

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

OTTO ALBERTO QUISPE JIMENEZ

**INFLUÊNCIA DE SAIS DE SÓDIO NO EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS CONTENDO TRITON X-114, NA PRESENÇA OU NÃO DE
GLICOSE, VISANDO A EXTRAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE**

Poços de Caldas/MG

2019

OTTO ALBERTO QUISPE JIMENEZ

**INFLUÊNCIA DE SAIS DE SÓDIO NO EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS CONTENDO TRITON X-114, NA PRESENÇA OU NÃO DE
GLICOSE, VISANDO A EXTRAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Química da Universidade Federal de Alfenas como requisito final para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Basso

Poços de Caldas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

J61i Jimenez, Otto Alberto Quispe.
Influência de sais de sódio no equilíbrio de fases de sistemas
aquosos bifásicos contendo Triton X-114, na presença ou não de
glicose, visando a extração da enzima frutossiltransferase / Otto
Alberto Quispe Jimenez. -- Poços de Caldas/MG, 2019.
76 f. –

Orientador(a): Rodrigo Corrêa Basso.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.
Bibliografia.

1. Biomoléculas – Purificação. 2. Equilíbrio termodinâmico. 3.
Equilíbrio líquido-líquido. I. Basso, Rodrigo Corrêa. II. Título.

CDD – 660

OTTO ALBERTO QUISPE JIMENEZ

**INFLUÊNCIA DE SAIS DE SÓDIO NO EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS CONTENDO TRITON X-114, NA PRESENÇA OU NÃO DE
GLICOSE, VISANDO A EXTRAÇÃO DA ENZIMA FRUTOSILTRANSFERASE**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas.

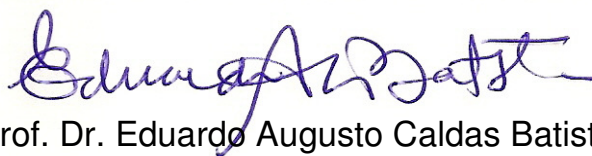
Área de Concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 06 de março de 2019.



Prof. Dra. Mariana Conceição da Costa

Instituição: Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista

Instituição: Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Basso

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Dedico a Deus, à minha família que me
proveram afeto e suporte nas mais diversas
adversidades enfrentadas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela constante presença, força, proporcionando sabedoria e conhecimento para a realização de mais esta etapa da minha vida.

Aos meus familiares, por todo suporte e nunca me deixar desistir.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG, Processo: TEC – APQ - 01412-16); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo: 420355/2016-2) pelo apoio financeiro e a bolsa de mestrado cedida pelo Programa de Alianças para a Educação e Capacitação (PAEC, processo: Nº 001/2016) entre a Organização dos Estados Americanos (OEA) e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB).

A Rumine Vargas, Rocio Zapana, Jorge Salazar, Edith Silva pelo companheirismo, amizade e apoio com a logística para fazer esta viagem e nas viagens de emergência durante a estadia nesta bela cidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Basso pelo profissionalismo, apoio, paciência, companheirismo, amizade.

A Bruno Rossetti e Abimael Carvalho, alunos de iniciação a quem pude acompanhar em todo o seu aprendizado, além das horas intermináveis no laboratório na qual este me ajudava sem reclamações e sempre com um sorriso no rosto.

Aos Professores Prof. Dr. Rafael Firmani Perna (Coordenador do curso de Pós-Graduação em Engenharia Química) e Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg, aos demais professores e aos funcionários pela amizade conferida e que ajudam este magnífico projeto no seu dia-a-dia.

Aos discentes do curso de Pós-Graduação em Engenharia Química pela amizade e apoio mútuo nos momentos felizes e difíceis.

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

Obrigado a todos!

RESUMO

Os frutooligossacarídeos são edulcorantes prebióticos produzidos por meio da transfrutossilacção da sacarose com o uso da enzima frutossiltransferase. Uma alternativa com menor número de etapas, menor custo e escalonamento mais simples em relação com métodos convencionais para a extração e purificação desta enzima é a extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos. A primeira etapa na tentativa de viabilização industrial deste processo consiste no conhecimento do comportamento do equilíbrio líquido-líquido dos sistemas envolvidos. Deste modo o foco do presente trabalho está no estudo do equilíbrio líquido-líquido de sistemas constituídos pelo surfactante Triton X-114 + água + sais (sulfato de sódio, citrato de sódio ou tartarato de sódio) nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C, e pHs de 5; 7,5 e 10. Adicionalmente, foi estudado o efeito da glicose, um componente presente no meio do qual a enzima é extraída, no equilíbrio líquido-líquido destes sistemas. Neste estudo, a composição das curvas binodais foi obtida por titulação turbidimétrica; a composição das linhas de amarração foi calculada usando a metodologia de Merchuk; e a concentração de glicose nas fases foi obtida por reação desta com reagente de DNS, e leitura em espectrofotometro UV/VIS a 540 nm. Foi observado que: o efeito *salting out* dos anions dos eletrólitos sobre o Triton X-114 e sobre a glicose foi maior para os ânions SO_4^{2-} , apresentando comportamento similar para os íons $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ e $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$, e para baixas concentrações do carboidrato este se particionou preferencialmente na fase rica em polímero. Apenas o pH 5 teve efeito sobre a curva binodal do sistema contendo citrato de sódio. A metodologia de Merchuk para cálculos das composições das linhas de amarração se correlacionou adequadamente com dados experimentais da literatura. A diminuição da temperatura do sistema levou ao aumento da inclinação das linhas de amarração e diminuição da região bifásica para os sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sais.

Palavras chave: Triton X-114. Equilíbrio Líquido-líquido. Sistemas aquosos bifásicos.
Coeficiente de partição da glicose.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides are prebiotic sweeteners produced by transfructosylation of sucrose by the enzyme fructosyltransferase. An alternative with fewer steps, lower cost and simpler scheduling to the conventional methods for the extraction and purification of this enzyme is the liquid-liquid extraction using two-phase aqueous systems. The first step in the attempt to make this process viable is the knowledge of the liquid-liquid equilibrium behavior of the systems. Thus the focus of the present work is the study of liquid-liquid behavior of systems constituted by surfactant Triton X-114 + water + salts (sodium sulfate, sodium citrate or sodium tartrate) at temperatures of 10 ° C, 20 ° C and 30 ° C, and pHs of 5, 7.5 and 10. Additionally, the effect of glucose, a component present in the medium from which the enzyme is extracted, was studied in the liquid-liquid equilibrium of these systems. In this study, the composition of the binodal curves were obtained by turbidimetric titration, the composition of the tie lines were calculated using the Merchuk methodology and the glucose concentration in the phases was obtained by reaction with DNS reagent, and readings in spectrophotometer UV / VIS at 540 nm. It was observed that SO_4^{2-} had showed higher salting out effect on Triton X-114 and $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ and $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$ had showed similar behavior. At low carbohydrate concentrations, this component is preferentially partitioned in the polymer rich phase. Only pH 5 had an effect on the binodal curves of the system containing sodium citrate. The Merchuk methodology for calculations of the tie lines composition correlated adequately with experimental data from the literature. The decrease in temperature of the system led to an increase of the slope of the tie lines and a decrease of the biphasic region to the systems constituted by Triton X-114 + water + salts.

Keywords: Triton X-114. Liquid-liquid equilibrium. Biphasic aqueous systems. Coefficient of glucose partition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Operações unitárias convencionais para purificação de proteínas.....	21
Figura 2 - Diagrama de fases de SAB expresso em coordenadas retangulares.....	26
Figura 3 - Série de Hofmeister apresentando a ordem dos íons classificados em cosmotrópicos e caotrópicos	30
Figura 4 - Estrutura do Triton X-114, n = 7 – 8.....	32
Figura 5 - Diagrama para determinação da curva de solubilidade do sistema Água (1) + Triton X-114 (2).....	35
Figura 6 - Esquema para a determinação dos pontos experimentais das curvas binodais nas FRP e FRA.....	36
Figura 7 - Diagrama de blocos para a determinação dos pontos experimentais das curvas binodais nas FRP e FRA.....	37
Figura 8 - Diagrama de blocos para a determinação dos pontos experimentais das curvas binodais na FRP a diferentes pHs a 20 °C.....	38
Figura 9 - Diagrama de blocos para a determinação das frações mássicas das linhas de amarrações a diferentes temperaturas.....	39
Figura 10 - Diagrama de fases do sistema água (1) + Triton X-114 (2).....	42
Figura 11 - Curvas binodais para os sistemas constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) (■, ◆, ▲) ou citrato de sódio (4) (■, ◆, ▲) ou tartarato de sódio (5) (□, ◇, Δ) nas temperaturas de 10 °C (▲, ▲, Δ); 20 °C (◆, ◆, ◇) e 30 °C (■, ■, □).....	43
Figura 12 - Curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) (■, ◆, ▲) ou citrato de sódio (4) (■, ◆, ▲) ou tartarato de sódio (5) (□, ◇, Δ) nas temperaturas de 10 °C (▲, ▲, Δ); 20 °C (◆, ◆, ◇) e 30 °C (■, ■, □).....	45
Figura 13 - Curvas binodais para a FRA nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) (■, ◆, ▲) ou citrato de sódio (4) (■, ◆, ▲) ou tartarato de sódio (5) (□, ◇, Δ) nas temperaturas de 10 °C (▲, ▲, Δ); 20 °C (◆, ◆, ◇) e 30 °C (■, ■, □).....	46
Figura 14 - Ajuste das curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) nas temperaturas de 10 °C (▲); 20 °C (◆) e 30 °C (■).....	49
Figura 15 - Ajuste das curvas binodais para a FRA nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) nas temperaturas de 10 °C (▲); 20 °C (◆) e 30 °C (■).....	49
Figura 16 - Ajuste das curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) nas temperaturas de 10 °C (▲); 20 °C (◆) e 30 °C (■).....	50

Figura 17 - Ajuste das curvas binodais para a FRA nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) nas temperaturas de 10 °C (▲); 20 °C (◆) e 30 °C (■).....	50
Figura 18 - Ajuste das curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + tartarato de sódio (5) nas temperaturas de 10 °C (Δ); 20 °C (◇) e 30 °C (□).....	51
Figura 19 - Ajuste de curvas binodais para a FRA nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + tartarato de sódio (5) nas temperaturas de 10 °C (Δ); 20 °C (◇) e 30 °C (□).....	51
Figura 20 - Linhas de amarração para os sistemas constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) a 30 °C obtidos nesta investigação (▲---▲) e da literatura (●...●) (Ritter,2016).....	56
Figura 21 - Curvas binodais e linhas de amarração obtidas experimentalmente pelo método proposto por Merchuk para o sistema (1) água +(2) Triton X-114 +(3) sulfato de sódio nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C.....	59
Figura 22 - Curva binodais e linhas de amarração obtidas experimentalmente pelo método proposto por Merchuk para o sistema água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C.....	60
Figura 23 - Curvas binodais e linhas de amarração obtidas experimentalmente pelo método proposto por Merchuk para o sistema água (1) + Triton X-114 (2) + tartarato de sódio (5) nas temperaturas de 10°C, 20 °C e 30 °C.....	61
Figura 24 - Efeito do pH nas curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos por (1) água + (2) TritonX-114 + (3) sulfato de sódio a pH =5 (▲); 7,5 (◆) e 10 (□) a 20 °C.....	62
Figura 25 - Efeito do pH nas curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) a pH =5 (▲), pH=7,5 (◆) e 10 (□) a 20 °C.....	63
Figura 26 - Efeito do pH nas curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos por (1) + (2) +(5) a pH =5 (▲); 7,5 (◆) e 10 (□) a 20 °C	63
Figura 27 - Curva binodal da FRP para os sistemas constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + glicose (6) a 30 °C (▲) e 20°C (●).....	64
Figura 28 - Coeficiente de partição da glicose em um sistema quaternário constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) (◇) ou (4) citrato de sódio (□) ou (5) (▲) tartarato de sódio + (6) glicose (w=5,10,15,20 e 25 %) a 20 °C.....	66
Figura 29 - Coeficiente de partição da glicose em um sistema quaternário constituídos por (1) água + (2) Triton X-114 + (3)sulfato de sodio (◆) ou (4)citrato de sodio (■) ou (5)tartarato de sodio (▲) + (6) glicose (w6 = 0,0003) a 20 °C.....	67

Figura 30 - Curva binodal para a FRP no sistema constituídos por (1) + (2) + (3) (Δ) e dados reportados da literatura (\bullet)(RITTER et al., 2016) a 30°C.....	75
Figura 31 - Curva binodal para a FRA no sistema constituídos por (1) + (2) + (3) (Δ) e dados reportados da literatura (\bullet)(RITTER et al., 2016) a 30°C.....	75
Figura 32 - Curva analítica do método DNS para determinação de açúcares redutores.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equações com parâmetros ajustados para a representação das curvas binodais para a FRP.....	47
Tabela 2 - Equações com parâmetros ajustados para a representação das curvas binodais para a FRA.....	48
Tabela 3 - Composição em porcentagem mássica na MI e das FRP e FRA das linhas de amarração para os sistemas (1) água + (2) Triton X-114 + (3) sulfato de sódio nas temperaturas de 10 °C; 20 °C e 30 °C obtida por Merchuk.....	53
Tabela 4 - Composição em porcentagem mássica na MI e das FRP e FRA das linhas de amarração para os sistemas (1) água + (2) Triton X-114 + (4) citrato de sódio nas temperaturas de 10 °C; 20 °C e 30 °C obtida por Merchuk.....	54
Tabela 5 - Composição em porcentagem mássica na MI e das FRP e FRA das linhas de amarração para os sistemas (1) água + (2) Triton X-114 + (5) tartarato de sódio nas temperaturas de 10 °C; 20 °C e 30 °C obtida por Merchuk.....	55
Tabela 6 - Composição dos sistemas quaternários constituídos por (1) água + (2) Triton X-114 + sais + (6) glicose ($w_6=0,05;0,1;0,15;0,20$ e $0,25$) a 20 °C.....	65
Tabela 7 - Composição dos sistemas quaternários constituídos por (1) água + (2) Triton X-114 + sais (3 ou 4 ou 5) + (6) ($w_6=0,003$) a 20 °C.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CLA** - Comprimento da linha de amarração
- DNS** -Ácido 3,5 dinitrosalicílico
- ELL** - Equilíbrio líquido-líquido
- FRA** -Fase rica em água
- FRP** -Fase rica em polímero
- ILA** - Inclinação da linha de amarração
- PEG** - Poli-etileno glicol
- PPG** - Poli-propilenglicol
- SABs** - Sistemas Aquosos Bifásicos
- PN** - ponto de névoa
- w** - Fração mássica
- i** - Componentes (i=1,2,3,4,5 e 6)

Onde:

- 1 – Água
- 2 - Triton X-114
- 3 - Sulfato de sódio
- 4 - Citrato de sódio
- 5 – Tartarato de sódio
- 6 - Glicose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 JUSTIFICATIVA	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
4.1 Frutooligossacarídeos (FOS)	19
4.2 Processo convencional de purificação de biomoléculas	20
4.3 Equilíbrio termodinâmico	21
4.3.1 Regra das fases de Gibbs	22
4.3.2 Equilíbrio líquido-líquido	22
4.4 Sistemas aquosos bifásicos (SABs).....	23
4.4.1 Uso dos SABs em processos de extração e purificação	24
4.4.2 Parâmetros de caracterização do ELL dos sistemas constituídos por polímero + sal + água	25
4.4.3 Obtenção da composição das linhas de amarração por meio da metodologia de Merchuk	27
4.4.4 Influência da temperatura no ELL	28
4.4.5 Influência do pH no ELL	29
4.4.6 Influência do sal no ELL de SABs	30
4.4.7 Equilíbrio líquido-líquido para sistemas contendo Triton X-114 + água.....	31
4.5 Enzimas isoladas	32
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Material.....	34
5.2 Métodos experimentais.....	34
5.2.1 Determinação da curva de solubilidade do sistema Triton X-114 + água.....	34
5.2.2 Determinação das curvas binodais	35
5.2.3 Determinação das curvas binodais a diferentes pHs	37
5.2.4 Determinação das frações mássicas das linhas de amarrações.....	38
5.2.5 Determinação da partição de glicose	39
5.3 Abordagem teórica.....	41
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1 Comportamento da curva de solubilidade do sistema Triton X-114 + água	42

6.2 Comportamento das curvas binodais para os sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal.....	43
6.3 Modelagem matemática das curvas binodais para os sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal.....	46
6.4 Composição das linhas de amarração para os sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal.....	52
6.5 Curvas binodais a diferentes pHs para os sistemas constituídos por Triton X-114 + sal + água.....	62
6.6 Comportamento do ELL de SABs constituídos por Triton X-114 + água + glicose adicionados ou não de sais.....	64
7 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos são oligossacarídeos prebióticos utilizados como edulcorantes, formados por unidades de frutose ligados a uma de glicose. Uma de suas rotas de obtenção ocorre a partir da transfrutossilacção da sacarose que dá origem a uma mistura de glicose, frutooligossacarídeos e outros subprodutos. A transfrutossilacção é catalisada pela enzima frutossiltransferase produzida por diferentes microorganismos, dentre eles alguns do gênero *Aspergillus*. De modo que a enzima possa ser utilizada em suas condições ótimas, bem como imobilizada para uso em reatores contínuos, ela deve ser isolada do caldo de fermentação no qual foi excretada (enzima extracelular).

Um dos desafios do uso de enzimas em processos biotecnológicos consiste em sua extração e purificação. Estes biocatalisadores são produzidos em meios muito complexos, que contém constituintes dos meios de cultura, organelas celulares, subprodutos, água e outros componentes misturados ao componente a ser extraído. Convencionalmente, os processos de extração e purificação de enzimas e outras biomoléculas são constituídos por várias etapas complexas, que empregam recursos sofisticados e, muitas vezes em pequena escala.

Um dos modos de se diminuir os custos e a complexidade dos processos de extração de enzimas, bem como aumentar a escala desses processos consiste em utilizar a extração líquido-líquido. Uma das alternativas de emprego deste processo está no uso de sistemas aquosos bifásicos. Estes sistemas são formados por duas fases líquidas imiscíveis, ou parcialmente miscíveis, nas quais a água é o componente majoritário. Aqueles constituídos por polímero + água + sal possuem algumas vantagens em relação aos demais sistemas: não provocam desnaturação ou perda de atividade dos biocompostos extraídos; podem ser muito seletivos a um dado componente devido à grande combinação de parâmetros; possuem viscosidade e tensão interfacial adequadas para a implementação de um processo de extração em grande escala, dentre outras.

O conhecimento do comportamento desses sistemas em equilíbrio líquido-líquido é necessário para a implementação da purificação de biomoléculas, dentre esta as enzimas, utilizando a extração líquido - líquido. Os principais parâmetros que afetam o equilíbrio líquido-líquido dos sistemas aquosos bifásicos são: o polímero e o sal utilizados, pH e temperatura do sistema.

A implementação de um processo de extração da frutossiltransferase a partir do caldo de fermentação no qual é excretada utilizando sistemas aquosos bifásicos constituídos por polímero + água + sal é dependente do conhecimento dos fatores que afetam o equilíbrio líquido-líquido destes compostos.

Deste modo o presente trabalho visou o estudo do comportamento do ELL de sistemas que podem vir a ser utilizados na separação e purificação da frutossiltransferase, enzima responsável pela conversão de sacarose em frutooligossacarídeos (FOS), que são edulcorantes com efeitos probióticos, partir do caldo de fermentação no qual é produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* IPT-301.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o comportamento do ELL de sistemas aquosos bifásicos (SABs) constituídos por água + polímero + sais em diferentes pHs e temperaturas, bem como a partição de glicose nestes sistemas.

2.2 Objetivos específicos

- a) Estudar, o comportamento de ELL de SABs constituídos por Triton X-114 (2) + água (1) + sulfato de sódio (3), nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C;
- b) Avaliar o comportamento do ELL de SABs constituídos por Triton X-114 (2) + água (1) + citrato de sódio (4) nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C;
- c) Analisar o comportamento do ELL de SABs constituídos por Triton X-114 (2) + água (1) + tartarato de sódio (5) a temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C;
- d) Ajustar os parâmetros dos modelos matemáticos que melhor representam o comportamento das curvas binodais dos sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sais nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C, sem ajuste de pH (aproximadamente 7,5);
- e) Calcular a composição das linhas de amarração dos sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sais nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C, sem ajuste de pH utilizando a metodologia proposta por Merchuck (1998);
- f) Estudar o efeito do pH a 20 °C no comportamento das curvas binodais dos sistemas compostos por Triton X-114 + água + sais;
- g) Analisar a partição de glicose (6) em SABs constituídos por água + polímero + sais.

3 JUSTIFICATIVA

Um dos problemas básicos relacionados ao desenvolvimento de diferentes operações biotecnológicas é o alto custo dos processos. A importância de selecionar um método adequado de separação é evidenciada pelo fato de que os custos estimados de isolamento e purificação das biomoléculas (enzimas) compreendem aproximadamente 60-80 % das despesas de produção (DYR; SUTTNAR, 1997; LIENQUEO; ASENJO, 2000; OWEN; CHASE, 1997).

A extração em SABs apresenta uma série de vantagens, como alta eficiência de processo, baixo custo de separação e ampliação de escala, bem como a preservação da atividade biológica das moléculas separadas (por exemplo, enzimas). Portanto, os SABs podem ser amplamente utilizados em biotecnologia para o isolamento e purificação de proteínas (DEMBCZYŃSKI et al., 2010; KEPKA et al., 2005; ROSA et al., 2009).

As vantagens de se utilizar sistemas contendo polímero e sal, em relação a aqueles contendo dois polímeros, são a alta seletividade na separação de moléculas pela solubilidade, menor viscosidade e o menor tempo de separação entre as fases (AZIMAIE et al., 2010). Embora o eletrólito seja o responsável principal pela separação de fases, outros fatores que afetam o ELL neste tipo de sistema são o pH e a temperatura (CHAKRABORTY; SEN, 2016).

O uso dos chamados polímeros termosensíveis tem aumentado recentemente (PRZYBYCIEN; PUJAR; STEELE, 2004; SCHÜGERL; HUBBUCH, 2005). A fase rica em polímero, obtida como resultado da separação primária de duas fases, é aquecida a uma temperatura que excede o ponto de névoa (PN) para um dado polímero. Isto leva a uma nova separação de fases, na qual uma das fases consiste principalmente de água, enquanto a outra compreende o polímero concentrado (BERGGREN, JOHANSSON, YJERNELD, 1995). No sistema bifásico primário, a proteína separada deve migrar seletivamente para a fase polimérica. Durante a termosseparação da fase polimérica, a proteína purificada migra para a fase que consiste principalmente de água. A outra fase é formada pelo polímero concentrado, que pode ser usado para outra extração (DEMBCZYNSKI; BIALAS; JANKOWSKI, 2010).

O mercado global de enzimas industriais está estimado entre US \$ 4,5 bilhões e US\$ 5,0 bilhões em 2015. Em relação as enzimas para o processamento de açúcar, o mercado foi estimado em US\$ 300 milhões (GUERRAND, 2018). Estima-se que o

mercado de enzimas continuará a crescer a uma taxa estimada de 6% a 8% ao ano no período 2016-2020 (GUERRAND, 2018).

De um modo geral o uso de enzimas isoladas apresenta vantagens sobre o uso de sistemas celulares inteiros, uma vez que a enzima de interesse geralmente catalisa uma única reação, sendo poucas as reações indesejadas. O uso de enzimas parcialmente purificadas permite que a reação seja realizada com uma quantidade de água menor; a temperatura e o pH da solução são fáceis de controlar; e nos limites abaixo da perda de atividade, os solventes orgânicos são geralmente bem tolerados. O tratamento de uma reação catalisada por enzima raramente é problemático, mas pode ser mais facilmente controlado ligando a enzima a um suporte sólido (DAVIES et al., 1989).

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentadas informações disponíveis na literatura referentes aos assuntos abordados neste trabalho. Esta fundamentação contempla conteúdos acerca dos seguintes temas: processos convencionais da purificação de biomoléculas, equilíbrio de fases e sistemas denominados aquosos bifásicos.

4.1 Frutooligossacarídeos (FOS)

Os FOS são considerados oligossacarídeos do tipo inulina, que têm baixa intensidade de doçura, pois fornecem apenas um terço da doçura da sacarose. (DOMINGUEZ et al., 2012). O termo inulina refere-se a uma mistura heterogênea de polímeros de frutose, amplamente disponível na natureza como carboidrato de armazenamento em plantas (NINESS, 1999).

Os FOS de cadeia curta, têm um grau médio de polimerização de 3-6, podendo ser produzidos pela síntese enzimática de sacarose (ROBERFROID et al., 2010). Os principais FOS são kestose, nistose, frutofuranosilnistose, bifurcose, inulobiose, inulotriose e inulotetraose (JACOB; PRAPULLA, 2012).

Desde a década de 1980 foi demonstrado que oligossacarídeos não digeríveis, especialmente os FOS, foram seletivamente fermentados por bifidobactérias, e tiveram a capacidade de, após a ingestão, continuar seu crescimento em fezes humanas (MITSUOKA; HIDAKA; EIDA, 1987; YAZAWA; IMAI; TAMURA, 1978). Alguns prebióticos comuns são: FOS, galactooligossacarídeos, xilooligossacarídeos, glicino-oligossacarídeos, isomaltooligossacarídeos, oligossacarídeos de soja, polidextrose, arabinose, manose, rafinose, lactulose, estaquiose e inulina.

Dentre as definições de prebióticos, grupo de compostos nos quais os FOS estão compreendidos, duas podem ser destacadas: i) Ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro, estimulando de forma eletiva o crescimento e/ou atividade de uma ou de uma quantidade limitada de bactérias no cólon e, portanto, melhorando a saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). ii) Ingrediente fermentado seletivamente que permite mudanças específicas, tanto na composição e/ou atividade na microflora gastrointestinal que confere benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro (GIBSON et al., 2004).

Os prebióticos têm o potencial de melhorar a saúde humana e animal e reduzir o risco de doenças mediadas por desequilíbrio da microbiota. Existe a possibilidade de os prebióticos serem utilizados terapêuticamente no tratamento de doenças e promover a saúde de forma preventiva (GIBSON et al., 2017).

Existem métodos químicos e enzimáticos para a produção de FOS. As enzimas produtoras de FOS são classificadas em dois grupos principais: β -frutofuranosidases e frutossiltransferases (KUMAR; SRIPADA; POORNACHANDRA, 2018). Em ambos os casos, quantidades de frutose e glicose são formados como subprodutos (ANTOŠOVÁ; POLAKOVIČ, 2001).

A maioria dos xaropes FOS tem uma composição de 50-60 % de FOS, 25-30 % de glicose, 10-15 % de sacarose não convertida e uma pequena quantidade de frutose (CUNHA, 2017).

4.2 Processo convencional de purificação de biomoléculas

A despeito das vantagens do uso de enzimas isoladas na conversão de compostos, a purificação de biomoléculas envolve uma série de operações unitárias ordenadas, com o objetivo de obter o máximo de rendimento e pureza. Uma estratégia geral para o processamento de materiais biológicos e os tipos de operações que podem ser usadas nas diferentes etapas é mostrada na Figura 1 (HO, 1990; LADISCH, 1990; PERRY; GREEN, 2008).

A aplicação de métodos convencionais de separação como eletroforese ou cromatografia em coluna, pode afetar a relação custo-benefício do processo, principalmente devido ao aumento dos custos relacionados ao aumento da escala. Uma das alternativas às etapas convencionais de separação/purificação é o uso de sistemas aquosos bifásicos (SABs) durante os processos de bioseparação (ALBERTSSON, 1986; WALTER; BROOKS; FISHER, 1985).

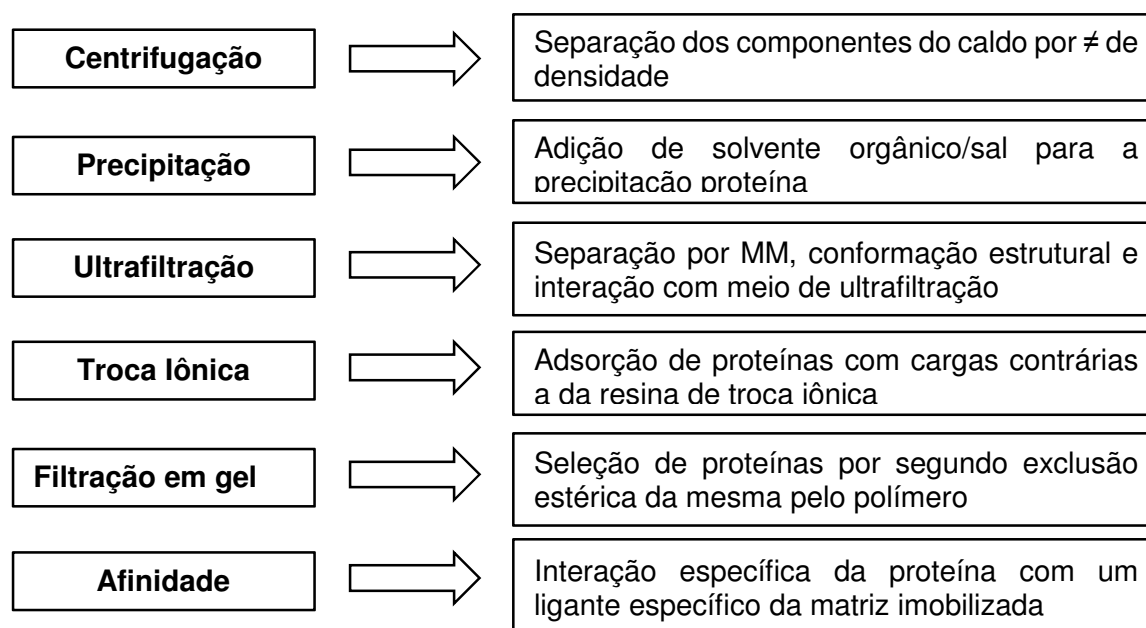


Figura 1 – Operações unitárias convencionais para purificação de proteínas

Fonte: Próprio autor

4.3 Equilíbrio termodinâmico

O equilíbrio termodinâmico entre duas ou mais fases é definido em termos das propriedades intensivas: temperatura, pressão e potencial químico. Quando há igualdade dessas propriedades em todas as fases presentes no sistema, o equilíbrio termodinâmico está determinado. Desta forma, em um sistema heterogêneo composto por π fases e N componentes, o equilíbrio é alcançado com as seguintes igualdades:

$$T^{(\alpha)} = T^{(\beta)} = \dots = T^{(\pi)} \quad (1)$$

$$P^{(\alpha)} = P^{(\beta)} = \dots = P^{(\pi)} \quad (2)$$

$$\mu_i^{(\alpha)} = \mu_i^{(\beta)} = \dots = \mu_i^{(\pi)} \quad (i = 1, 2, 3, \dots, N) \quad (3)$$

onde T é temperatura; P é pressão; μ é o potencial químico; α , β , π representam as fases em equilíbrio; i representa os componentes do sistema.

4.3.1 Regra das fases de Gibbs

A regra das fases de Gibbs (equação 4) demonstra que, em um sistema constituído por duas fases e dois componentes, existem dois graus de liberdade.

$$F = N - \pi + 2 \quad (4)$$

onde F é o número de graus de liberdade e é definido como o número de variáveis intensivas para definir uma condição de equilíbrio termodinâmico de um dado sistema.

Nessa situação, duas condições, como pressão e temperatura determinam completamente a composição de um sistema em equilíbrio. Desse modo, a composição do sistema binário em equilíbrio é única ao se especificar a pressão e temperatura do mesmo. Cada componente adicional permite um grau de liberdade a mais, representado pela concentração do mesmo em uma das fases. A temperatura e pressão constantes, quando a concentração em uma das fases é especificada, sua concentração na outra fase não pode ser alterada livremente (PRAUSNITZ; LICHTENTHALER; AZEVEDO, 1999).

4.3.2 Equilíbrio líquido-líquido

Quando dois líquidos são misturados em certas condições de temperatura e pressão, e duas fases líquidas de diferentes concentrações são geradas quando se atinge o equilíbrio, então há o fenômeno do equilíbrio líquido-líquido (ELL) (SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2005).

A pressão e temperatura constantes, a equação geral de ELL é dada pela igualdade:

$$x_i^\alpha \gamma_i^\alpha = x_i^\beta \gamma_i^\beta \quad (5)$$

onde x_i é a fração molar de cada componente i ; α e β representam as duas fases líquidas do sistema; γ_i o coeficiente de atividade de cada componente.

De acordo com Treybal (1963), o efeito da pressão sobre o ELL é relativamente insignificante. Esta constatação limita a discussão a sistemas condensados e considera como variáveis a serem analisadas apenas a temperatura e a concentração dos componentes nas fases líquidas.

A partir da definição de uma solução ideal, na determinação de fugacidade em misturas líquidas deve-se calcular os desvios em termos das funções em excesso, que são os termos que relacionam as propriedades da solução real à ideal. Essas funções levam a expressões para o cálculo de fugacidade através dos coeficientes de atividade, que são definidos em função da energia de Gibbs em excesso parcial molar.

$$RT \ln \gamma_i = g_i^E = \left(\frac{\partial g^E}{\partial n_i} \right)_{T,P,n_j} \quad (6)$$

onde R é a constante universal dos gases; T é a temperatura do sistema; n_i é o número de mols de cada componente i; g^E é a energia de Gibbs em excesso; γ_i é o coeficiente de atividade de cada componente i (SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2005).

4.4 Sistemas aquosos bifásicos (SABs)

Os SABs são sistemas de duas fases líquidas imiscíveis que coexistem em equilíbrio, cujo solvente principal é a água, e geralmente é o componente majoritário em ambas as fases, fazendo com que sejam meios pouco agressivos a biomoléculas susceptíveis à desnaturação e/ou perda de atividade (GIULIANO, 1995). Esta definição exclui os sistemas tradicionais formados por água e solventes orgânicos (hidrocarbonetos cíclicos ou aromáticos, álcoois de cadeia longa entre outros), (MA et al., 2005).

Os SABs são geralmente formados por uma combinação de soluções aquosas de dos polímeros (ALBERTSSON, 1986), polímero + sal (ZASLAVSKY, 1995) e sal inorgânico + líquido iônico (BRIDGES; GUTOWSKI; ROGERS, 2007). A eficácia relativa de separação de fases de cada sal é correlacionada conforme a série de Hofmeister (HOFMEISTER, 1888), a qual corresponde a uma classificação dos íons presentes nos sais com base na sua capacidade de causar o efeito *salting-out* (ANANTHAPADMANABHAN; GODDARD, 1987). O fenômeno de *salting-out* consiste

na diminuição de solubilidade de um soluto quando é adicionado um outro soluto (sal) à solução devido ao efeito do eletrólito na solubilidade do não eletrólito e o conseqüente aumento na energia livre de Gibbs para a dissolução da molécula de proteína.

Os SABs baseados em combinação de polímero + sal possuem diversas aplicações como, por exemplo, separação, concentração e fracionamento de solutos e partículas biológicas, tais como proteínas (DREYER; KRAGL, 2008).

4.4.1 Uso dos SABs em processos de extração e purificação

A aplicação dos SABs para a partição de espécies foi iniciada em 1956, quando foi investigada a separação de partículas biológicas de origem vegetal em um sistema composto por água, KH_2PO_4 ou K_2HPO_4 e polietilenoglicol (PEG 4000) (ALBERTSSON, 1956). A partir desse estudo, muitos surgiram para avaliar a aplicação destes sistemas na separação de diversas moléculas.

Os SABs mais comumente utilizados em processos de purificação são constituídos por polímeros + sal + água. Em comparação com os sistemas tradicionais que envolvem misturas de duas soluções aquosas poliméricas, os sistemas polímero/sal se destacam por possuírem menor viscosidade, menor tempo de separação das fases e sobretudo, elevada seletividade na separação de moléculas com base na solubilidade (AZIMAIE et al., 2010) Estes fatores possibilitam sua maior aplicação em escala industrial (FRANCO; ANDREWS; ASENJO, 2000).

A principal desvantagem dos sistemas contendo polímero + sal está na partição dos produtos alvo para a fase rica em polímero (FRP) ou para a fase rica em água (FRA), contendo sal, o que leva a dificuldade nas etapas de purificação subseqüentes (KEPKA et al., 2004). Esses sistemas requerem extração reversa em fase inferior rica em sal, ou operações adicionais e complicadas (como cromatografia de troca iônica, diafiltração, cristalização ou ultrafiltração) para separar os componentes de interesse de uma das fases (DEMBCZYŃSKI et al., 2010). Adicionalmente, diversos trabalhos usam os SABs na separação de bioelementos (pigmentos naturais do urucum, bromelaína, cefazolina).

Os SABs formados por PEG (1500 ou 4000 ou 6000 g/mol) ou copolímero tribloco L35 (2000 g/mol) + citrato de sódio + água foram estudados para recuperar os pigmentos naturais do urucum. O coeficiente de partição dos componentes do urucum

mostraram dependência do pH, temperatura, concentração de surfactante, massa molar e hidrofobicidade do polímero e natureza do eletrólito (JUNQUEIRA et al., 2018).

O SAB contendo PEG113-b-PNIPAM149 adicionado dos sais $K_3C_6H_5O_7$, $K_2C_4H_4O_6$, $K_2C_2O_4$, $Na_2C_4H_4O_6$ e $(NH_4)_2C_4H_4O_6$ demonstrou excelente extração e biocompatibilidade para bromelaína, apresentando 94,87 % de eficiência de separação e mantendo 77,06 % da atividade inicial da enzima (WANG et al., 2019).

A extração da cefazolina foi estudada em SABs formados por PEG (6000 e 8000 g/mol) + água + citrato de sódio ou tartarato de sódio ou sulfato de sódio. Dentre esses o sistema com maior região bifásica é o conformado por PEG 8000 e citrato de sódio, cujo coeficiente de partição do soluto aumenta com a concentração do polímero e reduz com a massa molar do polímero. O citrato de sódio extraiu mais cefazolina que os demais sais utilizados, atingindo um coeficiente de partição de 13,4 e uma recuperação de 90,5 % na FRP para o sistema contendo PEG 6000 16 % (m/m) e citrato de sódio 14 % (m/m) (GHAFARI et al., 2019).

4.4.2 Parâmetros de caracterização do ELL dos sistemas constituídos por polímero + sal + água

Na Figura 2 é apresentado um esquema que apresenta o ELL de um SAB constituído por polímero + água + sal. A linha que separa a região monofásica da bifásica é chamada de curva binodal, e a linha que liga dois pontos de composição sobre a linha binodal, passando por um ponto de composição global que resulta nas fases com as respectivas composições, é chamada de linha de amarração ou de ligação.

No cálculo de comprimento das linhas de amarração (CLA), que está relacionada com a diferença da composição entre a FRA e FRP, foi calculada usando a equação 7. No cálculo da inclinação das linhas de amarração (ILA), foi feito através de a equação 8, que relaciona a variação da fração mássica do polímero pela variação da fração mássica do sal nas FRA e FRP.

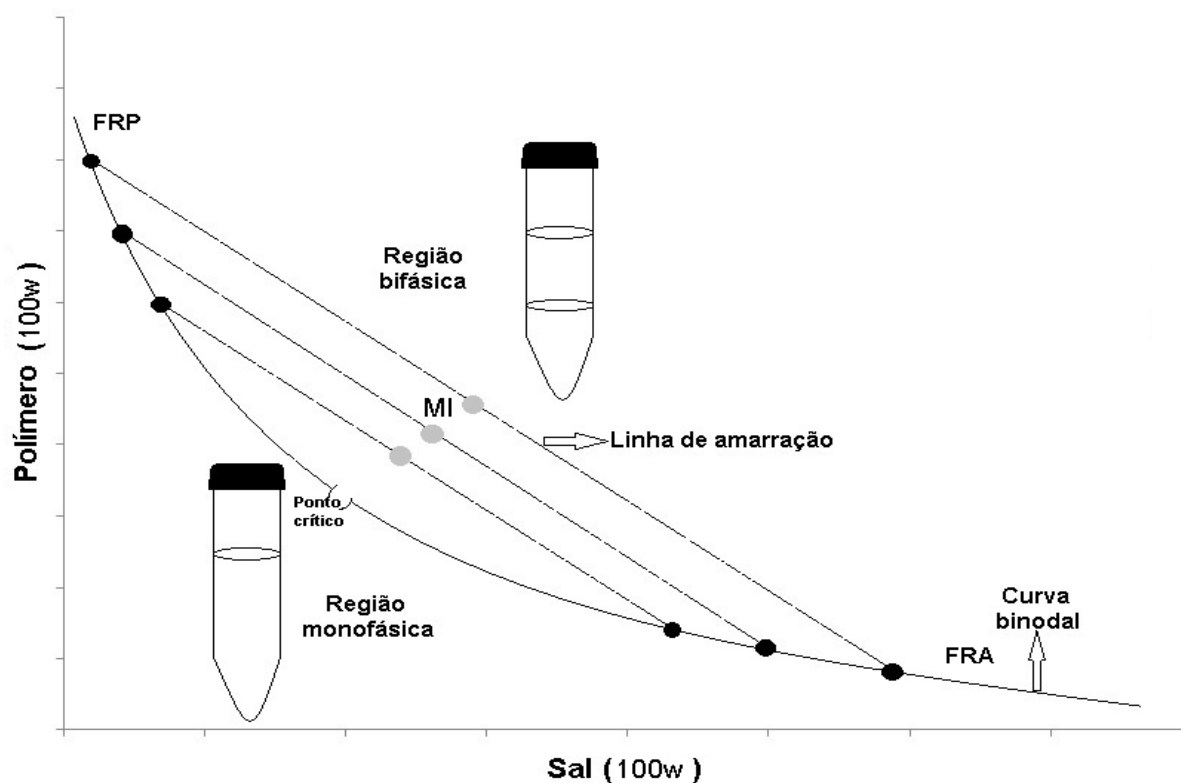


Figura 2 - Diagrama de fases de SAB expresso em coordenadas retangulares

Fonte: Próprio autor

$$CLA = \sqrt{(w_{sal}^{FRA} - w_{sal}^{FRP})^2 + (w_{polimero}^{FRA} - w_{polimero}^{FRP})^2} \quad (7)$$

$$ILA = \frac{w_{polimero}^{FRA} - w_{polimero}^{FRP}}{w_{sal}^{FRA} - w_{sal}^{FRP}} \quad (8)$$

Uma medida quantitativa do efeito *salting-out* do sal sobre o polímero no SABs investigados pode ser realizada usando uma equação do tipo Setschenow (HEY, JACKSON, YAN 2005; SETSCHENOW, 1889):

$$\ln\left(\frac{C_p^{FRP}}{C_p^{FRA}}\right) = k_p(C_p^{FRP} - C_p^{FRA}) + k_s(C_s^{FRP} - C_s^{FRA}) \quad (9)$$

onde C_p^{FRP} , C_s^{FRA} , k_p e k_s , referem-se, respectivamente, a concentração em molalidade do polímero, a concentração em molalidade do sal, um parâmetro que relaciona o coeficiente de atividade do polímero à sua concentração e o coeficiente de *salting-out*, respectivamente.

4.4.3 Obtenção da composição das linhas de amarração por meio da metodologia de Merchuk

Um método gravimétrico simples para a determinação das linhas de amarração em SABs ternários, pode ser usado, sem precisar de análises químicas da composição das fases (MERCHUK, 1997; MERCHUK; ANDREWS; ASENJO, 1998). O procedimento consiste na seleção de um ponto de mistura no plano de fase, a partir do qual a linha de amarração passa. Os componentes deste ponto são pesados e misturados para contato íntimo, e então deixados em repouso sob temperatura controlada até atingir o ELL. As fases são coletadas até o limite da interface e pesadas.

A partir dos dados obtidos por este procedimento, bem como da obtenção das equações matemáticas que representam o comportamento da composição da curva binodal dos sistemas, as seguintes equações de balanço de massa podem ser escritas:

$$w_{polimero}^{FRA} = \left(\frac{w_{polimero}^{MI}}{\alpha} \right) - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) * w_{polimero}^{FRP} \quad (9)$$

$$w_{polimero}^{FRA} = f(w_{sal}^{FRA}) \quad (10)$$

$$w_{polimero}^{FRP} = f(w_{sal}^{FRP}) \quad (11)$$

$$w_{sal}^{FRA} = \left(\frac{w_{sal}^{MI}}{\alpha} \right) - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) * w_{sal}^{FRP} \quad (12)$$

$$\alpha = \frac{(\text{massa FRA})}{(\text{massa da mistura inicial})} \quad (13)$$

onde $f(w_{sal})$ é a equação que representa a composição em fração mássica de polímero $w_{polimero}$ em função da fração mássica de sal na curva binodal; e os subscritos MI, FRP e FRA se referem respectivamente à mistura inicial, fase rica em polímero e fase rica em água do sistema.

A despeito dos possíveis desvios resultantes da pesagem das fases, a metodologia de Merchuk, que consiste em um balanço de massa entre os componentes dos sistemas, foi validada experimentalmente para sistemas constituídos por PEG (1000 g/ mol) ou PEG (2000 g/mol) + sulfato de amônio + água e por polivinilpirrolidona + sulfato de manganês + água, resultando para este último

em desvios médios entre as composições experimentais e calculadas das fases de topo e de fundo de, respectivamente, 0,7 % e 0,3 % (FILIPE HOBI, 2017). Adicionalmente, diversos trabalhos têm-se utilizado desta metodologia para o cálculo das composições das linhas de amarração de SABs, como por exemplo:

Sistemas contendo polietilenoglicol PEG (6000 g/mol) e PEG (8000 g/mol) e três sais de sódio, incluindo citrato de sódio, tartarato de sódio e sulfato de sódio foram examinados. Em primeiro lugar, as curvas binodais foram determinadas a 27 °C (GHAFFARI et al., 2019).

Sistemas formados por um copolímero tribloco (L64) ou (F68), sais sulfato (Cu^{+2} ou Fe^{+3}) e água foram investigados os efeitos da temperatura a 5 °C, 15 °C e 25 °C. Um aumento na temperatura diminuiu a região bifásica para todo o sistema. Cu^{+2} e F68 foram mais capazes de induzir a separação de fases em comparação com Fe^{+3} e L64. (DA SILVA GONÇALVES et al., 2018) .

Sistemas contendo tartarato de potássio e PEG (1500 g/mol) ou (6000 g/mol) foram determinados experimentalmente em diferentes valores de pH 6,41; 7,74 e 9,05 e temperaturas de 25 °C e 35 °C. Verificou-se que o aumento na temperatura e pH levou ao deslocamento da curva binodal e ao aumento da região de duas fases. (BARANI et al., 2018).

SABs contendo PEG (1500 g/mol) ou (4000 g/mol) ou (6000 g/mol) e tiosulfato de sódio penta-hidratado a diferentes temperaturas 20 °C e 40 °C sob pressão atmosférica. Correlações de dados experimentais de curvas binodais foram realizadas usando a metodologia Merchuk. Os efeitos da temperatura e da natureza do ânion dos sais nas curvas binodais foram discutidos. Em comparação com outros ânions previamente investigados, a capacidade de salting-out do ânion tiosulfato foi entre aqueles de ânions citrato e tartarato. (OLIVEIRA et al., 2018).

4.4.4 Influência da temperatura no ELL

A temperatura tem um efeito determinante no comportamento do ELL uma vez que altera a miscibilidade entre os componentes dos sistemas. Este efeito depende dos constituintes dos mesmos, podendo causar aumento/aparecimento ou diminuição/desaparecimento da região bifásica, bem como alteração na partição dos componentes.

A elevação da temperatura pode promover um aumento na região bifásica para os

sistemas constituídos por: polipropilenglicol (PPG) (400 g/mol) + citrato de sódio + água a 20 °C, 35 °C e 45 °C (HAMZEHZADEH; ZAFARANI-MOATTAR, 2015), PEG 4000 + tartarato de sódio + água a 25 °C, 35 °C e 45 °C (ZAFARANI-MOATTAR; HAMZEHZADEH; HOSSEINZADEH, 2008) e PEG (6000 g/mol) + tungstato de sódio + água a 25 °C, 35 °C, 40 °C e 45 °C (SADEGHI; GOLABIAZAR, 2010). Também o aumento temperatura pode provocar uma redução na região bifásica para os sistemas constituídos por: polímero L64 (massa molar média 2900 g/mol e 1,4 % (m/m) de polióxido de propileno - PEO) + sulfato de cobre + água a 5 °C e 25 °C, polímero L64 + sulfato de ferro II+ água a 5 °C e 25 °C, polímero F68 (massa molar média 8400 g/mol 1,8 % (m/m)), polímero F68 + sulfato de ferro II + água 5 °C e 25 °C e polímero F68 + sulfato de cobre + água a 5 °C e 25 °C (DA SILVA GONÇALVES et al., 2018).

No entanto, em outro estudo o aumento da temperatura não apresentou efeito relevante nas curvas binodais dos sistemas: PPG (400g/mol) + sulfato de sódio ou sulfato de magnésio + água a 25 °C, 35 °C e 45 °C (MARTINS et al., 2010), PEG de diferentes massas molares (400 g/ mol, 4000 g/ mol, 6000 g/mol) + sulfato de sódio + água a 20 °C, 40 °C e 60 °C (DE ARAUJO SAMPAIO et al., 2016).

4.4.5 Influência do pH no ELL

Em SABs formado por PPG 400p + citrato de sódio / ácido cítrico + água á temperaturas de 25 °C e pH 3, 4, 5, 6 e 7, a alteração no pH tem uma influência significativa no comportamento da curva binodal, expandindo a região bifásica com o aumento no pH do sistema (HAMZEHZADEH; ZAFARANI-MOATTAR, 2015).Comportamento similar foi observado para SABs formado por PEG (1500 g/mol) ou PEG (6000g/mol) + tartarato de potássio / ácido tartárico + água, nos quais o aumento no pH aumentou a região bifásica da curva binodal (BARANI et al., 2018).

O pH pode desempenhar um papel importante em SABs contendo polímeros termoseparáveis, uma vez que modifica a concentração do polímero e influencia a partição do produto alvo. Alguns bioprodutos; tais como plasmídeos tais como plasmídeos, invertase, lipase, amilase bem como poli-hidroxialcanoatos (PHAs) têm uma atividade ótima dentro do intervalo de pH (LEONG et al., 2016).

4.4.6 Influência do sal no ELL de SABs

A adição de sais promove a diferença na hidrofobicidade entre as fases, causando uma diminuição no PN devido à maior hidrofiliabilidade na fase rica em água (JOHANSSON; KARLSTRÖM; TJERNELD, 1997).

Hofmeister (1888) avaliou a capacidade que certos sais possuem em precipitar proteínas quando presentes em soluções aquosas. A eficácia deste processo aumenta com a capacidade que o respectivo sal possui em “organizar” as moléculas de água que estão próximas a ele. Dessa forma, Hofmeister classificou os sais em um grupo com maior eficiência na solubilização das proteínas (salting in) e em outro grupo que possui maior eficiência na precipitação de proteínas (salting out). Esta classificação descreve a Série de Hofmeister, também conhecida como série liotrópica, conforme apresenta a Figura 3 (TADEO; PONS; MILLET, 2007).

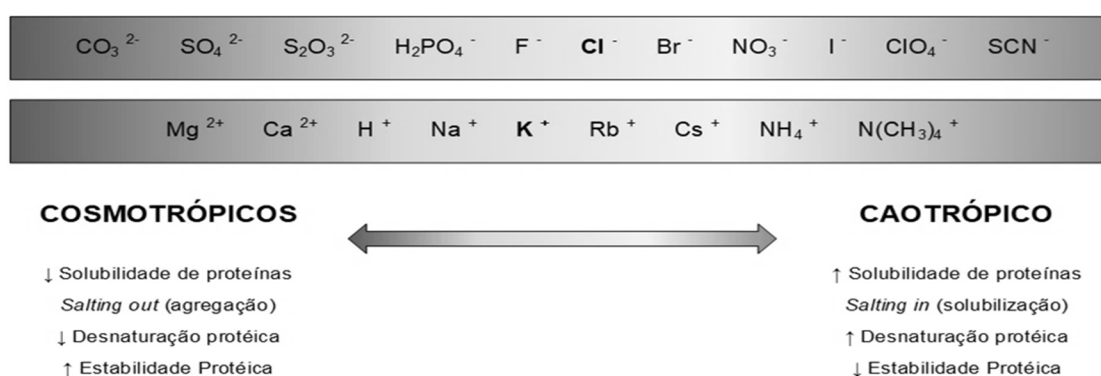


Figura 3 - Série de Hofmeister apresentando a ordem dos íons classificados em cosmotrópicos e caotrópicos

Fonte: Adaptado de HOFMEISTER (1888); ZHANG, CREMER (2006)

Os íons produzem efeitos na formação de ligações de hidrogênio formadas com a água, resultando em diferentes formas de ordenação das moléculas ao seu redor. Portanto, na Série de Hofmeister os íons são classificados em: cosmotrópicos, que possuem maior capacidade de estruturar as moléculas de água e de estabilizar proteínas; e os caotrópicos, que desestabilizam proteínas e possuem baixo potencial de estruturação das moléculas de água (ZHANG; CREMER, 2006).

No estudo do sistema constituído por PEG 2000 + sais + água a 30 °C foi observado que a concentração de sais necessárias para formar duas fases segue a ordem crescente: $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{K}_3 > \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (BOLAR;

BELUR; IYYASWAMI, 2013).

Seis novos SABs foram preparados combinando PEG 600 g/mol com citrato de potássio, hidrogenofosfato de dipotássio, formiato de sódio, formiato de potássio, sulfato de sódio e sulfato de lítio a uma temperatura de 23 °C. A capacidade de cada íon para induzir a formação de SABs foi investigada. O cátion Na^+ mostrou-se mais eficaz na formação de SABs que K^+ e Li^+ . Para os sais de potássio, a ordem observada para a eficácia na formação de SABs dos ânions foi: $\text{HPO}_4^{2-} > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-} > \text{HCO}_2^-$. Em relação aos sais de sódio, verificou-se que SO_4^{2-} é claramente mais eficaz que o HCO_2^- (SILVÉRIO et al., 2013).

Para SABs contendo PEG 8000 g/mol e uma série de oito eletrólitos: NaOH , Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , ZnSO_4 a temperatura de 25 °C. Demonstraram a eficácia relativa dos ânions na indução da formação de duas fases: $\text{PO}_4^{3-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{OH}^-$. Para os sais de sódio, a eficácia relativa dos ânions na formação de misturas bifásicas segue a série de Hofmeister. A eficácia relativa da salinização dos sais de sulfato, no entanto, é provavelmente influenciada pela complexação dos cátions pelo PEG (HEY; JACKSON; YAN, 2005).

Adicionalmente ao efeito sobre os polímeros dos SABs, os ânions e cátions dos sais agem sobre as biomoléculas a serem extraídas por meio destes sistemas. Este efeito está relacionado à diferença de potencial elétrico entre as duas fases (potencial de Donnan) formada pela partição dos cátions e ânions entre as duas fases que gerará uma força eletroquímica e subsequente influenciará a partição de biomoléculas e / ou outras partículas carregadas no sistema (KEPKA et al., 2004). Com o aumento da hidrofobicidade do ânion pela adição de grandes íons monovalentes como Et_3NH^+ , Cl^- e ClO_4^- , o coeficiente de partição aumentou para biomoléculas carregadas positivamente, enquanto diminuiu para biomoléculas carregadas negativamente (BERGGREN; JOHANSSON; YJERNELD, 1995). No entanto, deve-se lembrar que as proteínas anfífilas, que possuem baixa solubilidade, tendem a particionar na fase rica em água (PERSSON et al., 1998).

4.4.7 Equilíbrio líquido-líquido para sistemas contendo Triton X-114 + água

O Triton™ X-114 - éter terc-octilfenílico de propilenglicol é um polímero não iônico de massa molar média de 537 g/mol (baseado em 7,5 unidades de óxido de etileno), o PN em água é 23 °C. Ele não é agressivo para as enzimas, podendo as mesmas

serem extraídas em sua forma natural sem perda de atividade. O Triton X-114 pode ser usado em grande escala no fracionamento e na purificação de enzimas sendo facilmente repetitividade e de custo relativamente baixo, considerando seu reaproveitamento (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1994).

Na Figura 4 é mostrada a estrutura de um monômero de Triton X-114, onde “n” indica o número de unidades de óxido de etileno em uma extremidade da cadeia.

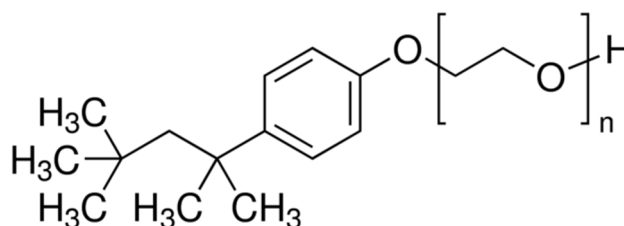


Figura 4 - Estrutura do Triton X-114, n = 7 - 8

Fonte: Adaptado de Sigmaaldrich.com (2019)

A presença de aditivos orgânicos (por exemplo, açúcares, aminoácidos, vitaminas, etc.) sobre o PN do Triton X-114 mostra uma relação direta entre a concentração do componente adicionado e o aumento do PN (KOSHY; SAIYAD; RAKSHIT, 1996). Os ânions e cátions, respectivamente, exercem efeito sobre o PN do Triton X-114 (5 mM) de maneira crescente na seguinte ordem: $F^- > Cl^- > Br^-$ e $NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$ (ALAM et al., 2015). Nove sistemas ternários constituídos por Triton X-114 + sal + água a 30 ° C, foram estudados visando avaliar o efeito de cinco sais de sódio (NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄ e Na₂HPO₄) e de quatro sais de cloro (NaCl, KCl, LiCl, NH₄Cl) sobre o PN dos sistemas. Neste estudo foi reportado pelos autores o efeito decrescente sobre o aumento da temperatura do PN para os cátions $Na^+ > K^+ > NH_4^+ > Li^+$ e para ânions $HPO_4^{2-} \approx SO_4^{2-} > Cl^- > Br^- > I^-$. Estes resultados, com exceção do lítio, coincidem com a série de Hofmeister. Foi observado um efeito *salting out* para todos os sais, exceto para o NaI, o que é favorável para aplicações em processos de extração (RITTER et al., 2016).

4.5 Enzimas isoladas

De modo geral o uso de enzimas isoladas na catálise de reações é vantajoso uma vez que a enzima de interesse geralmente catalisa apenas a reação desejada, bem

como possibilita que esta seja realizada na presença de concentrações menores de água, nas temperaturas e pHs ótimos do biocatalisador, condições facilmente controladas em processo de conversão, uso de sistemas de equipamentos mais simples, maior facilidade no controle e monitoramento das reações, especificidade para a reação selecionada e melhor tolerância à presença de solventes. Entre as desvantagens temos elevado custo das enzimas isoladas e possível necessidade de adição de cofator enzimático (DAVIES et al., 1989).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

Os componentes químicos usados no presente trabalho foram: Triton X-114 (Sigma Aldrich, pureza $\geq 99\%$); sulfato de sódio anidro (Synth, pureza $> 99,0\%$); citrato de sódio anidro (Synth, pureza $> 99,0\%$); tartarato de sódio dihidratado (Synth, pureza $> 99,0\%$); ácido sulfúrico concentrado (Dinâmica, 97-98%); ácido tartárico (Synth, pureza $> 99,5\%$); ácido cítrico (Synth, pureza $> 99,0\%$), hidróxido de sódio (Dinâmica, pureza $> 99,0\%$); ácido 3,5-dinitrosalicílico (Dinâmica, pureza $> 99,0\%$); tartarato duplo de sódio e potássio (Synth, pureza $> 99,0\%$); D-Glicose anidra (Synth, pureza $> 99,0\%$) e água desmineralizada.

5.2 Métodos experimentais

5.2.1 Determinação da curva de solubilidade do sistema Triton X-114 + água

A solução aquosa de um agente tensoativo não-iónico tem seu ponto de turvação caracterizado pela temperatura na qual ocorre sua imiscibilidade com um dado solvente. Nesta temperatura o surfactante e a água se separam e a solução previamente límpida se torna turva. Esta temperatura micelar crítica pode ser considerada como aquela na qual é atingido o limite de solubilidade do surfactante nessa solução particular (MITCHELL et al., 1983).

A determinação do ELL para o sistema binário Triton X-114 + água, foi obtida por meio da titulação adicionando água bidestilada em uma solução de polímero, sob agitação (agitador Gehaka, AA-840) a temperatura controlada por um banho termostático com circulação de água (Tecnal, TE-2005, $\pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$) até que o sistema apresentasse turvação (ponto de névoa). Obtida a composição do PN em uma dada temperatura, o mesmo processo foi repetido.

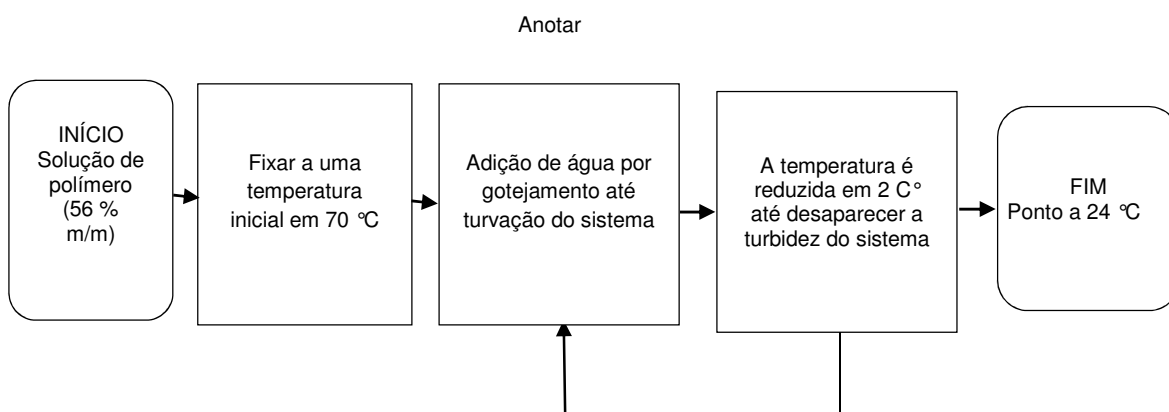


Figura 5 - Diagrama para determinação da curva de solubilidade do sistema Água (1) + Triton X-114 (2)

Fonte: Próprio autor

5.2.2 Determinação das curvas binodais

A determinação das composições das curvas binodais e, conseqüentemente, das regiões de separação de fase para os sistemas contendo sais (sulfato de sódio, citrato de sódio ou tartarato de sódio) + Triton X-114 + água, a temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C foi realizada por titulação turbidimétrica. Este método consistiu em titular a solução rica em sal na solução de polímero, bem como uma solução rica em polímero em uma solução salina até que o sistema apresente turvação (PN). Os experimentos realizados sob agitação constante usando um agitador magnético (modelo - AA-840, Gehaka, Brasil) utilizando uma célula de vidro encamisada conectada a um banho termostático com circulação de água (modelo - TE-2005, Tecnal, Brasil) O esquema do aparato experimental utilizado na etapa de obtenção de dados para construção das curvas binodais é representado na Figura 6.

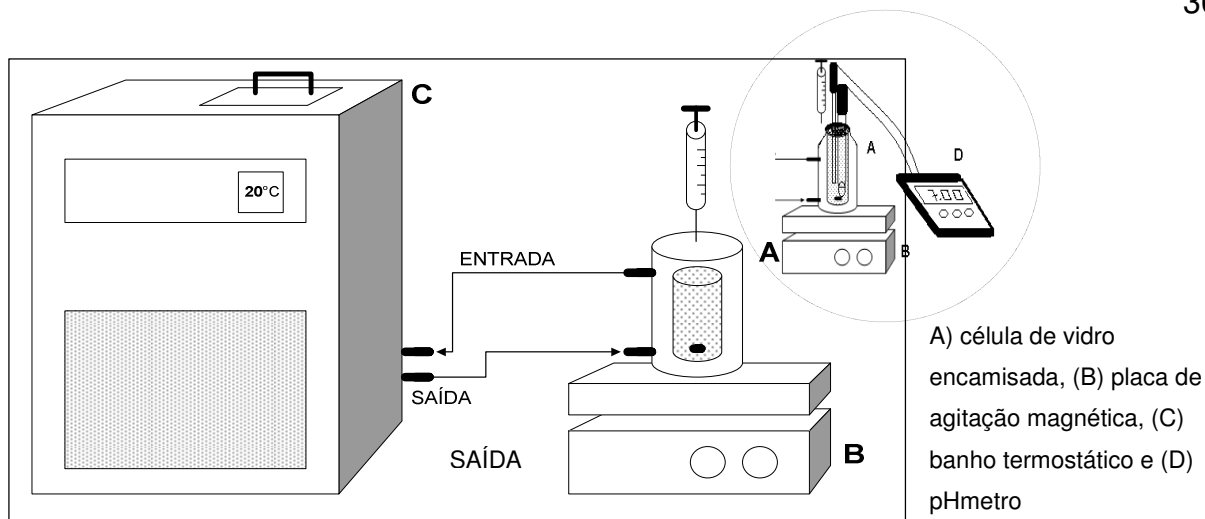
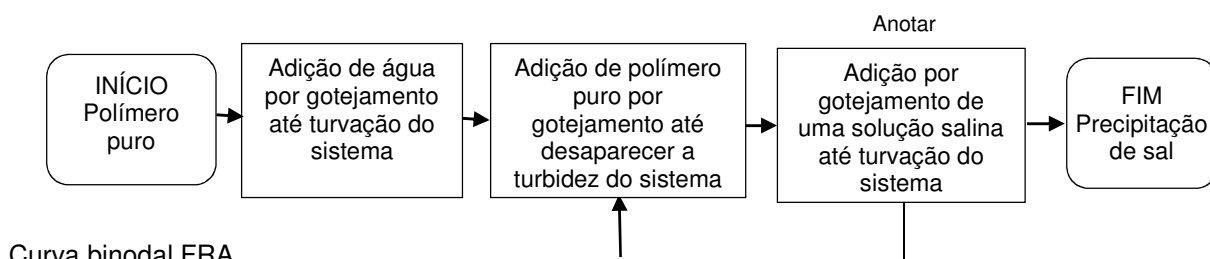


Figura 6 - Esquema para a determinação dos pontos experimentais das curvas binodais nas FRP e FRA

Fonte: Próprio auto

O PN foi encontrado por meio do gotejamento de soluções salinas, soluções poliméricas, água e polímero puro em uma célula de vidro encamisada. As temperaturas nas células foram controladas por meio de um banho termostático (modelo - TE-2005, Tecnal, Brasil). A mistura dos componentes na célula de equilíbrio foi realizada por meio de uma placa de agitação magnética com aquecimento (Modelo - AA-840, Gehaka, Brasil). No gotejamento, foram empregadas seringas de polipropileno e polietileno sem embolo com volume de 20 mL. As massas dos componentes gotejados na célula foram obtidas por meio da pesagem das mesmas em uma balança analítica (modelo – AUY-220, precisão +/- 0,0001 g, Shimadzu, Japão). Os componentes foram adicionados às células, partindo-se de uma total limpidez do sistema, quando o sistema está na região de miscibilidade total, até a observação da turvação do sistema, quando é caracterizada a formação da região de duas fases, sendo aguardado cerca de 3 min para confirmar que a mesma não desaparecia. A massa gotejada de cada componente necessária para cada transição do sistema (límpido para turvo; turvo para límpido) foi anotada. Este processo foi repetido para diferentes faixas de frações mássicas de polímero, água e sal, e está representado no fluxograma apresentado na Figura 7.

Curva binodal FRP



Curva binodal FRA

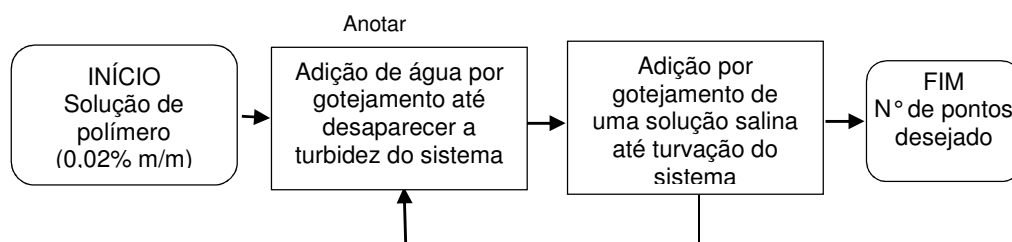


Figura 6 - Diagrama de blocos para a determinação dos pontos experimentais das curvas binodais nas FRP e FRA

Fonte: Próprio autor

Após determinadas as frações mássicas de cada ponto, foram obtidas as curvas binodais, plotando no diagrama a fração mássica de polímero em função da fração mássica do sal, para a faixa de composição estudada. Deste modo foram obtidas as composições das regiões com maiores e menores concentrações de Triton X-114 que delimitam a região de separação de fases para os sistemas.

5.2.3 Determinação das curvas binodais a diferentes pHs

O pH dos sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal, foi medido por um medidor de pH (modelo TEC-7, Tecnal, Brasil) com um eletrodo de pH padrão de platina (modelo PY-P11, precisão +/- 0,002) e o valor foi de aproximadamente 7,5.

O pH dos sistemas contendo citrato de sódio ou tartarato de sódio foi ajustado utilizando-se soluções tampões de, respectivamente, citrato de sódio + ácido cítrico e tartarato de sódio + ácido tartárico, determinados pelo medidor de pH. Por sua vez, ajuste do pH para o valor 10 foi realizado por meio da adição de NaOH, que devido a força ácido base dos mesmos, necessita de concentrações muito inferiores às dos constituintes das soluções tampão para o ajuste até o pH desejado.

A determinação das composições das curvas binodais a 20 °C dos sistemas em pH 5 ou pH 10 foi feito por meio de titulação da solução tampão em uma solução inicial polimérica, em célula de equilíbrio com temperatura controlada por banho termostático, até a solução ficar turva; que indicou a formação de duas fases líquidas. Nos sistemas nos quais foram utilizados ácido sulfúrico para pH 5 e hidróxido de sódio para pH 10. As titulações foram utilizadas seringas de polipropileno de 20 mL.

De acordo com a quantidade de titulante adicionada até que a turbidez fosse observada, a fração mássica de cada ponto na curva binodal foi calculada por meio da pesagem da seringa usando a balança analítica. O procedimento é repetido até precipitação de sal.

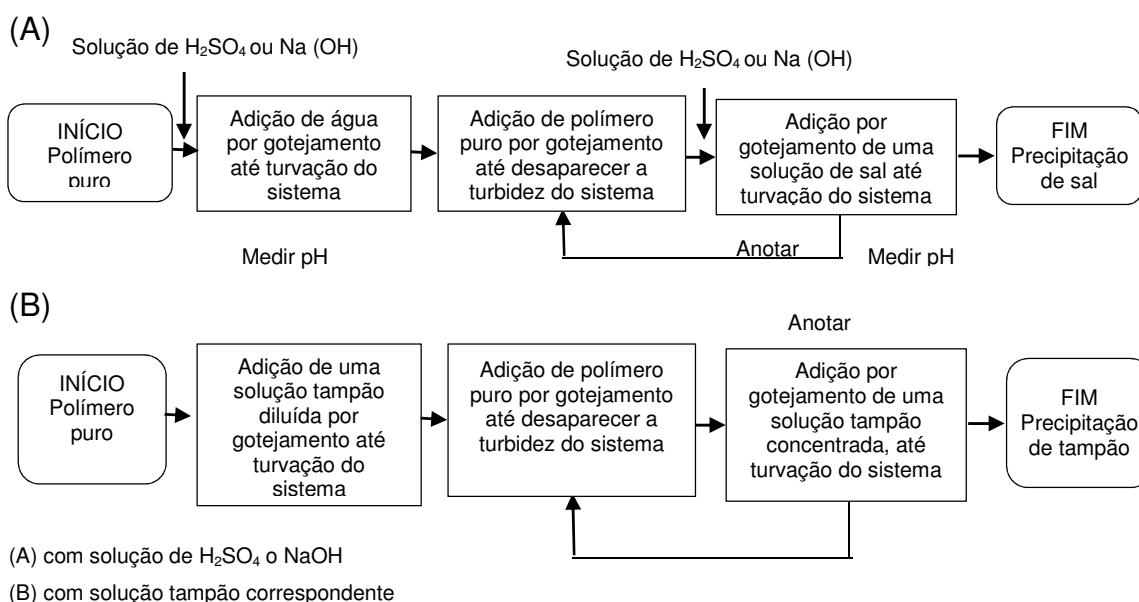


Figura 7 - Diagrama de blocos para a determinação dos pontos experimentais das curvas binodais na FRP a diferentes pHs a 20 °C

Fonte: Próprio autor

5.2.4 Determinação das frações mássicas das linhas de amarrações

A determinação das frações mássicas da binodal referente a cada linha de amarração foi feita a partir do método proposto por Merchuk (MERCHUK, 1997). O presente método baseia-se na coleta e pesagem das fases em ELL. O cálculo da composição das fases é feito a partir das massas das fases em ELL, da massa da

composição global e dos modelos ajustados para determinação das composições das curvas binodais. Deste modo é formado um sistema de quatro equações (7, 8, 9 e 10) e a solução das mesmas resulta na composição das fases superior e inferior das linhas de amarração dos sistemas. A obtenção das massas das fases em equilíbrio é realizada como descrito a seguir.

As composições iniciais para cada sistema foram selecionadas para a região de separação de fases das binodais obtidas a partir do método do PN. Os sistemas foram preparados em tubos de centrifuga tipo Falcon com fundo cônico, no qual foram adicionadas, massas conhecidas de Triton X-114, água, sal (sulfato de sódio ou citrato de sódio ou tartarato de sódio) de forma a obter uma massa total do sistema de aproximadamente 10 g. A mistura foi agitada em agitador vortex (Modelo AV-2, GEHAKA, Brasil) por cerca de 5 minutos. Em seguida as amostras foram mantidas em repouso em banho termostático á temperatura constante (10 °C; 20 °C ou 30 °C) por um período mínimo de 24 horas. Após este tempo, constatando-se que a interface apresentou-se bem definida e as fases superior e inferior apresentavam-se homogêneas e límpidas, as mesmas foram separadas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, e pesadas separadamente, até o limite da interface entre elas.

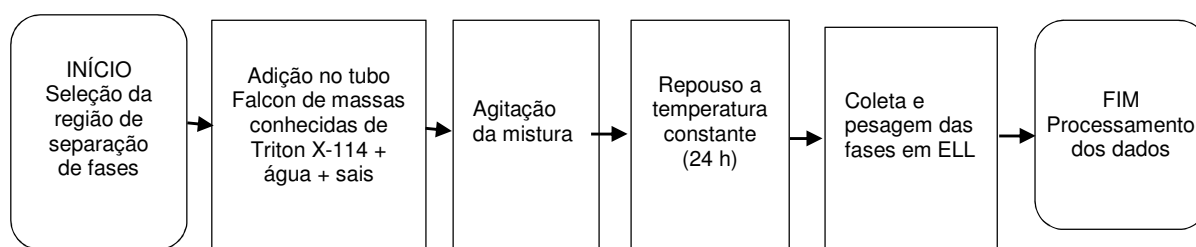


Figura 8 - Diagrama de blocos para a determinação das frações mássicas das linhas de amarrações a diferentes temperaturas

Fonte: Próprio autor

5.2.5 Determinação da partição de glicose

O coeficiente de partição da glicose (K_G) foi definido como a razão entre as concentrações de glicose na fase superior (C_{FRP}) e na fase inferior (C_{FRA}).

$$K_G = \frac{C_G^{FRP}}{C_G^{FRA}} \quad (14)$$

A determinação do coeficiente de partição da glicose (equação 14) foi feita para os sistemas quaternários a 20 °C constituídos por Triton X-114 + água + sal (sulfato de sódio ou citrato de sódio ou tartarato de sódio) + glicose, com esta última em frações mássicas de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25.

De modo a se avaliar uma condição aproximada de diluição infinita, na qual a presença de glicose não tem interferência considerável no ELL dos sistemas, também foram determinados os coeficientes de partição a 20 °C da glicose adicionada ao ponto de mistura dos sistemas formados por Triton X-114 + água + sal (sulfato de sódio ou citrato de sódio ou tartarato de sódio) em fração mássica de 0,003.

Para completar foi adicionada glicose de 0,003 (m/m) em sistemas constituídos apenas por Triton X-114 + água a 30 °C, de modo a se avaliar o comportamento da glicose durante a termoseparação entre polímero e água.

Todos os ensaios referentes à partição da glicose foram realizados em tubos tipo Falcon, inicialmente agitados em vortex, sob temperatura controlada por banho termostático, similar ao descrito na figura 9. O sistema foi considerado em equilíbrio após, no mínimo, 24 hs de repouso, constatando-se interface bem definida e fases límpidas e homogêneas, quando foram coletadas alíquotas das fases superiores e inferiores.

A concentração de glicose das fases foi determinada analiticamente por meio do método para determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (VASCONCELOS; PINTO; DE ARAGAO, 2013), em triplicata, conforme resumido a seguir.

O reagente DNS foi preparado a partir da mistura entre uma solução (A) constituída por 10,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico dissolvidos em 200 mL de uma solução de hidróxido de sódio 2 M e uma solução (B) constituída por 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio dissolvidos em 500 mL de água. As duas soluções foram misturadas e o volume da mistura completado para 1000 mL.

A marcha analítica foi iniciada pela mistura de 0,5 mL de reagente DNS e 0,5 mL das fases em ELL em tubo de ensaio com tampa de rosca. Os tubos foram agitados vigorosamente e transferidos para um béquer com água em ebulição por 15 min. Para interromper a reação. Em seguida os tubos foram imersos em banho de gelo por alguns minutos. As substâncias dos tubos foram diluídas com água até um volume final de 5 mL e então homogeneizados. A absorbância foi obtida em um espectrofotômetro UV-visível (modelo - M51, Bel Photonic, Brasil) a 540 nm, sendo esta leitura

descontada de um branco sem a presença de glicose.

A curva de calibração foi obtida realizando-se o método descrito em soluções de diferentes concentrações de D-glicose conforme apresentada no Apêndice B.

A concentração de glicose foi determinada conforme descrito pelas equações (15 – 16).

$$C_G = abs \cdot f \cdot d \quad (15)$$

$$f = 1/tg(\alpha) \quad (16)$$

onde C_G é a concentração de glicose (g/L); abs é a absorvância lida a 540 nm; f é o fator de concentração; d é o inverso da diluição da amostra; $tg(\alpha)$ é o coeficiente angular da curva de calibração.

5.3 Abordagem teórica

As equações matemáticas que melhor descrevem o comportamento da curva binodal para FRA e FRP foram obtidas por meio de um software itálico de análise estatística.

Conhecendo-se a massa total e a composição global dos pontos de mistura dos sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal (sulfato de sódio ou citrato de sódio ou tartarato de sódio), e massa das fases coletadas separadamente, para cada linha de amarração calculada foi obtido o parâmetro α (equação 13) e foi reduzido um sistema constituído por quatro equações (equações 9 – 12) por meio do suplemento Solver, do programa Microsoft Excel TM, a partir da seguinte função objetivo.

$$\left[\left(\frac{w_{polimero}^{MI}}{\alpha} \right) - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha} \right) * w_{polimero}^{FRP} \right] - [f(w_{sal}^{FRA})] = 0 \quad (17)$$

Alterando w_{sal}^{FRP} com as restrições de que $1 \geq w_{sal}^{FRP} \geq 0$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Comportamento da curva de solubilidade do sistema Triton X-114 + água

Conforme pode ser observado na Figura 10, a formação de duas fases em ELL em um sistema constituído apenas por Triton X-114 + água é dependente da fração mássica de polímero na mistura e da temperatura. Entre 0 e 23,2 °C os líquidos são miscíveis, um sistema formado apenas por uma fase, independente da concentração de polímeros no sistema. Conforme a temperatura do sistema aumenta de 23,2 a 70 °C, a região bifásica é caracterizada por uma faixa maior de concentração de polímero.

Este comportamento se deve ao Triton X-114 ser um polímero termoseparável que quando forma sistema com água, o aumento da temperatura acima de sua temperatura crítica faz com que ocorra a formação de duas fases em equilíbrio, uma com concentrações maiores de polímero, e a outra na qual este componente está presente em concentrações muito reduzidas.

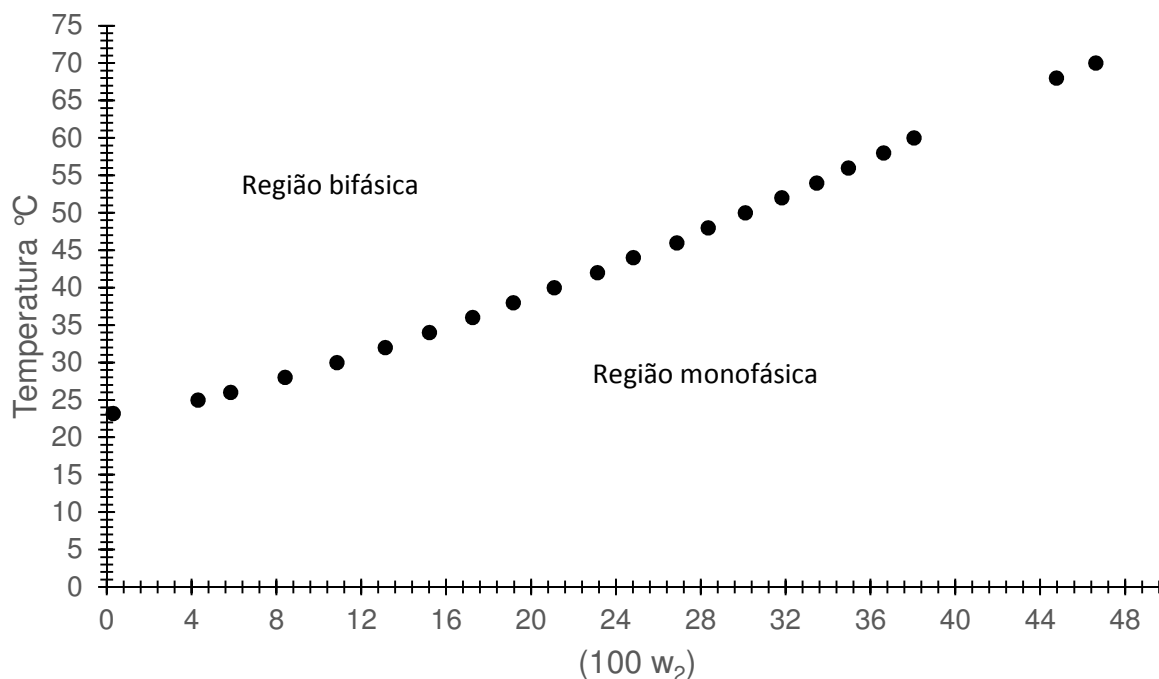


Figura 9 - Diagrama de fases do sistema água (1) + Triton X-114 (2)

Fonte: Próprio autor

Outros trabalhos na literatura reportam que para a temperatura micelar crítica para o Triton X-114 + água um pouco diferentes do valor encontrado neste trabalho: 22 °C (KOMAROMY-HILLER; VON WANDRUSZKA, 1995); 23 °C (INGRAM et al., 2012); 24,7 °C (SAFONOVA et al., 2014); 25 °C (GU; GALERA-GÓMEZ, 1995; KOSHY; SAIYAD; RAKSHIT, 1996). Entretanto, o comportamento da curva de solubilidade, nos trabalhos citados é semelhante ao reportado na Figura 10, mostrando similar aumento da miscibilidade dos componentes em função da elevação da temperatura.

6.2 Comportamento das curvas binodais para os sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal

Na Figura 11 é apresentada uma visão geral do comportamento das curvas binodais de cada sistema constituído por Triton X-114 + água + sal (sulfato de sódio ou citrato de sódio ou tartarato de sódio) nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C. O comportamento para cada região das curvas, bem como os efeitos da temperatura e sal utilizado são detalhados na sequência do texto, onde são apresentadas figuras específicas para o comportamento observado.

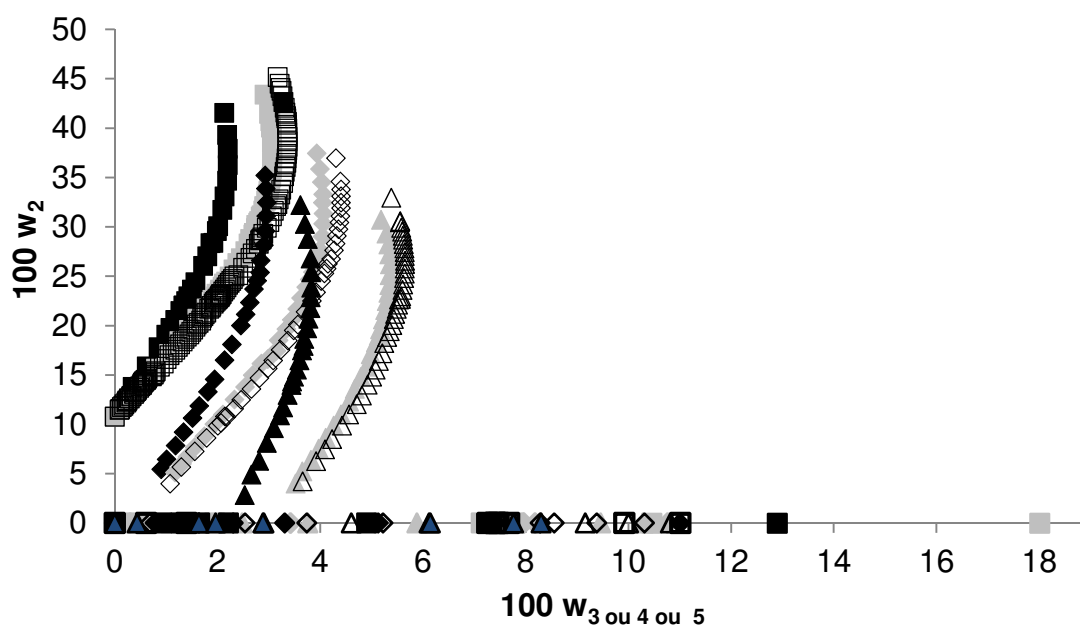


Figura 10 - Curvas binodais para os sistemas constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) (■, ◆, ▲) ou citrato de sódio (4) (□, ◇, △) ou tartarato de sódio (5) (□, ◇, △) nas temperaturas de 10 °C (▲, ▲, △); 20 °C (◆, ◆, ◇) e 30 °C (■, ■, □)

Fonte: Próprio autor

As curvas obtidas podem ser separadas em duas regiões distintas quanto a composição de polímero, uma contendo porcentagens mássicas maiores do que 2,5 %, a FRP, e a outra contendo porcentagens mássicas deste componente abaixo de 0,02 %, a FRA.

O aumento da temperatura resultou em uma maior região de separação de fases para todos os sistemas, indicando que ocorre uma maior segregação do polímero para a FRP, levando a uma maior separação deste da FRA como uma função direta deste parâmetro.

A Figura 12 representa o comportamento das curvas binodais para os sistemas contendo os três sais, nas três temperaturas estudadas, apenas para a FRP. Embora as composições da curva binodal tenham sofrido alterações, a tendência de comportamento é similar para cada sistema nas três temperaturas estudadas, com um comportamento aproximadamente linear de aumento da concentração polímero em concentrações reduzidas sal, e um aumento exponencial para concentrações mais elevadas destes componentes, ocorrendo inversão de fases nesta região.

Na temperatura de 30 °C, as curvas binodais apresentaram um comportamento linear para frações mássicas de sais até por volta de, 1,7 % para os três sistemas estudados. A partir desta composição, o comportamento do sistema contendo tartarato de sódio deixa de ser linear, o mesmo ocorrendo a partir de 2,6 % de citrato de sódio e 3,0 % de sulfato de sódio.

A diferença do efeito dos sais no comportamento das curvas binodais aumentou em função dos teores de eletrólitos nos sistemas. Apenas pela observação da região de separação de fases da curva binodal, sem levar em consideração as composições das linhas de amarração, o sulfato de sódio promoveu um maior efeito *salting out* sobre o polímero, segregando uma fração mássica maior deste componente para a FRP a partir de 1 % de sal no sistema a 30 °C, e em quaisquer concentrações para as outras temperaturas. O citrato de sódio e tartarato de sódio apresentaram efeito *salting out* similares em concentrações reduzidas de eletrólitos, com este efeito sendo maior para o citrato de sódio em concentrações mais elevadas de sal nos sistemas.

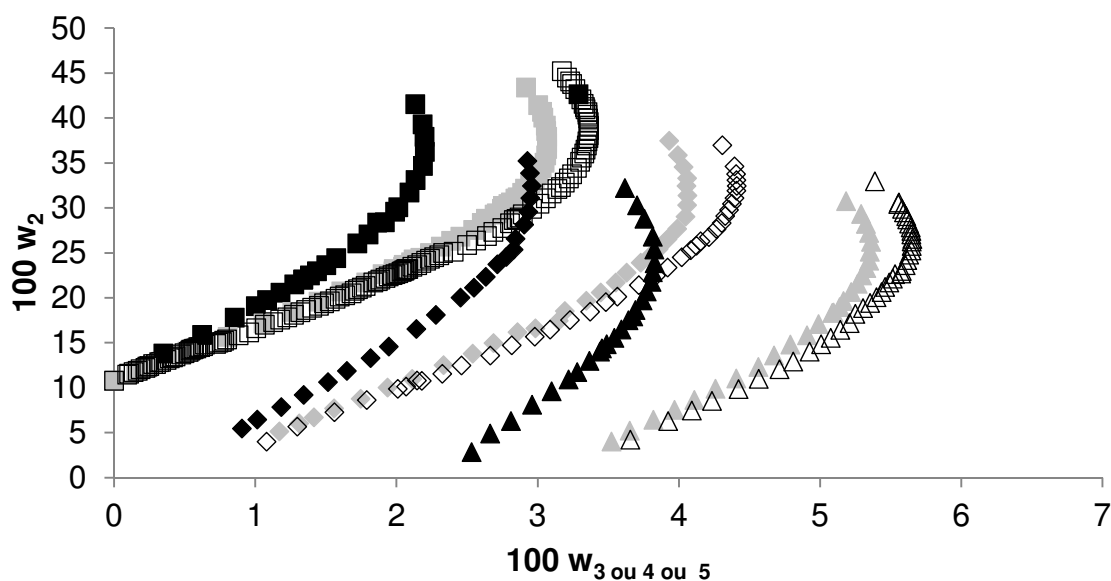


Figura 11 - Curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) (■, ◆, ▲) ou citrato de sódio (4) (■, ◇, ▲) ou tartarato de sódio (5) (□, ϐ, Δ) nas temperaturas de 10 °C (▲, △, Δ); 20 °C (◆, ◇, ϐ) e 30 °C (■, ■, □)

Fonte: Próprio autor

A Figura 13 apresenta a composição curvas binodais para os sistemas contendo os três sais, nas três temperaturas estudadas, apenas para a FRA. Apenas pela observação desta região da curva binodal, o maior efeito *salting out* é observado para o sistema contendo sulfato de sódio, que apresenta menor concentração de polímero nesta fase em relação aos demais sais nas três temperaturas estudadas, enquanto os sistemas contendo tartarato de sódio e citrato de sódio apresentaram comportamento similar, corroborando o efeito *salting out* observado para a FRP.

Não foi observado um efeito claro da influência da temperatura sobre o comportamento da curva binodal nesta região, o que indica que a baixas concentrações de polímero o efeito promovido pelo sal é preponderante ao efeito da temperatura.

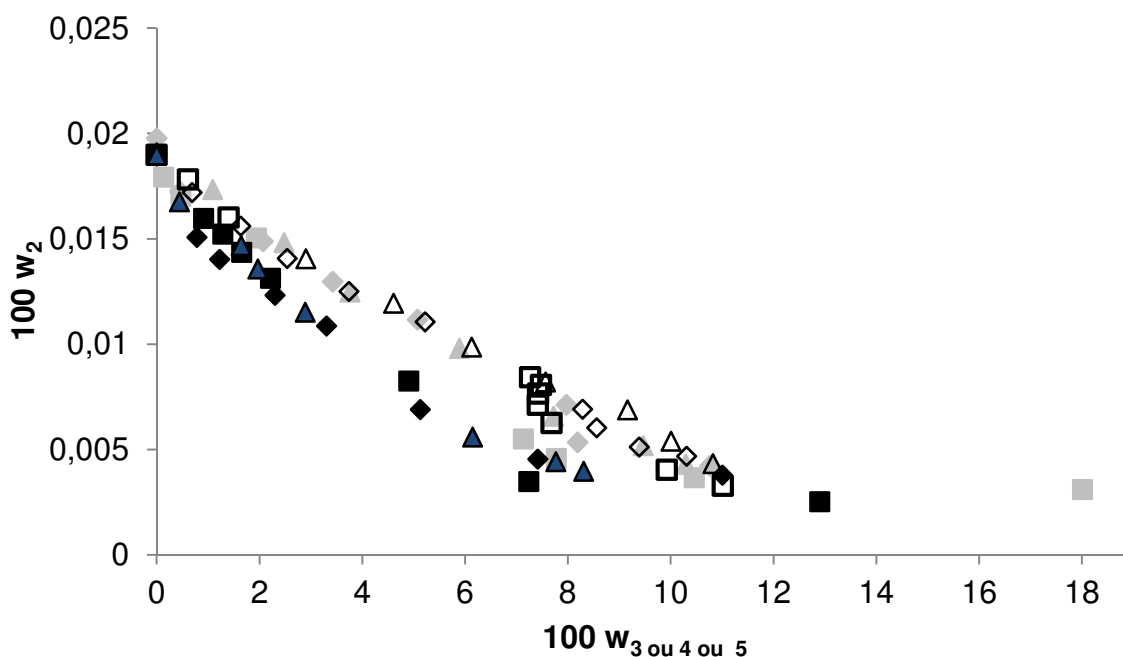


Figura 12 - Curvas binodais para a FRA nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) (■, ◆, ▲) ou citrato de sódio (4) (■, ◆, ▲) ou tartarato de sódio (5) (□, ◇, Δ) nas temperaturas de 10 °C (▲, ▲, Δ); 20 °C (◆, ◆, ◇) e 30 °C (■, ■, □)

Fonte: Próprio autor

6.3 Modelagem matemática das curvas binodais para os sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal

Todos os ajustes dos parâmetros das equações representativas do comportamento das curvas binodais para os três sais, nas três temperaturas estudadas, resultaram em coeficientes de determinação superiores a 98,4 %, conforme observado na Tabela 1 e na Tabela 2, evidenciando a precisa representabilidade dos dados experimentais pelos modelos matemáticos. Este elevado valor do coeficiente de determinação é necessário para que os cálculos da composição das fases por meio da metodologia de Merchuck (1997) sejam confiáveis.

As equações que melhor representaram o comportamento das curvas binodais para a FRP foram equações polinomiais de quarto grau, enquanto para a FRA foram equações polinomiais do segundo grau.

Tabela 1 - Equações com parâmetros ajustados para a representação das curvas binodais para a FRP

Temperatura (°C)	Sais	Equação	R ² (%)	
30	(3)	$Y_{FRP} = 0.109219 + 4.60307 * X_{FRP} + 1002.71 * X_{FRP}^2 - 88505.0 * X_{FRP}^3 + 2.55187 * 10^6 * X_{FRP}^4$	99.7	(18)
	(4)	$Y_{FRP} = 0.11152 + 2.61821 * X_{FRP} + 610.179 * X_{FRP}^2 - 36367.3 * X_{FRP}^3 + 718864 * X_{FRP}^4$	99.8	(19)
	(5)	$Y_{FRP} = 0.115276 + 1.9964 * X_{FRP} + 591.854 * X_{FRP}^2 - 32736.5 * X_{FRP}^3 + 596208 * X_{FRP}^4$	99.7	(20)
20	(3)	$Y_{FRP} = 0.382856 - 95.9068 * X_{FRP} + 9607.75 * X_{FRP}^2 - 376287 * X_{FRP}^3 + 5.3499E6 * X_{FRP}^4$	99.5	(21)
	(4)	$Y_{FRP} = 0.147251 - 27.4883 * X_{FRP} + 2416.11 * X_{FRP}^2 - 73695.7 * X_{FRP}^3 + 816150 * X_{FRP}^4$	99.7	(22)
	(5)	$Y_{FRP} = 0.0885741 - 16.2538 * X_{FRP} + 1564.55 * X_{FRP}^2 - 46292.5 * X_{FRP}^3 + 493794 * X_{FRP}^4$	99.8	(23)
10	(3)	$Y_{FRP} = 9.33281 - 1295.81 * X_{FRP} + 66502.3 * X_{FRP}^2 - 1.49686 * 10^6 * X_{FRP}^3 + 1.25818 * 10^7 * X_{FRP}^4$	99.7	(24)
	(4)	$Y_{FRP} = 17.5356 - 1682.34 * X_{FRP} + 60016.2 * X_{FRP}^2 - 943279 * X_{FRP}^3 + 5.539 * 10^6 * X_{FRP}^4$	99.6	(25)
	(5)	$Y_{FRP} = 6.47802 - 619.466 * X_{FRP} + 21922.3 * X_{FRP}^2 - 340095 * X_{FRP}^3 + 1.97587 * 10^6 * X_{FRP}^4$	99.6	(26)

Onde f (X) é a função que representa a curva binodal dando Y como uma função de X nas FRA ou FRP; X= w_i é a fração mássica do sal (i=3,4ou 5); Y =w₂ é a fração mássica do componente Triton X-114.

Fonte: Próprio autor

Tabela 2 - Equações com parâmetros ajustados para a representação das curvas binodais para a FRA

Temperatura (°C)	Sais	Equação	R ² (%)	
30	(3)	$Y_{FRA} = 0.000189284 - 0.00299144 * X_{FRA} + 0.0132561 * X_{FRA}^2$	99.5	(27)
	(4)	$Y_{FRA} = 0.000185723 - 0.00238212 * X_{FRA} + 0.00848449 * X_{FRA}^2$	99.4	(28)
	(5)	$Y_{FRA} = 0.000187801 - 0.00172498 * X_{FRA} + 0.00273833 * X_{FRA}^2$	99.2	(29)
20	(3)	$Y_{FRA} = 0.00018051 - 0.00288034 * X_{FRA} + 0.0143889 * X_{FRA}^2$	98.7	(30)
	(4)	$Y_{FRA} = 0.000189871 - 0.00194423 * X_{FRA} + 0.00508206 * X_{FRA}^2$	98.4	(31)
	(5)	$Y_{FRA} = 0.000185947 - 0.00174296 * X_{FRA} + 0.00362816 * X_{FRA}^2$	99.6	(32)
10	(3)	$Y_{FRA} = 0.000187202 - 0.00292099 * X_{FRA} + 0.0137046 * X_{FRA}^2$	100.0	(33)
	(4)	$Y_{FRA} = 0.000191599 - 0.00190249 * X_{FRA} + 0.00438173 * X_{FRA}^2$	100.0	(34)
	(5)	$Y_{FRA} = 0.000189425 - 0.0016653 * X_{FRA} + 0.00316502 * X_{FRA}^2$	100.0	(35)

Onde $f(X)$ é a função que representa a curva binodal dando Y como uma função de X nas FRA ou FRP; $X = w_i$ é a fração mássica do sal ($i=3,4$ ou 5); $Y = w_1$ é a fração mássica do componente Triton X-114.

Fonte: Próprio autor

A partir das Figuras 14 a 19, torna-se possível observar que as equações com os parâmetros ajustados representaram adequadamente os dados experimentais, uma vez que ocorre a sobreposição entre os valores calculados e os obtidos experimentalmente.

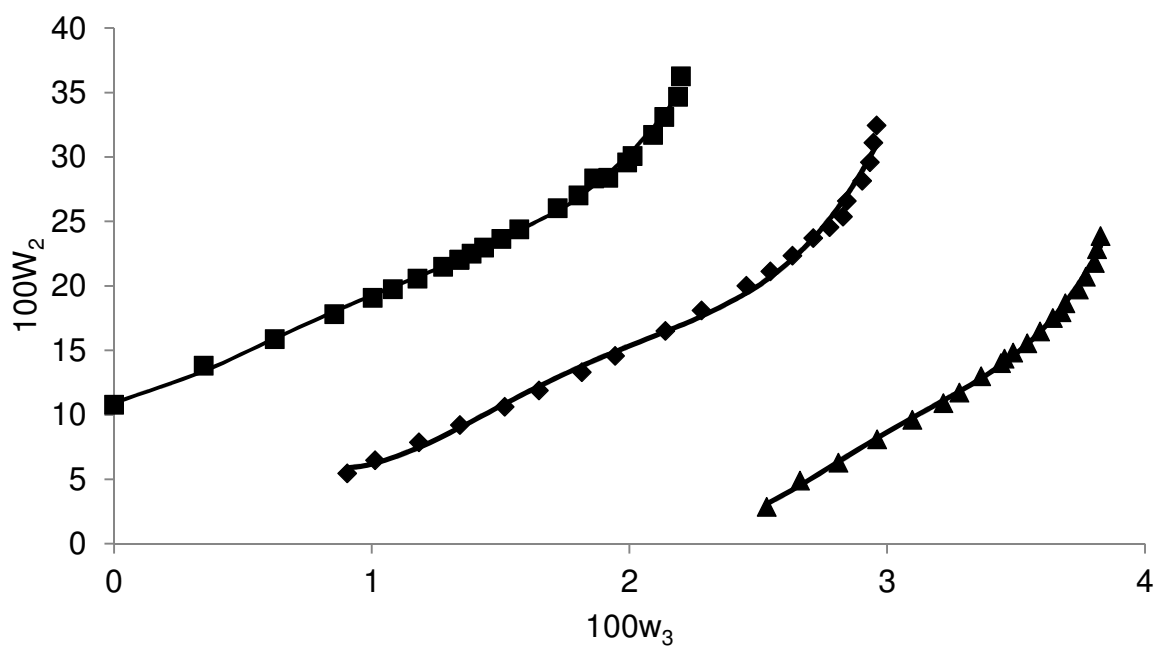


Figura 13 - Ajuste das curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) nas temperaturas de 10 °C (▲); 20 °C (◆) e 30 °C (■)

Fonte: Próprio autor

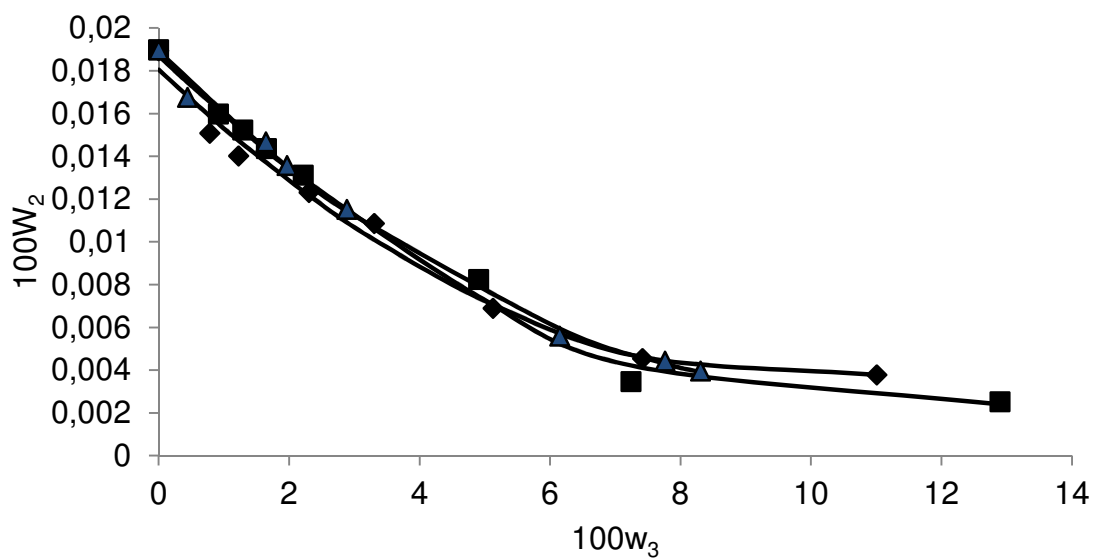


Figura 14 - Ajuste das curvas binodais para a FRA nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) nas temperaturas de 10 °C (▲); 20 °C (◆) e 30 °C (■)

Fonte: Próprio autor

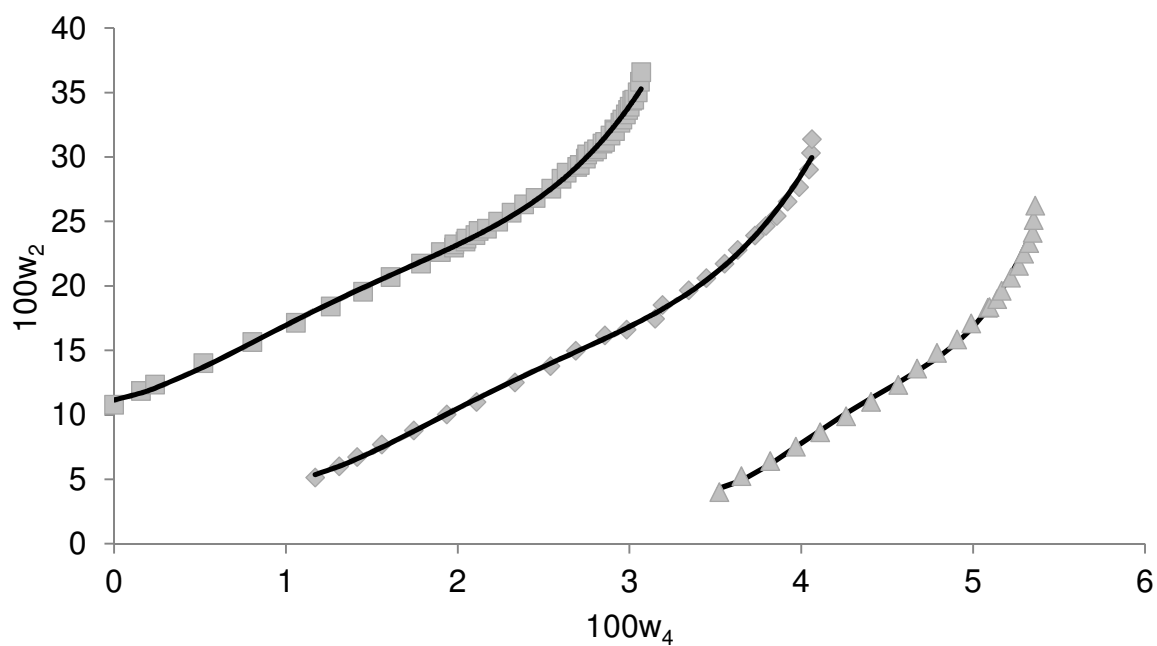


Figura 15 - Ajuste das curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) nas temperaturas de 10 °C (▲); 20 °C (◆) e 30 °C (■)

Fonte: Próprio autor

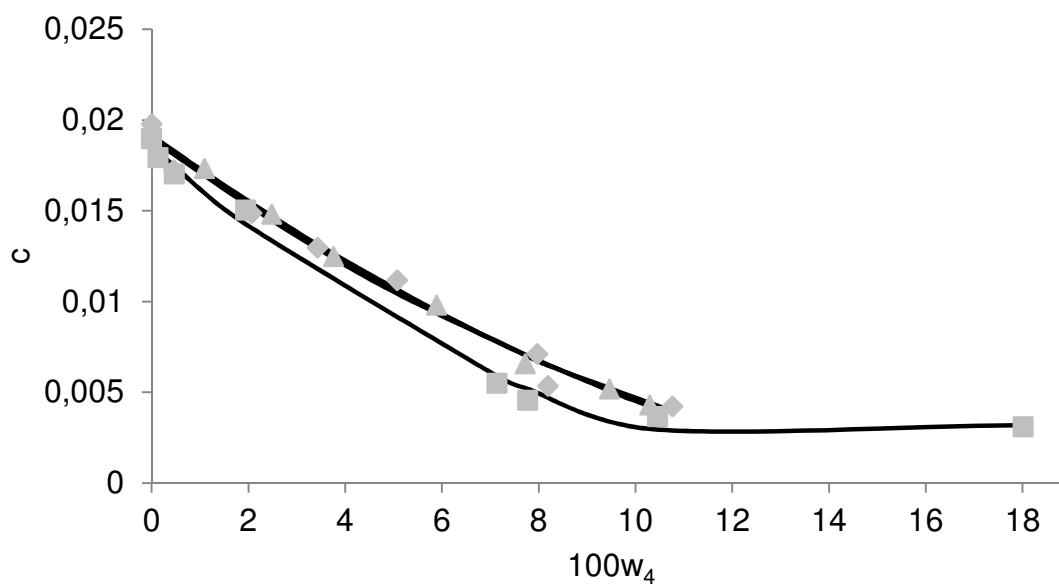


Figura 16 - Ajuste das curvas binodais para a FRA nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) nas temperaturas de 10 °C (▲); 20 °C (◆) e 30 °C (■)

Fonte: Próprio autor

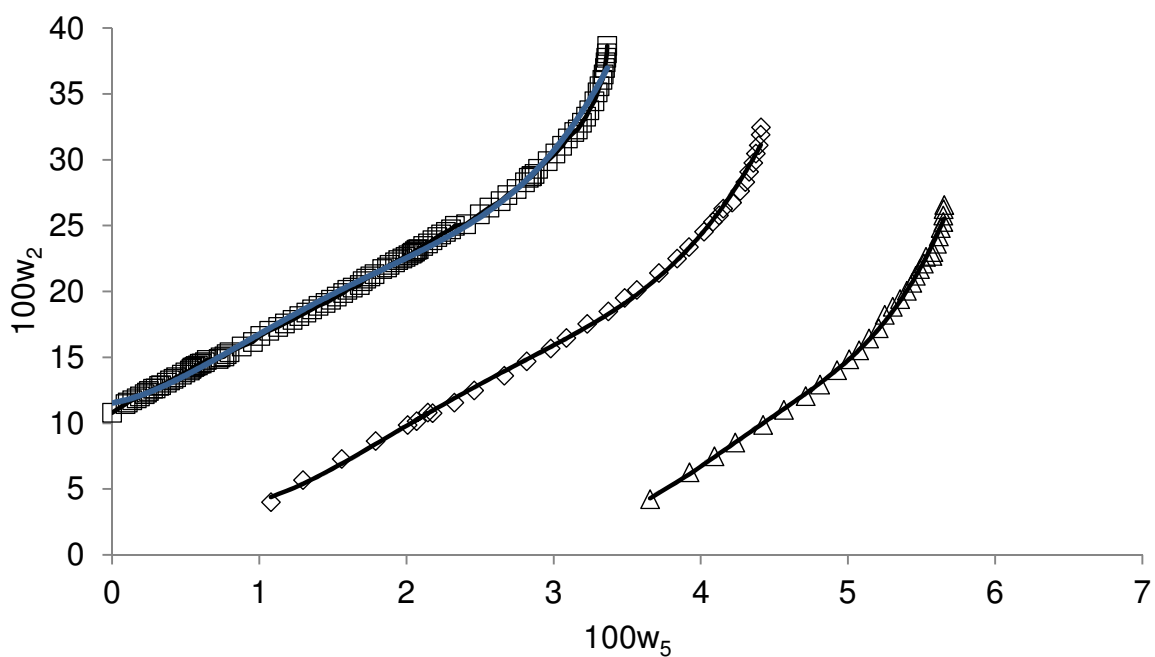


Figura 178 - Ajuste das curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + tartarato de sódio (5) nas temperaturas de 10 °C (Δ); 20 °C (\diamond) e 30 °C (\square)

Fonte: Próprio autor

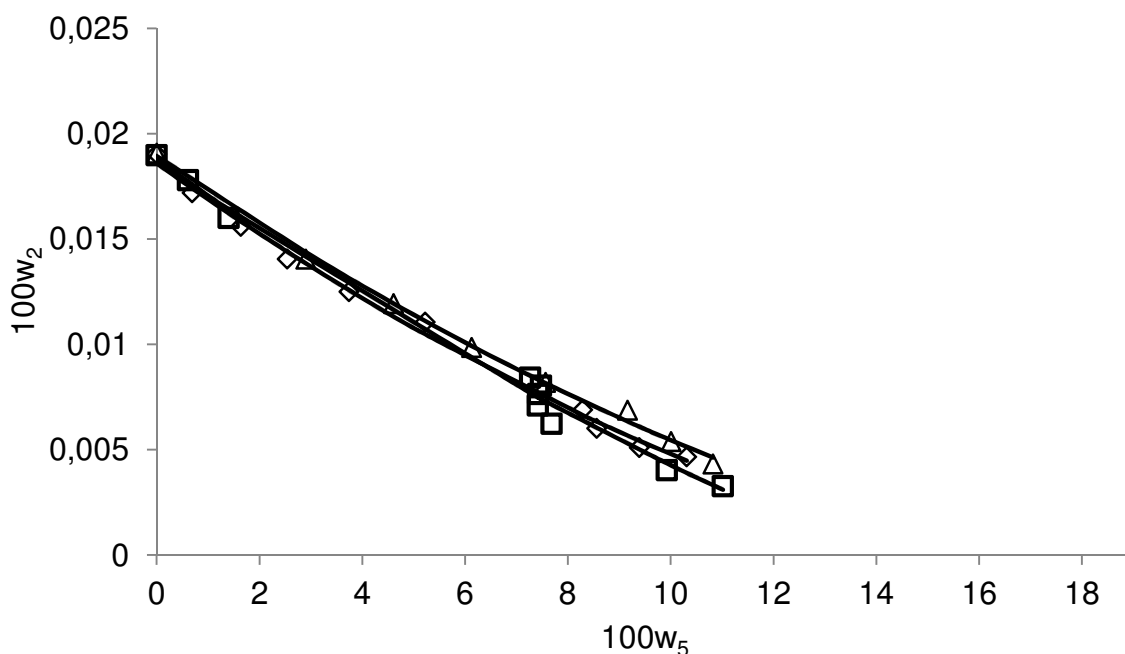


Figura 18 - Ajuste de curvas binodais para a FRA nos sistemas constituídos água (1) + Triton X-114 (2) + tartarato de sódio (5) nas temperaturas de 10 °C (Δ); 20 °C (\diamond) e 30 °C (\square)

Fonte: Próprio autor

6.4 Composição das linhas de amarração para os sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal

As composições das linhas de amarração, em porcentagem mássica, calculadas segundo a metodologia de Merchuck (1997) para os sistemas compostos por Triton X-114 + água + sais são apresentadas nas Tabela 3-5.

Tabela 3 - Composição em porcentagem mássica na MI e das FRP e FRA das linhas de amarração para os sistemas água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) nas temperaturas de 10 °C; 20 °C e 30 °C obtida por Merchuk

Temperatura	$100w_3^M$	$100w_2^M$	$100w_3^{FRA}$	$100w_2^{FRA}$	$100w_3^{FRP}$	$100w_2^{FRP}$	CLA	ILA (rad)
30 °C	1.0695	7.4953	1.2111	0.0155	0.8681	18.1338	0.1812	-52.8355
	2.0400	9.8560	2.3983	0.0125	1.5340	23.7607	0.2376	-27.4776
	2.5170	10.9141	3.0275	0.0111	1.7820	26.6151	0.2663	-21.3598
	3.0431	12.2868	3.7913	0.0095	1.9762	29.7928	0.2984	-16.4090
	3.4952	13.4906	4.5288	0.0081	2.0787	31.9673	0.3205	-13.0438
20 °C	1.5367	4.2309	1.4566	0.0142	1.6975	12.6972	0.1269	52.6427
	2.0633	5.0115	2.1200	0.0126	1.9507	14.9498	0.1494	-88.2183
	3.0240	7.5181	3.3247	0.0101	2.5148	20.2353	0.2024	-24.9736
	3.5621	8.9367	3.9887	0.0089	2.7805	25.2919	0.2531	-20.9258
	4.0140	10.0601	4.6770	0.0077	2.8605	27.5498	0.2760	-15.1617
10 °C	2.5966	1.5068	2.5207	0.0122	2.8988	7.4557	0.0745	19.6849
	2.8049	2.0019	2.7431	0.0117	3.0180	8.8699	0.0886	32.2302
	3.2076	3.4553	3.1273	0.0109	3.4546	14.0482	0.1404	42.8860
	3.5973	4.1154	3.6310	0.0099	3.5090	14.8938	0.1488	-121.9986
	4.0120	5.0043	4.1475	0.0090	3.6612	17.9424	0.1794	-36.8762
	4.3881	5.8482	4.6739	0.0081	3.7202	19.4973	0.1951	-20.4362
	4.5273	6.5269	4.8694	0.0077	3.7688	20.9781	0.2100	-19.0522

Fonte: Próprio autor

Tabela 4 - Composição em porcentagem mássica na MI e das FRP e FRA das linhas de amarração para os sistemas água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) nas temperaturas de 10 °C; 20 °C e 30 °C obtida por Merchuk

Temperatura	$100w_4^M$	$100w_2^M$	$100w_4^{FRA}$	$100w_2^{FRA}$	$100w_4^{FRP}$	$100w_2^{FRP}$	CLA	ILA (rad)
30 °C	0.7639	6.9095	0.7610	0.0168	0.7675	15.3613	0.1534	2354.7018
	1.5040	8.6383	1.7916	0.0146	1.1854	18.1912	0.1819	-29.9846
	2.5067	11.1382	2.9944	0.0122	1.9827	23.0934	0.2310	-22.8137
	3.5367	13.5528	4.5422	0.0095	2.5181	27.2714	0.2734	-13.4688
	4.0426	14.9745	5.4106	0.0082	2.7143	29.5069	0.2962	-10.9405
20 °C	2.3079	4.5889	2.2757	0.0148	2.3665	12.9111	0.1290	142.0900
	2.9844	6.1307	3.0508	0.0135	2.8768	16.0459	0.1603	-92.1485
	3.7687	7.6971	4.0152	0.0120	3.3805	19.7949	0.1979	-31.1677
	4.4029	9.6929	5.0004	0.0105	3.6196	22.3855	0.2242	-16.2044
	4.9841	10.4696	5.6909	0.0095	3.8953	26.5818	0.2663	-14.7991
10 °C	3.3003	1.5129	3.1333	0.0136	4.0159	7.9365	0.0797	8.9774
	3.8134	2.5936	3.6305	0.0128	4.4591	11.7025	0.1172	14.1076
	4.1208	3.5230	3.9082	0.0124	4.7644	14.1505	0.1416	16.5128
	4.6322	4.5413	4.4977	0.0115	4.9932	16.7021	0.1670	33.6809
	5.1240	5.7050	5.1284	0.0106	5.1141	18.6513	0.1864	-1308.8221
	5.4702	6.4795	5.5823	0.0099	5.2205	20.8969	0.2089	-57.7228
	5.7986	7.3206	6.1200	0.0092	5.2113	20.6807	0.2069	-22.7502

Fonte: Próprio autor

Tabela 5 - Composição em porcentagem mássica na MI e das FRP e FRA das linhas de amarração para os sistemas água (1) + Triton X-114 (2) + tartarato de sódio (5) nas temperaturas de 10 °C; 20 °C e 30 °C obtida por Merchuk

Temperatura	$100w_5^M$	$100w_2^M$	$100w_5^{FRA}$	$100w_2^{FRA}$	$100w_5^{FRP}$	$100w_2^{FRP}$	CLA	ILA (rad)
30 °C	1.0125	7.6312	1.2615	0.0166	0.7635	15.2473	0.1524	-30.5820
	1.5061	8.8544	1.9008	0.0156	1.1191	17.5208	0.1752	-22.3935
	2.0108	10.0490	2.7009	0.0143	1.3853	19.1441	0.1917	-14.5408
	2.5053	11.2773	3.4735	0.0131	1.6839	20.8341	0.2090	-11.6342
	3.0021	12.4721	4.4592	0.0116	1.8924	21.9617	0.2210	-8.5516
	3.4993	13.6517	4.9303	0.0109	2.3503	24.6046	0.2473	-9.5328
	3.9961	14.7799	5.8997	0.0096	2.5480	26.0156	0.2622	-7.7591
20 °C	2.2373	3.5441	1.9942	0.0153	3.1544	16.8536	0.1688	14.5131
	3.1068	5.0914	2.9874	0.0137	3.4264	18.6884	0.1868	42.5458
	4.2017	7.1180	4.3616	0.0117	3.8543	22.5478	0.2254	-44.4230
	4.9267	8.3401	5.3765	0.0103	4.0373	24.8094	0.2484	-18.5178
	6.0130	10.3286	7.0491	0.0081	4.2420	27.9712	0.2810	-9.9618
10 °C	4.9930	3.4985	4.9061	0.0115	5.4095	20.2176	0.2021	40.1406
	5.2076	3.9144	5.1485	0.0112	5.4718	21.3825	0.2137	66.1013
	5.7060	4.7902	5.7230	0.0104	5.6343	25.0363	0.2503	-282.4133
	6.0115	5.3307	6.1187	0.0099	5.6212	24.7031	0.2470	-49.6318
	6.1928	5.6204	6.3421	0.0097	5.6589	25.6783	0.2568	-37.5747
	6.3326	5.8600	6.5123	0.0094	5.6941	26.6408	0.2664	-32.5476

Fonte: Próprio autor

A Figura 20 apresenta as composições das linhas de amarração calculadas no presente trabalho e as composições das linhas de amarração obtidas experimentalmente por Ritter et al (2016), usando espectroscopia de emissão ótica para quantificação dos sais e cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos para a quantificação do polímero, para o sistema constituído por Triton X-114 + água + sulfato de sódio a 30 °C. A coincidência nas composições e/ou inclinação das linhas de amarração com pontos de mistura próximos mostra que a obtenção das composições das linhas de amarração calculadas pela metodologia de Merchuk são diretamente correlacionadas, com desvios muito baixos, as obtidas experimentalmente. Deste modo, a metodologia de Merchuk pode ser usada para o cálculo das composições das fases de sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal.

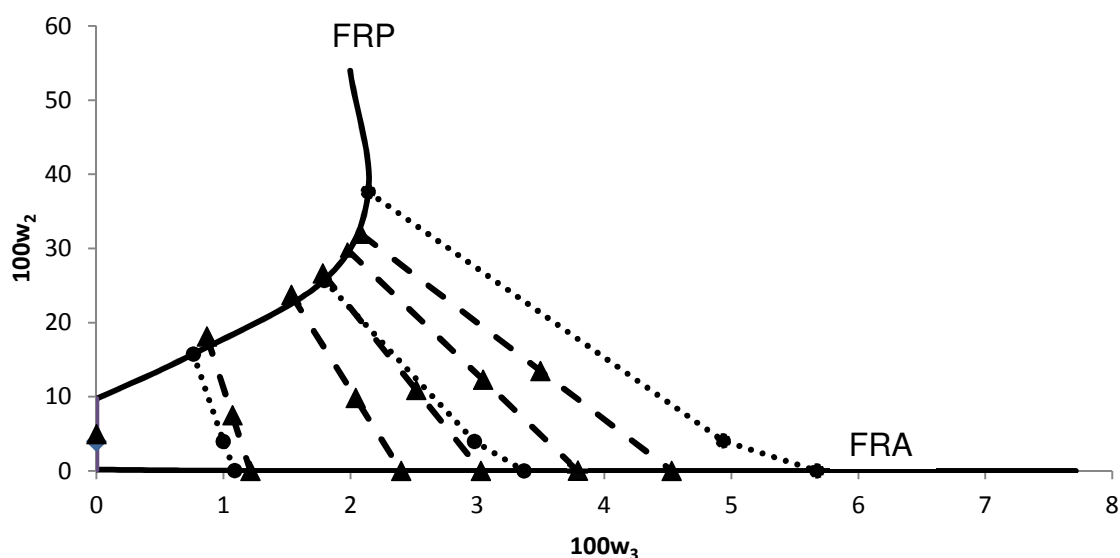


Figura 19 - Linhas de amarração para os sistemas constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) a 30 °C obtidos nesta investigação (▲---▲) e da literatura (●...●) (Ritter,2016)

Fonte: Próprio autor

Nas Figuras 21 a 23 são apresentadas as composições das curvas binodais calculadas a partir das equações matemáticas cujos parâmetros foram ajustados, bem como as composições das linhas de amarração calculados pela metodologia de Merchuk, para os sistemas compostos por Triton X-114 + água + sal.

Pode-se observar que para os três sistemas, a mudança da temperatura levou a mudanças na inclinação das linhas de amarração, o que é corroborado pela mudança

de valores calculados para as ILAs na Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5, inclusive apresentando mudança de sinal. O solutropismo, presente discretamente nos sistemas contendo citrato de sódio e tartarato de sódio a 30 °C, e no sistema contendo sulfato de sódio a 20 °C, foi muito acentuado pelo abaixamento da temperatura. Este comportamento está diretamente relacionado a mudanças na seletividade do eletrólito, e conseqüentemente em sua partição, devido á alteração da temperatura.

A alteração na partição do sal no fenômeno de solutropismo está diretamente relacionada à mudança no estado de agregação do polímero ao se atingir a temperatura micelar crítica. Deste modo, quando o sistema está em temperaturas inferiores a este ponto, em dadas concentrações de sais, como a 10 °C, o polímero apresenta-se disperso na solução; enquanto que na temperatura de 30 °C este agrega-se em micelas, provavelmente diminuindo o espaço disponível para o soluto hidratado e para a água na FRP.

Alterações no comprimento das linhas de amarração em função do aumento na concentração de sais estão ligadas ao maior efeito *salting out* que aumenta a região de separação de fases e, conseqüentemente, aumenta o CLA. Esta mesma relação causa-efeito é observada para o aumento da temperatura do sistema.

O deslocamento do início da curva binodal para as regiões de maior concentração de sais em função da diminuição da temperatura que ocorre na FRP está relacionado ao estado de agregação das moléculas de polímero, característica de polímeros termoseparáveis. A baixa temperaturas, o eletrólito é o responsável pela formação da região bifásica, uma vez que o sistema está abaixo da temperatura micelar crítica, o que só ocorre a partir de uma dada concentração de sal. Conforme a temperatura aumenta e, principalmente quando a temperatura micelar crítica é atingida, o efeito de separação de fases se dá concomitantemente devido a formação de micelas de polímeros e ao efeito do *salting out*, o que ocorre a baixas concentrações de sal, ou mesmo na ausência deste, quando se está acima da temperatura micelar crítica da mistura polímero + água.

Este fenômeno de formação de micelas a partir de uma dada temperatura pode ser explicado pelo aumento da hidrofobicidade de surfactantes poliméricos em função do aumento da temperatura. A baixas temperaturas, quando a hidrofobicidade deste tipo de polímero é menor, o mesmo apresenta-se mais hidratado, circundado por moléculas de água; uma vez que sua hidrofobicidade aumenta com a elevação da temperatura, as moléculas de polímero tornan-se menos hidratadas, se agregando

na FRP, na qual a concentração de água, e conseqüentemente de sal dissolvido nesta, são reduzidas(CHAKRABORTY; SEN, 2016; LU et al., 2012, 2013, 2014).

A curva binodal que apresenta a maior região de separação de fases foi a do sistema contendo sulfato de sódio, com aquelas observada para citrato de sódio e tartarato de sódio, na mesma temperatura, apresentando diferenças na região de maior concentração de sais. Embora em intensidades diferentes, os três sais apresentaram tendência similar quanto a seu efeito sobre as linhas de amarração e, conseqüentemente, sobre o ELL do sistema nas mesmas temperaturas. Na temperatura de 10 °C, quando a separação de fases ocorre apenas devido ao efeito do sal, fica evidente o maior efeito *salting out* promovido pelo sulfato de sódio.

Uma vez que os três sistemas possuem os cations Na^+ , a diferença de comportamento foi causada pelos ânions SO_4^{2-} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ e $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$. O efeito *salting out* esperado é de ser crescente em função da valência dos ânions com ânions trivalente possuindo maior efeito em relação a ânions divalentes devido a maior hidratação dos primeiros (GHAFARI et al., 2019; RITTER et al., 2016), o que não foi observado no presente estudo. Esta diferença para o comportamento esperado pode ser resultado da diferença de volume anios, sendo decrescente para $\text{SO}_4^{2-} < \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-} < \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$, uma vez que há uma maior densidade eletrônica para os ínos menores.

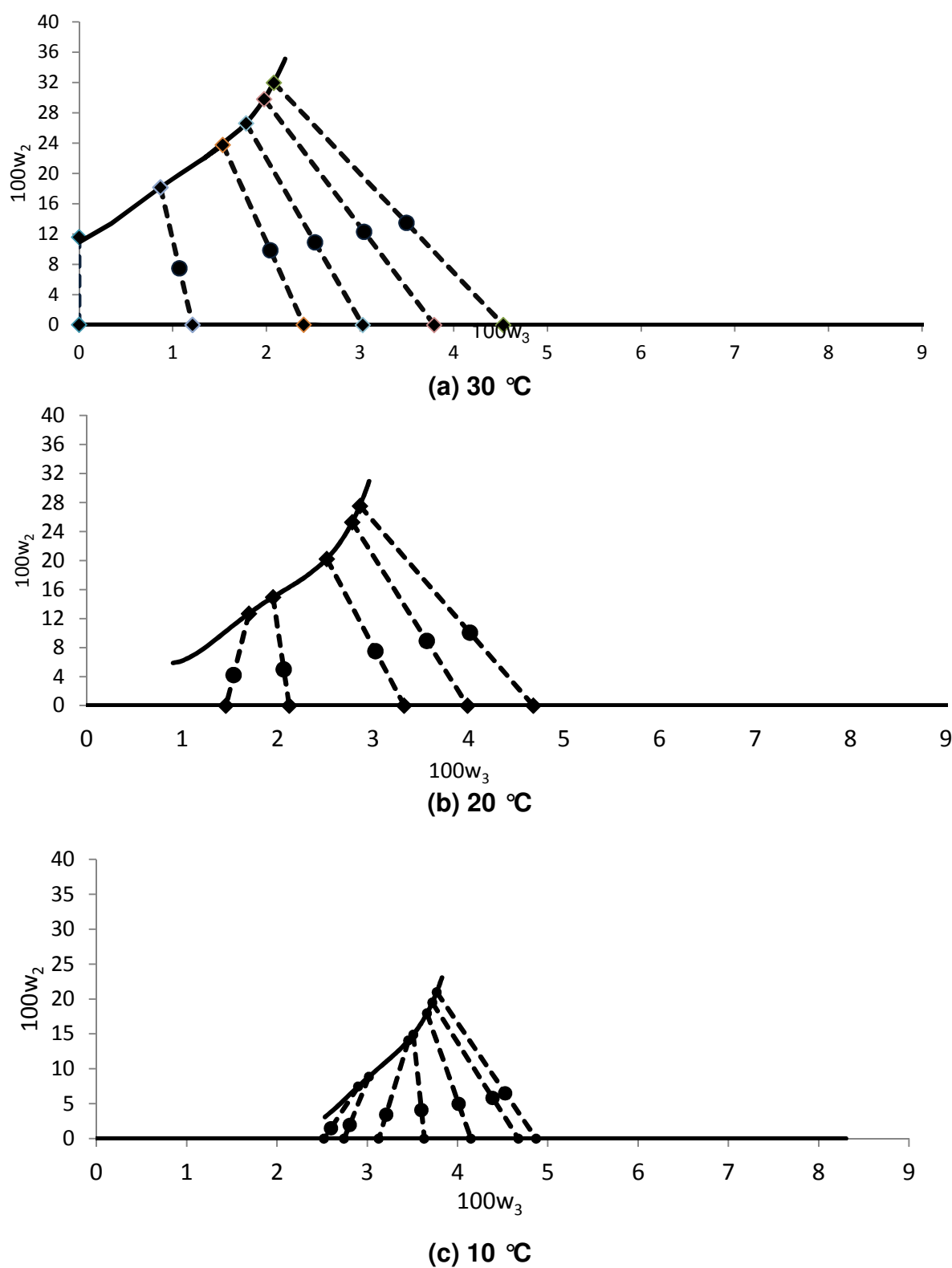
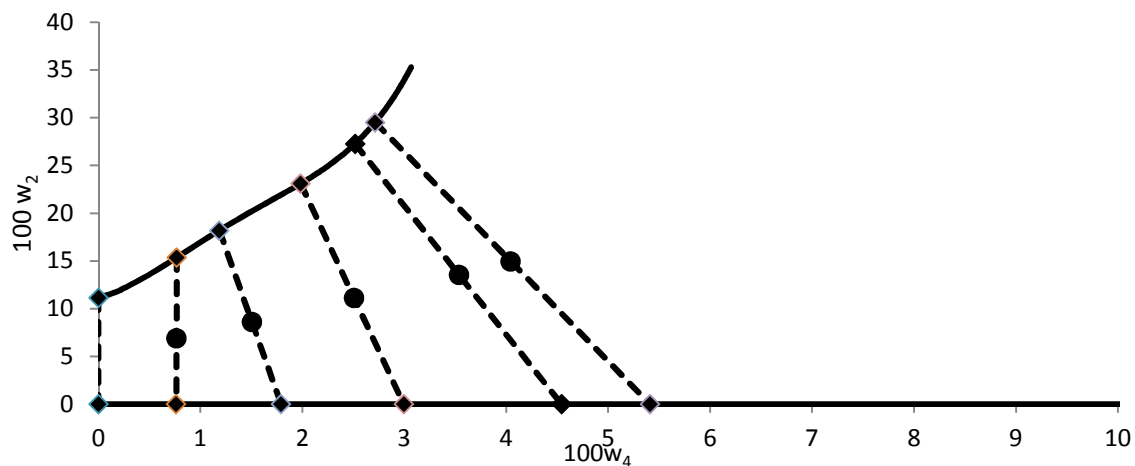
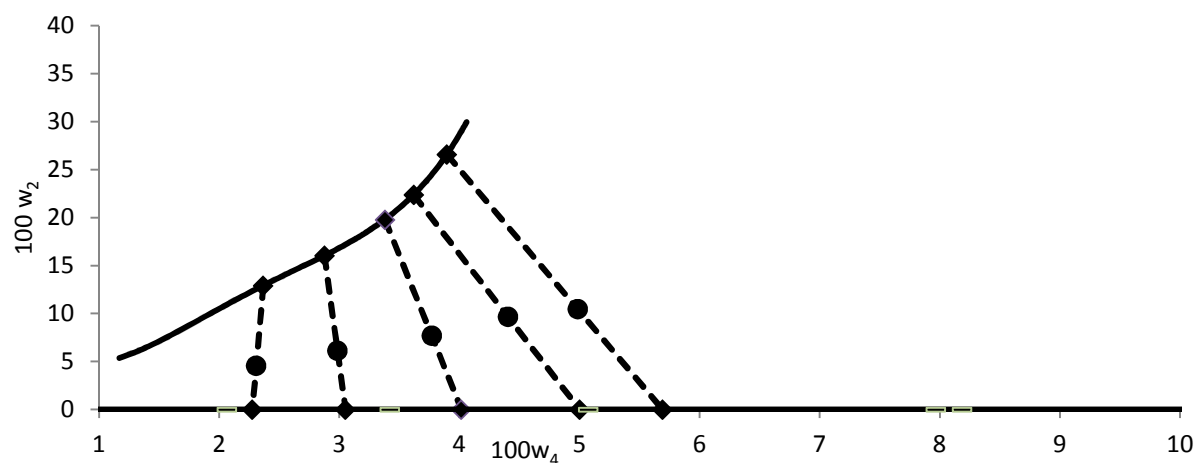


Figura 20 - Curvas binodais e linhas de amarração obtidas experimentalmente pelo método proposto por Merchuk para o sistema (1) água +(2) Triton X-114 +(3) sulfato de sódio nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C

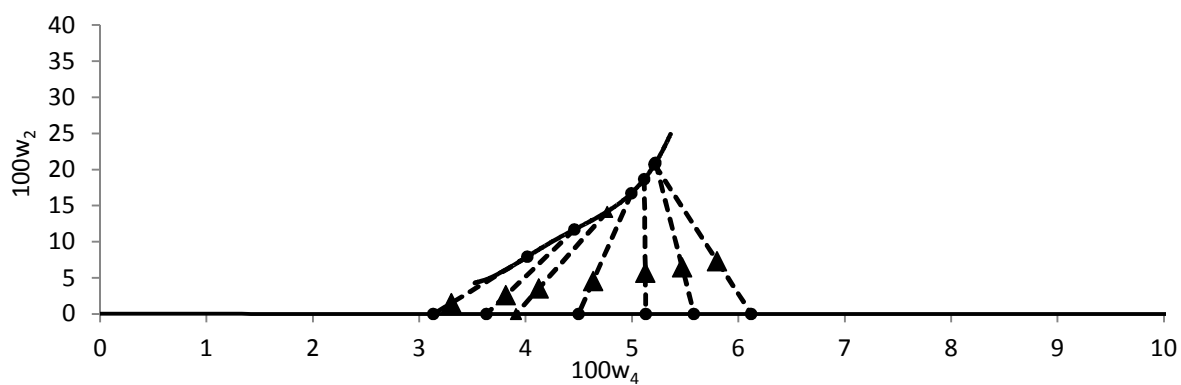
Fonte: Próprio autor



(a) 30 °C



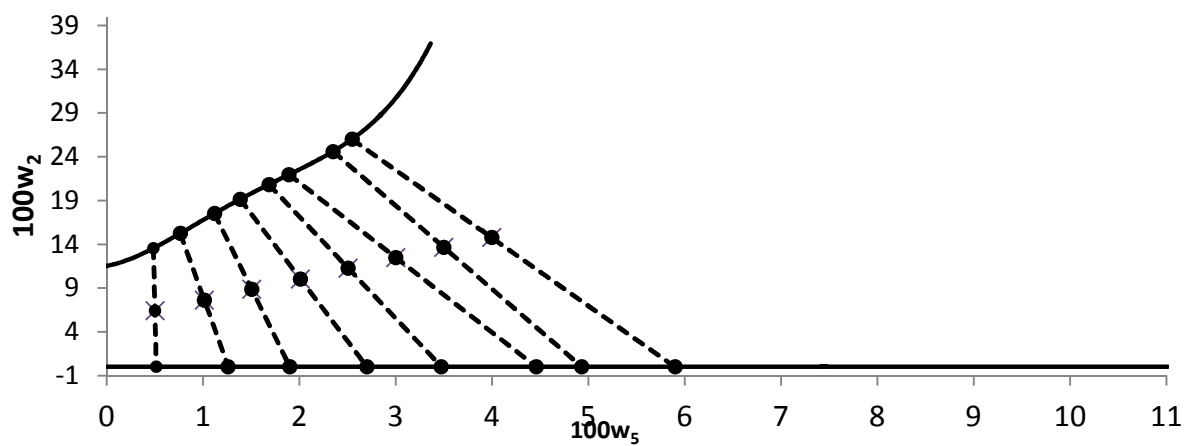
(b) 20 °C



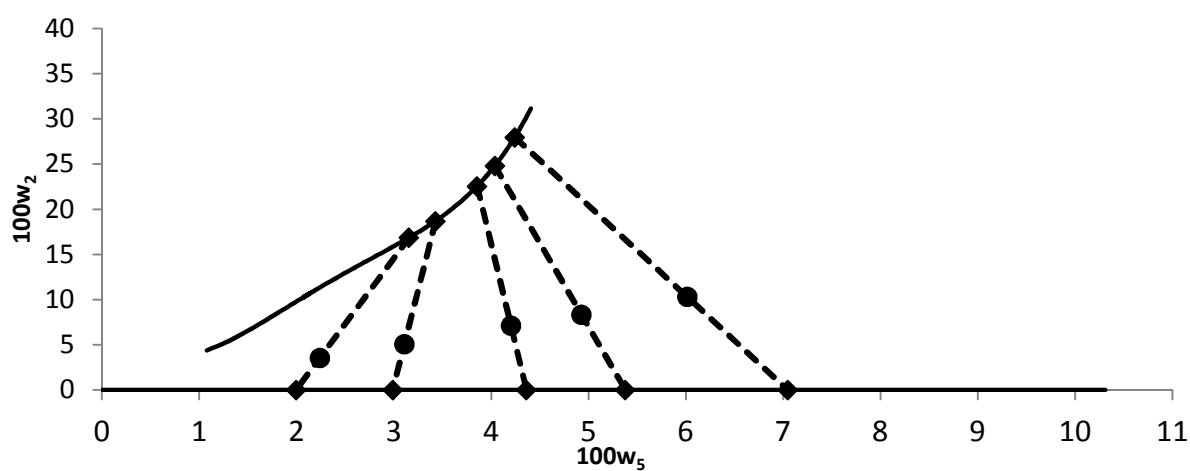
(c) 10 °C

Figura 21 - Curva binodais e linhas de amarração obtidas experimentalmente pelo método proposto por Merchuk para o sistema água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C

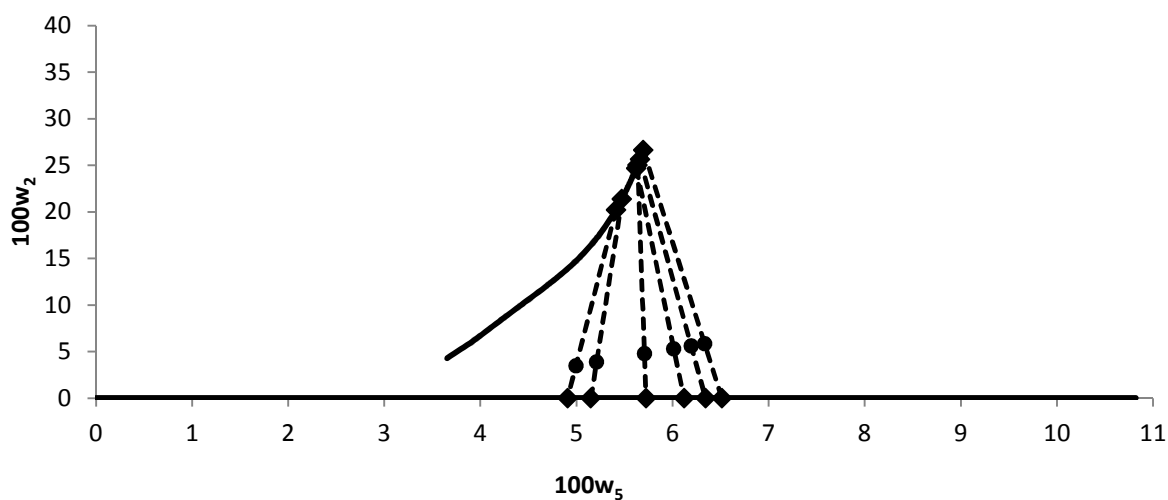
Fonte: Próprio autor



(a) 30 °C



(b) 20 °C



(b) 10 °C

Figura 22 - Curvas binodais e linhas de amarração obtidas experimentalmente pelo método proposto por Merchuk para o sistema água (1) + Triton X-114 (2) + tartarato de sódio (5) nas temperaturas de 10 °C, 20 °C e 30 °C

Fonte: Próprio autor

6.5 Curvas binodais a diferentes pHs para os sistemas constituídos por Triton

X-114 + sal + água

Não foi observado nenhuma alteração da composição da FRP com a alteração do pH do sistema constituído por Triton X-114 + água + sulfato de sódio a 20 °C, originalmente com pH 7,5, para os valores de pH de 10 e 5, conforme pode ser observado na Figura 24. O ajuste do pH destes foi feito pela adição de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, resultando em porcentagens mássicas destes componentes, em relação a massa total do sistema, de, respectivamente, 0,076 % para pH 5 e de 0,054 % para pH 10.

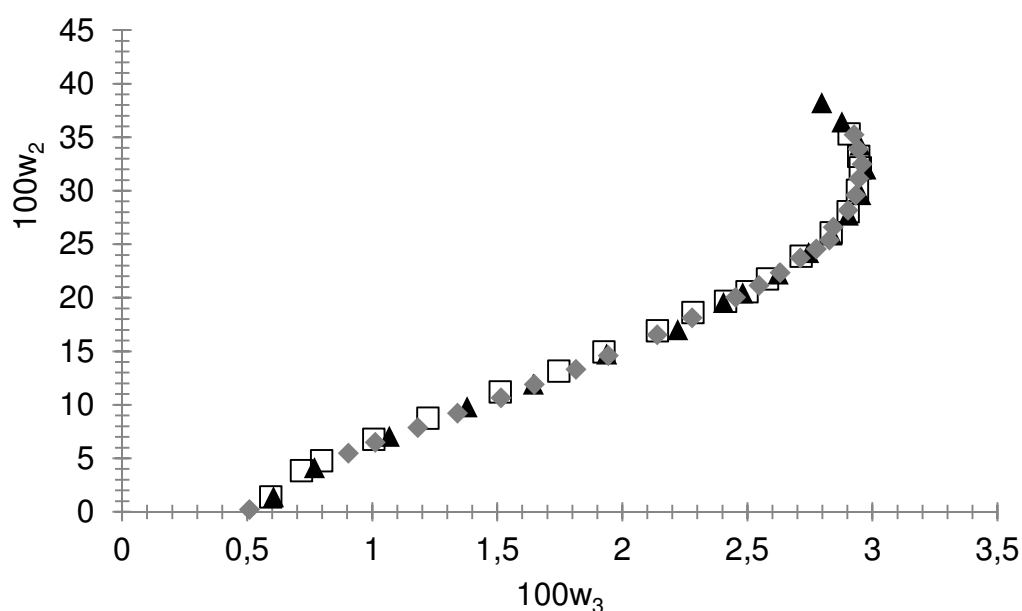


Figura 23 - Efeito do pH nas curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos por (1) água + (2) TritonX-114 + (3) sulfato de sódio a pH =5 (▲);7,5 (◆) e 10 (□) a 20 °C

Fonte: Próprio autor

Na Figura 25 pode ser observado que o aumento do pH do sistema água +Triton X-114 + citrato de sódio, inicialmente a 7,5, para 10, por meio da adição de hidróxido de sódio a 20 °C, não resultou em alteração das composições da curva binodal para a FRA. Por outro lado, a redução do pH para 5,0, levou a um deslocamento negativo da curva, o que resultaria em uma menor região de separação de fases, caracterizada por um menor efeito *salting out* do ácido e base conjugado (citrato de sódio/ácido cítrico).

Este efeito se deve ao aumento da protonação dos íons citrato, resultando em uma menor valência comparada a um pH mais elevado. Esta menor valência tem como resultado diminuição do número de moléculas de água ligadas aos íons. O que causa um menor efeito *salting out* (CHAKRABORTY; SEN, 2016; ZAFARANI-MOATTAR; HAMZEHZADEH, 2011).

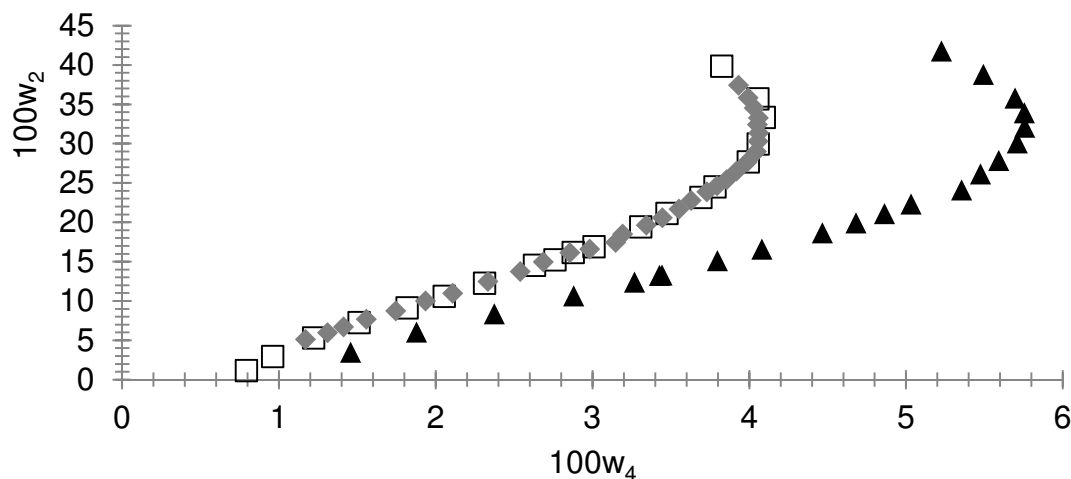


Figura 24 - Efeito do pH nas curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + citrato de sódio (4) a pH =5 (▲), pH=7,5 (◆) e 10 (□) a 20 °C

Fonte: Próprio autor

Na Figura 26 é mostrado que a alteração do pH, de 7,5, para 10, por meio da adição de hidróxido de sódio, e para 5, pela adição do par conjugado ácido tartárico – tartarato de sódio, não resultou em modificação na composição da curva binodal para o sistema constituído por Triton X-114 + água + tartarato de sódio a 20 °C.

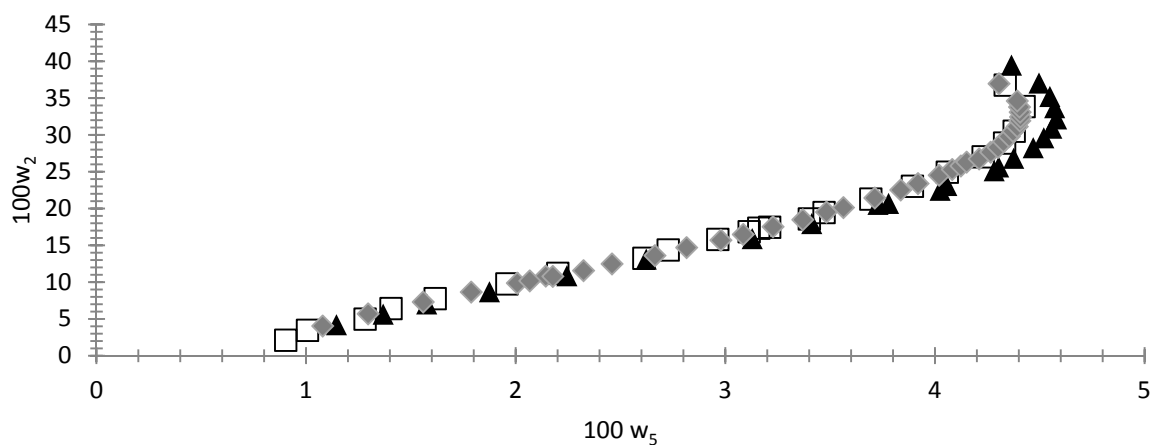


Figura 25 - Efeito do pH nas curvas binodais para a FRP nos sistemas constituídos por (1) + (2) + (5) a pH =5 (▲); 7,5 (◆) e 10 (□) a 20 °C

Fonte: Próprio autor

6.6 Comportamento do ELL de SABs constituídos por Triton X-114 + água + glicose adicionados ou não de sais

O efeito *sugaring out* que a glicose exerce na formação da região bifásica para sistemas compostos por Triton X-114 + água + glicose é menor que o efeito *salting out* dos três sais estudados no presente trabalho, conforme pode ser observado na Figura 27. Este menor efeito se deve as moléculas de glicose se apresentarem menos hidratadas do que os íons de eletrólitos, o que induz um menor efeito de separação entre o carboidrato e o polímero, e conseqüentemente uma menor diferença de hidrofobicidade entre as fases.

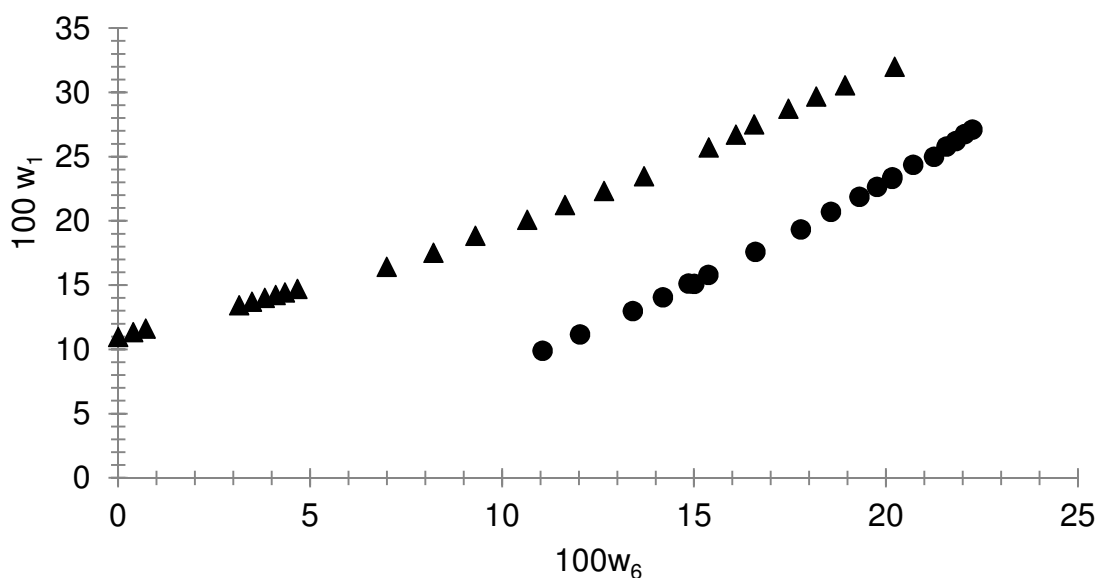


Figura 26 – Curva binodal da FRP para os sistemas constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + glicose (6) a 30 °C (▲) e 20 °C (●)

Fonte: Próprio autor

Nos sistemas quaternários constituídos por Triton X-114 + água + sais + glicose a 20 °C, a glicose demonstrou ter mais afinidade pela FRA para os sistemas contendo sulfato de sódio e citrato de sódio, conforme demonstrado na Figura 28. As frações mássicas de tartarato de sódio, citrato de sódio e sulfato de sódio no ponto de mistura destes sistemas foram de, respectivamente, 0,015 a 0,020, 0,010 a 0,015 e 0,0075 a 0,0095, conforme é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição dos sistemas quaternários constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + sais (3, 4 ou 5) + glicose (6) ($w_6=0,05;0,1;0,15;0,20$ e $0,25$) a 20°C

w_6^M	w_2^{MI}	w_3^{MI}	w_1^{MI}	C_6^{FRA} (g/L)	C_6^{FRP} (g/L)	K_G
0.0500	0.0479	0.0143	0.8878	40.8315	9.6414	0.2361
0.1001	0.0468	0.0135	0.8396	40.7083	109.9445	2.7008
0.1506	0.0427	0.0128	0.7939	173.4012	63.4728	0.3660
0.2054	0.0418	0.0117	0.7411	213.5448	107.4890	0.5034
0.2543	0.0377	0.0113	0.6967	274.8612	60.2590	0.2192
w_6^M	w_2^{MI}	w_4^{MI}	w_1^{MI}	C_6^{FRA} (g/L)	C_6^{FRP} (g/L)	K_G
0.0500	0.0479	0.0143	0.8878	40.8315	9.6414	0.2361
0.1001	0.0468	0.0135	0.8396	109.9445	40.7083	0.3703
0.1506	0.0427	0.0128	0.7939	173.4012	63.4728	0.3660
0.2054	0.0418	0.0117	0.7411	213.5448	107.4890	0.5034
0.2543	0.0377	0.0113	0.6967	274.8612	60.2590	0.2192
$100w_6^M$	w_2^{MI}	w_5^{MI}	w_1^{MI}	C_6^{FRA} (g/L)	C_6^{FRP} (g/L)	K_G
0.0508	0.0483	0.0190	0.8819	45.0737	14.7300	0.3268
0.1006	0.0460	0.0180	0.8354	38.1801	117.0149	3.0648
0.1503	0.0424	0.0176	0.7897	103.4044	206.8088	2.0000
0.1998	0.0406	0.0160	0.7436	8.6860	185.5976	21.3675
0.2500	0.0374	0.0152	0.6974	8.0345	258.0691	32.1200

Fonte: Próprio autor

Em frações mássicas de glicose no ponto de mistura de 0,25 e 0,20, a glicose teve afinidade muito maior pela FRP, apresentando coeficientes de distribuição de, respectivamente, 32,1 e 21,4. Este comportamento pode estar relacionado à exclusão de grande parte das moléculas de glicose da FRA pelo ânion tartarato, que possui maior afinidade pela água do que as moléculas do carboidrato, e está em maior concentração no sistema do que os íons citrato e sulfato. Entretanto, é recomendado repetições experimentais para a confirmação deste comportamento.

Tabela 7 – Composição dos sistemas quaternários constituídos por (1) água + (2) Triton X-114 + sais (3, 4 ou 5) + (6) ($w_6=0,003$) a 20 °C

w_6^M	w_2^{MI}	w_3^{MI}	w_1^{MI}	C_6^{FRA} (g/L)	C_6^{FRP} (g/L)	K_G
0.0035	0.0421	0.0152	0.9391	0.8838	6.6954	7.5758
0.0031	0.0500	0.0205	0.9264	1.6792	6.4276	3.8278
0.0031	0.0744	0.0299	0.8926	1.4141	7.2311	5.1136
0.0030	0.0905	0.0353	0.8712	1.2373	5.8920	4.7619
0.0031	0.0998	0.0399	0.8572	0.6187	7.2311	11.6883
w_6^M	w_2^{MI}	w_4^{MI}	w_1^{MI}	C_6^{FRA} (g/L)	C_6^{FRP} (g/L)	K_G
0.0030	0.0459	0.0232	0.9280	0.7954	2.9460	3.7037
0.0032	0.0615	0.0299	0.9054	1.4141	4.8207	3.4091
0.0030	0.0768	0.0374	0.8827	1.3257	3.7494	2.8283
0.0030	0.0968	0.0439	0.8563	1.2373	3.4816	2.8139
0.0030	0.1068	0.0502	0.8400	3.1180	4.0173	1.2884
$100w_6^M$	$100w_2^{MI}$	$100w_5^{MI}$	$100w_1^{MI}$	C_6^{FRA} (g/L)	C_6^{FRP} (g/L)	K_G
0.003	0.035	0.022	0.940	2.316	0.803	0.3470
0.003	0.050	0.031	0.916	2.245	0.536	0.2386
0.003	0.071	0.042	0.884	2.528	1.071	0.4238
0.003	0.083	0.049	0.865	2.563	1.875	0.7315
0.003	0.103	0.060	0.834	2.404	0.402	0.1671

Fonte: Próprio autor

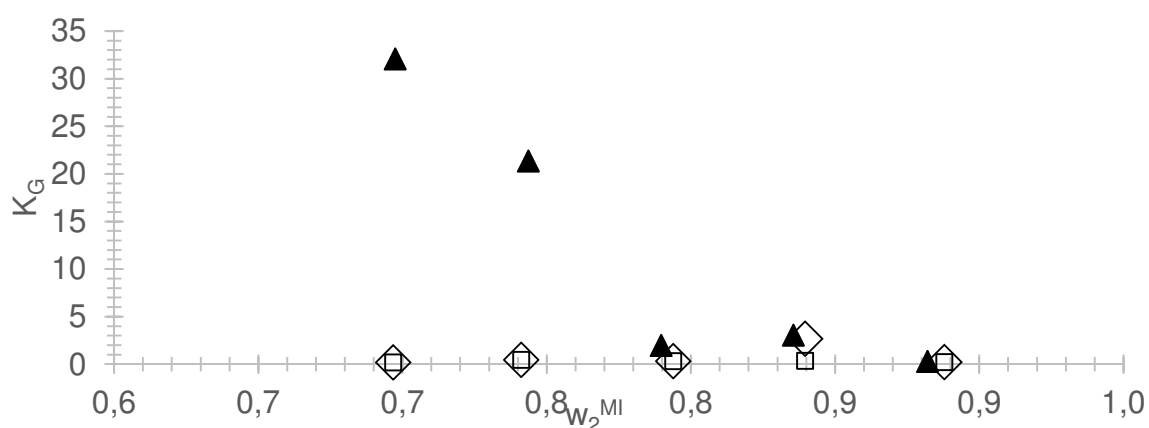


Figura 27 – Coeficiente de partição da glicose em um sistema quaternário constituídos por água (1) + Triton X-114 (2) + sulfato de sódio (3) (◊) ou (4) citrato de sódio (◻) ou (5) (▲) tartarato de sódio + (6) glicose ($w=5,10,15,20$ e 25 %) a 20 °C

Fonte: Próprio autor

Na Figura 29 são apresentados os coeficientes de partição da glicose em sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal, adicionados de 0,03 % (m/m) de glicose, de modo a se considerar um estado aproximado de diluição infinita deste componente e, deste modo, podendo-se desconsiderar o seu efeito no comportamento de ELL do sistema.

De modo geral os coeficientes de partição da glicose seguiram a seguinte sequência $K_G(\text{sulfato}) > K_G(\text{citrato}) > K_G(\text{tartarato})$, para toda a faixa de concentração estudada. Em baixas concentrações de glicose, o efeito *salting out* dos ânions SO_4^{2-} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$, $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$ seguiu a mesma ordem para as moléculas de glicose. Uma vez que a partição da glicose e do Triton X-114 podem ser relacionados a maior hidratação dos ânions do eletrólito, que por sua vez determina a intensidade do efeito de desestruturação da fase aquosa (efeito caotrópico) este resultado está de acordo com o esperado.

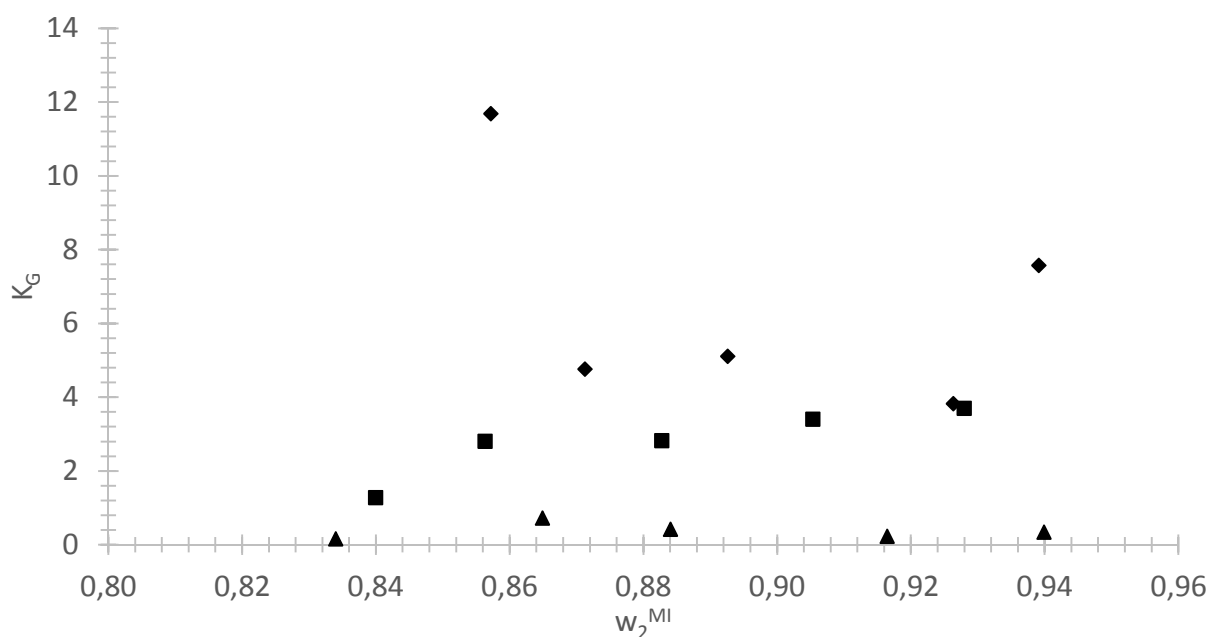


Figura 28 – Coeficiente de partição da glicose em um sistema quaternário constituídos por (1) água + (2) Triton X-114 + (3) sulfato de sódio (◆) ou (4) citrato de sódio (■) ou (5) tartarato de sódio (▲) + (6) glicose ($w_6 = 0,0003$) a 20 °C

Fonte: Próprio autor

7 CONCLUSÕES

Nos sistemas constituídos por Triton X-114 + água + sal, o efeito *salting out* dos ânions foi maior para os ânions SO_4^{2-} e similar para os ânions $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ e $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$. Embora o ânion citrato tenha valência maior, para o qual era esperado maior efeito *salting out*, esta diferença de comportamento pode ser resultado do volume muito menor ocupado pelos ânions SO_4^{2-} , o que faz com que estes tenham um número muito maior de ânions para uma mesma massa ou volume de solução aumentando a densidade eletrônica, bem como seu nível de hidratação devido ao maior número de ligação com as moléculas de água.

A alteração da temperatura levou a mudanças na inclinação das linhas de amarração. O solutropismo, presente discretamente nos sistemas contendo citrato de sódio e tartarato de sódio a 30 °C, e no sistema contendo sulfato de sódio a 20 °C, aumentou devido ao abaixamento da temperatura. Este comportamento está diretamente relacionado as mudanças na seletividade do eletrólito, e conseqüentemente em sua partição, devido á alteração da temperatura. O aumento da temperatura resultou em aumento da região bifásica para todos os sistemas. Este efeito está ligado a mudanças na hidratação das moléculas de polímero em função deste parâmetro, bem como a temperatura micelar crítica da mistura Triton X-114 + água. Uma vez que quando os sistemas encontram-se em temperaturas inferiores a este ponto, em dadas concentrações de sais, como a 10 °C, o polímero apresenta-se disperso na solução; enquanto que na temperatura de 30 °C este agrega-se em micelas, provavelmente diminuindo o espaço disponível para o soluto hidratado e para a água na FRP.

Nos sistemas constituídos por Triton X-114 + água + glicose, o efeito *sugaring out* deste carboidrato sobre o polímero foi menor que o efeito *salting out* exercido pelos três sais, o que pode ser explicado pela menor hidratação das moléculas de glicose em relação aos íons dos eletrólitos resultando em menor efeito caotrópico.

A partição da glicose, quando em baixa concentrações no sistema, embora em intensidade diferente, sofreu a mesma tendência do efeito *salting out* exercido sobre o polímero, com o carboidrato se particionando preferencialmente para a fase polimérica.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. S. et al. Influence of the additives on clouding of non-ionic surfactant triton X-114 solutions: evaluation of thermodynamics at the CP. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 36, n. 11, p. 1569–1576, 2 nov. 2015.
- ALBERTO, M. Aqueous Two-Phase Systems: Properties, Functions and Advantages. **ResearchGate**, p. 1–14, 15 maio 2018.
- ALBERTSSON, P.-Å. Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments. **Nature**, v. 177, p. 771, 28 abr. 1956.
- ALBERTSSON, P. Å. **Partition of cell particles and macromolecules : separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology**. Third edit ed. New York: :Wiley, 1986.
- ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; GODDARD, E. D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. **Langmuir**, v. 3, n. 1, p. 25–31, jan. 1987.
- AZIMAIE, R. et al. Liquid–liquid phase equilibrium of MgSO₄ and PEG1500 aqueous two-phase system. **Physics and Chemistry of Liquids**, v. 48, n. 6, p. 764–772, dez. 2010.
- BARANI, A. et al. Influence of the molecular weight of polymer, temperature and pH on phase diagrams of poly (ethylene glycol) + di-potassium tartrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 459, p. 1–9, 15 mar. 2018.
- BERGGREN, K.; JOHANSSON, H.-O.; YJERNELD, F. Effects of salts and the surface hydrophobicity of proteins on partitioning in aqueous two-phase systems containing thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers. **Journal of Chromatography A**, v. 718, n. 1, p. 67–79, 1 dez. 1995.
- BOLAR, S.; BELUR, P. D.; IYYASWAMI, R. Partitioning Studies of Glutaminase in Polyethylene Glycol and Salt-Based Aqueous Two-Phase Systems. **Chemical Engineering & Technology**, v. 36, n. 8, p. 1378–1386, 1 ago. 2013.
- BRIDGES, N. J.; GUTOWSKI, K. E.; ROGERS, R. D. Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt–salt ABS). **Green Chem.**, v. 9, n. 2, p. 177–183, 1 fev. 2007.
- CHAKRABORTY, A.; SEN, K. Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 41–55, 12 fev. 2016.
- CUNHA, J. S. **Produção e caracterização da enzima frutossiltransferase de Aspergillus oryzae IPT-301 visando a obtenção de frutooligossacarídeos**. [s.l.] Universidade Federal de Alfenas, 2017.
- GONÇALVES, L. F. S et al. Equilibrium phase behavior of aqueous two-phase system formed by triblock copolymer + sulfate salt + water at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 478, p. 145–152, 25 dez. 2018.

DAVIES, H. G. et al. Biotransformations—Introduction and Background Information. **Biotransformations in Preparative Organic Chemistry**, p. 1–23, 1 jan. 1989.

SAMPAIO, D. A. et al. Aqueous two-phase (polyethylene glycol + sodium sulfate) system for caffeine extraction: equilibrium diagrams and partitioning study. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 98, p. 86–94, 1 jul. 2016.

DEMBCZYŃSKI, R. et al. Lysozyme extraction from hen egg white in an aqueous two-phase system composed of ethylene oxide–propylene oxide thermoseparating copolymer and potassium phosphate. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 369–374, 1 mar. 2010.

DEMBCZYŃSKI, R.; BIALAS, W.; JANKOWSKI, T. Recycling of phase components during lysozyme extraction from hen egg white in the EO50PO50/K₂HPO₄ aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1–2, p. 24–31, 15 ago. 2010.

DOMINGUEZ, A. et al. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1174–1179, 1 ago. 2012.

DREYER, S.; KRAGL, U. Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 1416–1424, 15 abr. 2008.

DYR, J. E.; SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 699, n. 1–2, p. 383–401, 10 out. 1997.

FILIFE HOBI, 1992- BORDÓN SOSA. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas de duas fases aquosas (S DFA) formados por polímero (PEG ou PVP) e sal inorgânico (CuSO₄ ou MnSO₄): determinação experimental e modelagem termodinâmica**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2017.

FRANCO, T. T.; ANDREWS, A. T.; ASENJO, J. A. Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 3, p. 300–308, 26 mar. 2000.

GHAFFARI, S. et al. Partitioning of cefazolin in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium salts (citrate, tartrate, and sulphate). **Fluid Phase Equilibria**, v. 488, p. 54–61, 1 jun. 2019.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 02, p. 259, 10 dez. 2004.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491, 14 jun. 2017.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1 jun. 1995.

GIULIANO, K. A. Aqueous two-phase partitioning. Physical chemistry and bioanalytical applications. **FEBS Letters**, v. 367, n. 1, p. 98–98, 19 jun. 1995.

GU, T.; GALERA-GÓMEZ, P. A. Clouding of Triton X-114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 104, n. 2–3, p. 307–312, 20 nov. 1995.

GUERRAND, D. Economics of food and feed enzymes: Status and perspectives. **Enzymes in Human and Animal Nutrition**, p. 487–514, 1 jan. 2018.

HAMZEHZADEH, S.; ZAFARANI-MOATTAR, M. T. Phase separation in aqueous solutions of polypropylene glycol and sodium citrate: Effects of temperature and pH. **Fluid Phase Equilibria**, v. 385, p. 37–47, 15 jan. 2015.

HEY, M. J.; JACKSON, D. P.; YAN, H. The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly(ethylene glycol). **Polymer**, v. 46, n. 8, p. 2567–2572, 29 mar. 2005.

HO, S. V. Strategies for Large-Scale Protein Purification. In: **Protein Purification**. New York: ACS Symposium Series, Vol. 427, 1990. p. 14–34.

HOFMEISTER, F. Zur lehre von der wirkung der salze. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 25, n. 1, p. 1–30, 1888.

INGRAM, T. et al. Aqueous Surfactant Two-Phase Systems for the Continuous Countercurrent Cloud Point Extraction. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 84, n. 6, p. n/a–n/a, 9 maio 2012.

JACOB, M. M.; PRAPULLA, S. G. Fructans including inulin. In: **Handbook of analysis of active compounds in functional foods**. Florida: CRC Press, 2012. p. 593–604.

JOHANSSON, H.-O.; KARLSTRÖM, G.; TJERNELD, F. Temperature-induced phase partitioning of peptides in water solutions of ethylene oxide and propylene oxide random copolymers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1335, n. 3, p. 315–325, 6 jun. 1997.

JUNQUEIRA, C. M. et al. How does the use of surfactants in polymer-salt based aqueous two-phase systems affect the annatto dye (*Bixa orellana* L.) partitioning? **Fluid Phase Equilibria**, v. 478, p. 14–22, 25 dez. 2018.

KEPKA, C. et al. Extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, n. 1–2, p. 95–104, 23 jan. 2004.

KEPKA, C. et al. Two-step recovery process for tryptophan tagged cutinase: Interfacing aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, n. 1–2, p. 33–41, 20 maio 2005.

KOMAROMY-HILLER, G.; VON WANDRUSZKA, R. Clouding of Nonionic Detergents: Energy Transfer to a Solubilized Probe. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 5, p. 1436–1441, fev. 1995.

KOSHY, L.; SAIYAD, A. H.; RAKSHIT, A. K. The effects of various foreign substances on the cloud point of Triton X 100 and Triton X 114. **Colloid and Polymer Science**, v. 274, n. 6, p. 582–587, jun. 1996.

KUMAR, C. G.; SRIPADA, S.; POORNACHANDRA, Y. Status and future prospects of fructooligosaccharides as nutraceuticals. **Role of Materials Science in Food Bioengineering**, p. 451–503, 1 jan. 2018.

LADISCH, M. R. **Protein purification : from molecular mechanisms to large-scale processes**. 198th. ed. Miami Beach, Fla.: American Chemical Society, 1990.

LEONG, Y. K. et al. Thermoseparating aqueous two-phase systems: Recent trends and mechanisms. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 4, p. 640–647, 1 fev. 2016.

LIENQUEO, M. E.; ASENJO, J. A. Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes. **Computers & Chemical Engineering**, v. 24, n. 9–10, p. 2339–2350, 1 out. 2000.

LU, Y. et al. Measurement and correlation of phase equilibria in aqueous two-phase systems containing polyoxyethylene lauryl ether and diammonium hydrogen phosphate or dipotassium hydrogen phosphate at different temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 57, n. 8, p. 2313–2321, 9 ago. 2012.

LU, Y. et al. Measurement and correlation of phase equilibria in aqueous two-phase systems containing polyoxyethylene lauryl ether and three kinds of potassium salts at different temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 58, n. 1, p. 118–127, 10 jan. 2013.

LU, Y. et al. Measurement and correlation of phase equilibria in aqueous two-phase systems containing polyoxyethylene lauryl ether and tartrate salt at different temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 59, n. 6, p. 1843–1851, 12 jun. 2014.

MA, B. et al. Liquid–liquid phase equilibrium in the ternary system poly(ethylene glycol) + Cs₂CO₃ + H₂O. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 50, n. 3, p. 792–795, 2005.

MARTINS, J. P. et al. Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol) 400 and sulfate salts. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, n. 3, p. 1247–1251, 11 mar. 2010.

MERCHUK, J. C. **Experiments on phase inversion in aqueous two-phase systems**. International Symposium on Liquid-Liquid Two Phase Flow and Transport Phenomena. **Anais...Connecticut: Begellhouse**, 1997Disponível em: <<http://www.dl.begellhouse.com/references/1bb331655c289a0a,75fe084933ffbd81,40e190310abe054f.html>>. Acesso em: 17 set. 2018

MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 285–293, 26 jun. 1998.

MITCHELL, D. J. et al. Phase behaviour of polyoxyethylene surfactants with water. Mesophase structures and partial miscibility (cloud points). **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases**, v. 79, n. 4, p. 975, 1 jan. 1983.

MITSUOKA, T.; HIDAKA, H.; EIDA, T. Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal microflora. **Food / Nahrung**, v. 31, n. 5–6, p. 427–436, 1 jan. 1987.

NINESS, K. R. Inulin and oligofructose: what are they? **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402S–1406S, 1 jul. 1999.

OLIVEIRA, A. C. et al. Study of liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems formed by poly (ethylene glycol) (PEG) and sodium thiosulfate pentahydrate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 476, p. 118–125, 25 nov. 2018.

OWEN, R. O.; CHASE, H. A. Direct purification of lysozyme using continuous counter-current expanded bed adsorption. **Journal of Chromatography A**, v. 757, n. 1–2, p. 41–49, 3 jan. 1997.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's chemical engineers' handbook**. United States of America: McGraw-Hill, 2008.

PERSSON, J. et al. Purification of recombinant apolipoprotein A-1 Milano expressed in *Escherichia coli* using aqueous two-phase extraction followed by temperature-induced phase separation. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 97–109, 26 jun. 1998.

PRAUSNITZ, J. M.; LICHTENTHALER, R. N.; AZEVEDO, E. G. DE. **Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria**. 3rd. ed. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1999.

PRZYBYCIEN, T. M.; PUJAR, N. S.; STEELE, L. M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 469–478, 1 out. 2004.

RITTER, E. et al. Influence of Inorganic Salts on the Phase Equilibrium of Triton X-114 Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 61, n. 4, p. 1496–1501, 14 abr. 2016.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1–S63, 4 ago. 2010.

ROSA, P. A. J. et al. Downstream processing of antibodies: Single-stage versus multi-stage aqueous two-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 50, p. 8741–8749, 11 dez. 2009.

SADEGHI, R.; GOLABIAZAR, R. Thermodynamics of phase equilibria of aqueous poly(ethylene glycol) + sodium tungstate two-phase systems. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, n. 1, p. 74–79, 14 jan. 2010.

SAFONOVA, E. A. et al. Partitioning equilibria in multicomponent surfactant systems for design of surfactant-based extraction processes. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 12, p. 2840–2850, 1 dez. 2014.

SÁNCHEZ-FERRER, A. et al. Triton X-114 phase partitioning in plant protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 668, n. 1, p. 75–83, 6 maio 1994.

SCHÜGERL, K.; HUBBUCH, J. Integrated bioprocesses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 294–300, 1 jun. 2005.

SILVÉRIO, S. C. et al. The effect of salts on the liquid–liquid phase equilibria of PEG 600 + salt aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 58, n. 12, p. 3528–3535, 12 dez. 2013.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. **Introduction to chemical engineering thermodynamics**. New York: McGraw-Hill, 2005.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; DE ARAGAO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2013.

WALTER, H.; BROOKS, D. E.; FISHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase systems : theory, methods, uses, and application to biotechnology**. United States of America: Academic Press, 1985.

WANG, L. et al. Green separation of bromelain in food sample with high retention of enzyme activity using recyclable aqueous two-phase system containing a new synthesized thermo-responsive copolymer and salt. **Food Chemistry**, v. 282, p. 48–57, 1 jun. 2019.

YAZAWA, K.; IMAI, K.; TAMURA, Z. Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by Bifidobacteria. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 11, p. 3306–3311, 25 nov. 1978.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMZEZHARDEH, S. Effect of pH on the phase separation in the ternary aqueous system containing the hydrophilic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the kosmotropic salt potassium citrate at $T = 298.15$ K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 304, n. 1–2, p. 110–120, 15 maio 2011.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMZEZHARDEH, S.; HOSSEINZARDEH, S. Phase diagrams for liquid–liquid equilibrium of ternary poly(ethylene glycol) + di-sodium tartrate aqueous system and vapor–liquid equilibrium of constituting binary aqueous systems at $T = (298.15, 308.15, \text{ and } 318.15)$ K: Experiment and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 268, n. 1–2, p. 142–152, 25 jun. 2008.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning : physical chemistry and bioanalytical applications**. New York: M. Dekker, 1995.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658–663, 1 dez. 2006.

APÊNDICE A - Validação da curva binodal do sistema Triton x-114 + sulfato de sódio + água

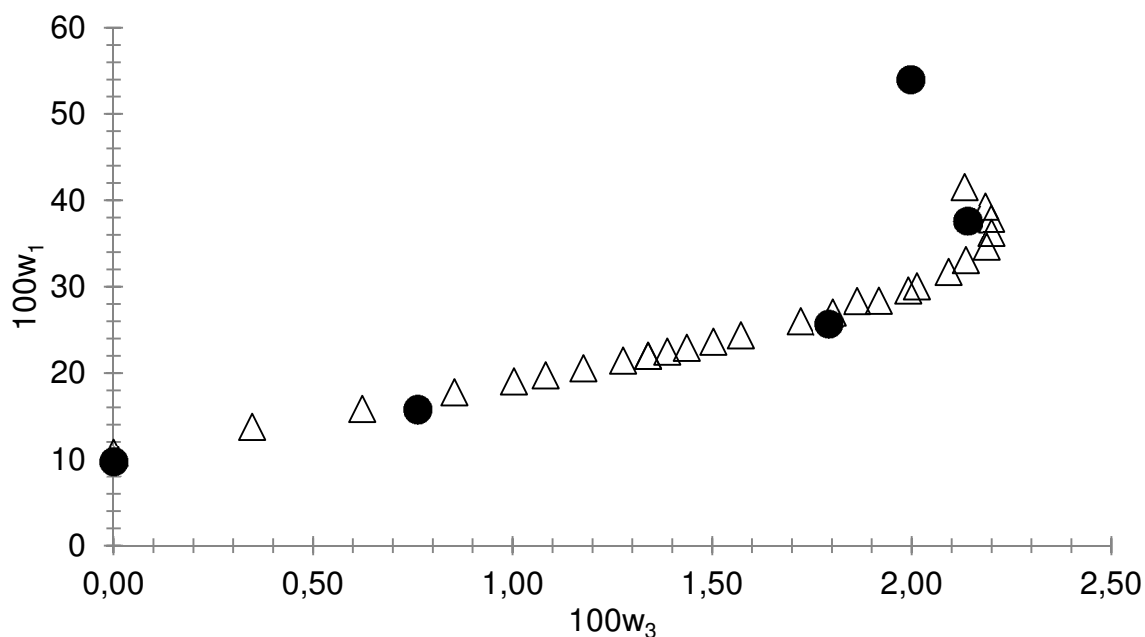


Figura 29 - Curva binodal para a FRP no sistema constituídos por (1) + (2) + (3) (Δ) e dados reportados da literatura (●)(RITTER et al., 2016) a 30°C

Fonte: Próprio autor

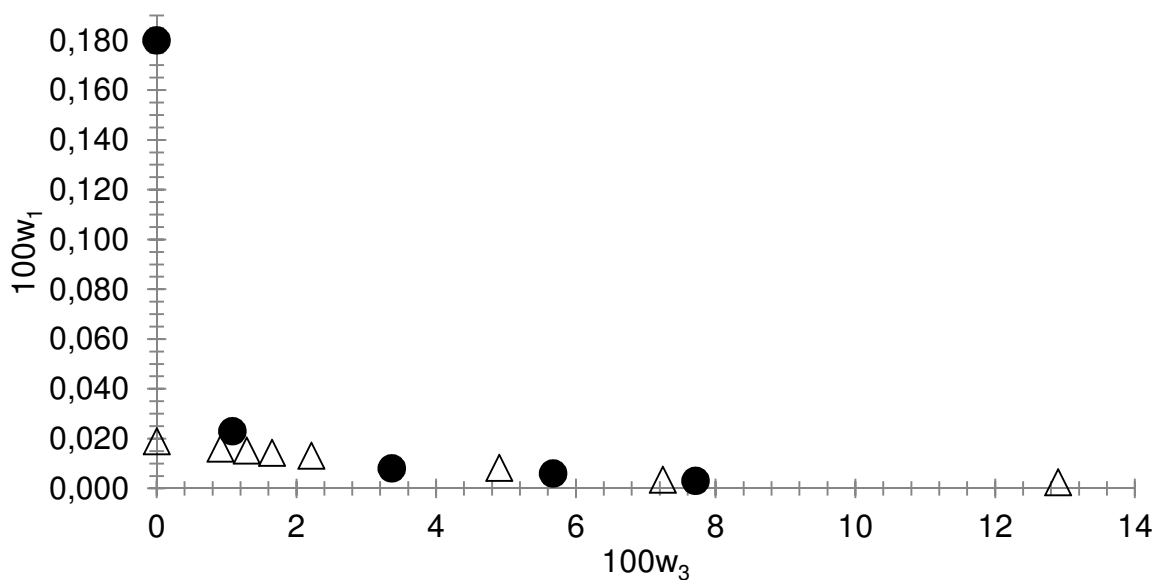


Figura 30 - Curva binodal para a FRA no sistema constituídos por (1) + (2) + (3) (Δ) e dados reportados da literatura (●)(RITTER et al., 2016) a 30°C

Fonte: Próprio autor

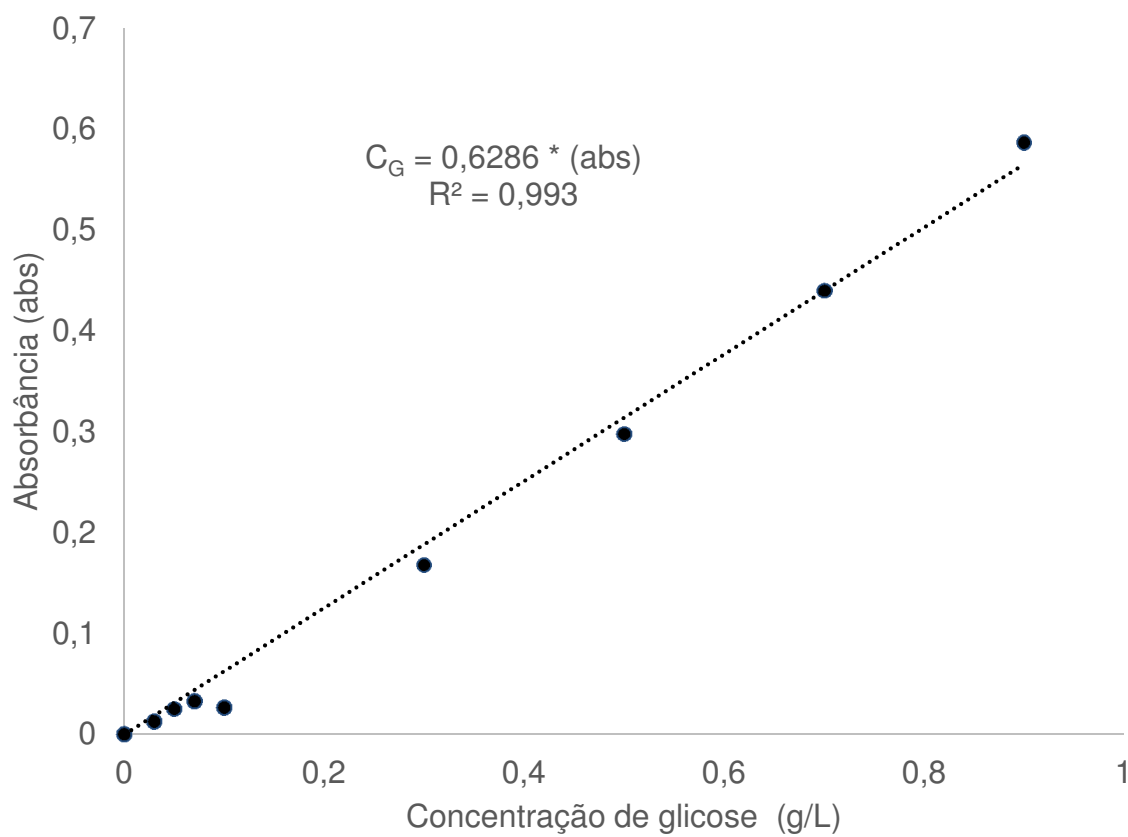
APÊNDICE B - Curva analítica DNS

Figura 31 - Curva analítica do método DNS para determinação de açúcares redutores