M.V.C. Cardoso, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, PEO-[M(CN)₅NO]^{x-} (M = Fe, Mn, or Cr) interaction as a driving force in the partitioning of the pentacyanonitrosylmetallate anion in ATPS: Strong effect of the central atom, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 11669–11678.
- [24] F. Gustavsson, M. Glantz, A.J. Buitenhuis, H. Lindmark-Månsson, H. Stålhammar, A. Andrén, M. Paulsson, Factors influencing chymosin-induced gelation of milk from individual dairy cows: Major effects of casein micelle size and calcium, *Int. Dairy J.* 39 (2014) 201-208.
- [25] N. Wanga, K.Y. Wang, G.Q. Li, W.F. Guo, D.u. Liu, Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*, *Protein. Expres. Purif.* 111 (2015) 75–81.
- [26] D.S. Palmer, A.U. Christensen, J. Sorensen, L. Celik, K.B. Qvist, B. Schiott, Bovine chymosin: a computational study of recognition and binding of

- bovine kappa-casein, *Biochemistry*. 49 (2010) 2563–2573.
- [27] J.F. Hsieh, P.H. Pan, Proteomic profiling of the coagulation of milk proteins induced by chymosin, *J. Agric. Food. Chem.* 60 (2012) 2039-2045.
- [28] G.D. Rodrigues, L.D. Teixeira, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.M.M. de Carvalho, Phase diagrams of aqueous two-phase systems with organic salts and F68 triblock copolymer at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 55 (2010) 1158–1165.
- [29] P.D. Patrício, A.B. Mageste, L.R. de Lemos, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO+organic salts+H₂O and PPO+organic salts+H₂O aqueous two-phase systems, *Fluid. Phase. Equilibr.* 305 (2011) 1-8.
- [30] J.P. Martins, C.D. Carvalho, L.H.M. da Silva, J.S.D. Coimbra, M.D.H. da Silva, G.D. Rodrigues, L.A. Minim, Liquid–liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 238–241.
- [31] A. Bakk, R. Metzler, Two states do not necessarily correspond to a two-state transition: van't Hoff enthalpy in the case of a small entropy difference between the states, *Chem. Phys. Let.* 398 (2004) 190–193.
- [32] R.I. Boysen, Y. Wang, H.H. Keah, M.T.W. Hearn, Observations on the origin of the non-linear van't Hoff behaviour of polypeptides in hydrophobic environments, *Biophys. Chem.* 77 (1999) 79-97.
- [33] L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, R.A.N. de Aquino, K.R. Francisco, M.V.C. Cardoso, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the [Fe(CN)₅NO]²⁻ anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts, *Journal of Physical Chemistry B* 110 (2006) 23540-23546.
- [34] C.A.S. da Silva, J.S.R. Coimbra, E.E.G. Rojas, L.A. Minim, L.H.M. da Silva, Partitioning of caseinomacropeptide in aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 858 (2007) 205-210.
- [35] F.C. de Oliveira, J.S.D. Coimbra, L.H.M. da Silva, E.E.G. Rojas, M.D.H. da Silva, Ovomuroid partitioning in aqueous two-phase systems, *Biochem. Eng. J.* 47 (2009) 55-60.

- [36] A.B. Mageste, L.R. de Lemos, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7623-7629.
- [37] L.H.M. da Silva, W. Loh, Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (Or Dextran), *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 10069-10073.
- [38] M. Rampilli, R. Larsen, M. Harboe, Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs, *Int. Dairy J.* 15 (2005) 1130-1137.
- [39] C.A.A. Malak, I.F.G. AbouElAdab, V. Vukashinovic, I.A. Zalunin, E.A. Timokhina, G.I. Lavrenova, V.M. Stepanov, Buffalo (*Bos buffali L.*) chymosin purification and properties, *Comp. Biochem. Physiol.* 113B (1996) 57-62.
- [40] M.C. de Oliveira, M.A.N. de Abreu, P.D. Pessoa, Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO–PPO–PEO, *Biochem. Eng. J.* 37 (2007).
- [41] J.A. Asenjo, B.A. Andrews, Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 8826– 8835.
- [42] J.C. Huang, Liquid crystal solutions at infinite dilution: Enthalpy–entropy compensation of solutes transfer properties between phases, *Fluid. Phase. Equilibr.* 372 (2014) 1-6.

6. Considerações finais

Novos sistemas aquosos bifásicos (SABs) Macromolécula + sal orgânico + água foram formados neste trabalho (capítulo 1) devido à falta de SABs ambientalmente seguros para sua aplicação em nível industrial. As diferentes etapas da pesquisa mostraram que estes sistemas precisam de menor concentração de sal e polímero que os sistemas formados com sais inorgânicos. Por outro lado, os sistemas formados foram entropicamente dirigidos, sendo que o processo de segregação de fases é endotérmico e favorecido pela temperatura. Além disso, foi demonstrado que o sal orgânico formador do SAB afeta a posição da curva binodal do diagrama de fases.

Alguns dos novos sistemas obtidos juntamente com SABs reportados na literatura foram aplicados no estudo termodinâmico de transferência da enzima quimosina. Demonstramos nesta pesquisa que o processo de transferência da enzima é entalpicamente dirigido e ocorre com compensação entrópica/entálpica. A partir da técnica de calorimetria de titulação isotérmica foi proposto um método para determinar as contribuições energéticas das principais interações intermoleculares que ocorrem no processo de partição sobre a entalpia de transferência da quimosina, mostrando que a interação quimosina-macromolécula é a responsável pela transferência da quimosina da fase inferior para a fase superior. Espera-se que este método seja aplicado nos processos de partição de diferentes solutos biológicos e inorgânico, para compreender o porquê da transferência destes solutos nos SABs.