

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-UNIFAL-MG

PEDRO LÚCIO BONIFÁCIO

“Equilíbrio Líquido-Líquido em Misturas de Polietilenoglicol (4.000 ou 6.000 ou 10.000 g mol⁻¹)+ Bissulfito de Sódio + Água em Diferentes Temperaturas”

ALFENAS/ MG

2015

PEDRO LÚCIO BONIFÁCIO

“Equilíbrio Líquido-Líquido em Misturas de Polietilenoglicol (4.000 ou 6.000 ou 10.000 g mol⁻¹)+ Bissulfito de Sódio + Água em Diferentes Temperaturas”

Exame de Defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Dr. Luciano Sindra Virtuoso

Coorientador: Dr Eduardo Costa de Figueiredo

ALFENAS/ MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Bonifácio, Pedro Lúcio.

“Equilíbrio líquido-líquido em misturas de Polietilenoglicol (4.000 ou 6.000 ou 10.000 g mol⁻¹) + Bissulfito de sódio + água em diferentes temperaturas”. / Pedro Lúcio Bonifácio. -- Alfenas/MG, 2015.
55 f.

Orientador: Luciano Sindra Virtuoso.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2015.
Bibliografia.

1. Análise Físico-Química. 2. Termodinâmica. 3. Propriedades Físicas e Químicas. I. Virtuoso, Luciano Sindra. II. Título.

CDD-541.3

Pedro Lúcio Bonifácio

“Equilíbrio Líquido-Líquido em Misturas de Polietilenoglicol (4.000 ou 6.000 ou 10.000 g mol⁻¹) + Bissulfito de Sódio + Água em diferentes Temperaturas”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovado em: 17/07/2015

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Prof. Dr. Elivelton Alves Ferreira
Instituição: UFF

Assinatura:  _____

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Instituto de Química por oferecer a oportunidade e infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

À meu orientador Dr. Luciano Sindra Virtuoso, pela orientação, confiança, incentivo e conselhos que contribuíram para minha formação tanto profissional como pessoal.

Aos colegas de Grupo de Pesquisa em Química de Colóides.

RESUMO

Em várias décadas os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) tem sido largamente estudados como promissores sistemas para separação, extração, purificação e pré-concentração de analitos diversos, em especial, os de interesse biotecnológicos. Embora esses sistemas sejam fáceis de serem preparados o controle de suas propriedades físico-químicas é dependente de inúmeros fatores e por isso, é essencial o conhecimento do comportamento de fase do SAB, expresso como um diagrama de fase, para sua aplicação. O presente trabalho teve por objetivo o estudo experimental do equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos (SAB) formados por mistura de PEG (4.000, 6.000 e 10.000g mol⁻¹) + bissulfito de sódio + água em quatro temperaturas variando de 288,15 a 318,15 K. Cada diagrama foi caracterizado por 5 linhas de amarração em cada temperatura. Nos diagramas obtidos foi observado um deslocamento significativo do *locus* das curvas binodais com a elevação da temperatura, levando a um aumento da região bifásica. Essa característica evidencia um processo de separação de fases endotérmico. O aumento da massa molar do polímero também favorece a formação do SAB. Estudos cinéticos com monitoramento do pH e composição das fases no tempo mostraram que o equilíbrio nos SAB estudados é alcançado com cerca de 3h em repouso no banho termostaticado. No intervalo de 72h do estudo cinético os SAB se mostraram estáveis. Os novos SAB obtidos ainda não foram descritos na literatura e podem apresentar potencial aplicação para processos de separação usando a propriedade de conservante químico do bissulfito de sódio.

Palavras-chave: Sistemas aquosos bifásicos, polietilenoglicol, bissulfito de sódio, equilíbrio líquido-líquido.

ABSTRACT

In several decades the Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) have been widely studied as promising systems for separation, extraction, purification and pre-concentration of various analytes, particularly the biotechnological interest. While these systems are easy to prepared control of their physicochemical properties is dependent on many factors and so it is essential to know the phase behavior of the ATPS, expressed as a phase diagram for your application. This study aimed to the experimental study of liquid-liquid equilibrium in aqueous two-phase systems (ATPS) formed by mixing PEG (4,000, 6,000 and 10,000 g mol⁻¹) + sodium bisulfite + water at four temperatures of 288.15 to 318.15 K. each diagram was characterized by 5 mooring lines at each temperature. In the diagrams obtained was a significant shift in the locus of the binodal curves, leading to an increase of the biphasic region with increasing temperature. This characteristic shows a process of endothermic phase separation. Increasing the molecular weight of the polymer also promotes the formation of SAB. Kinetic studies with pH monitoring and composition of the phases in time showed that the balance in the ATPS studied is reached with around 3 pm at rest in the thermostatic bath. In the 72 hours interval of the kinetic study the ATPS were stable. The new ATPS were not obtained in the literature and may have potential application for separation processes with increased property as a chemical preservative sodium bisulfite

Keywords: Aqueous two-phase systems, polyethylene glycol, sodium bisulfite, liquid-liquid equilibrium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATPS - Aqueous Two-Phase System
- CLA - Comprimento da linha de amarração
- ELL - Equilíbrio líquido-líquido
- ILA - Inclinação da linha de amarração
- NaHSO₃ - Bissulfito de sódio
- PEG - Poli(etileno glicol)
- SAB - Sistema Aquoso Bifásico
- w_I - Porcentagem mássica do componente “i”

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo de diagrama de fases de um sistema aquoso bifásico representando a mistura formada por sal, polímero e água, no modelo de coordenadas retangulares.....18
- Figura 2 - Comparação entre as curvas binodais experimentais.....35
- Figura 3 - Linhas de amarração experimentais para os sistemas (a) PEG 4.000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O (b) PEG 6.000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O nas temperaturas (○) 318,15 K e (●) 288,15 K e (c) PEG 10.000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O nas temperaturas (○) 318,15 K e (●) 288,15 K.....37
- Figura 4 - Comparação entre as curvas binodais experimentais na temperatura de 298,15K contendo PEG 4.000 g mol⁻¹ com sais de sódio com diferentes ânions + H₂O (○)Na₂SO₄; (●) Na₂SO₃; (○)KNaC₄H₄O₆ e (■) NaNO₃.....38
- Figura 5 - Diagramas de fases para os SAB formados por: (●) PEG 4.000 (○)PEG 6.000 e (□) PEG 10.000 g mol⁻¹ a 298,15 K.....40
- Figura 6 - Distribuição das espécies de sulfito em função de seu pH.....43
- Figura 7 - Curva binodal experimental e ajustada do PEG 4.000 g mol⁻¹+ NaHSO₃+ água a 298,15 K (□) resultados experimentais e (■) valores previstos com a equação de Merchuk.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de alguns SAB recentes e seus constituintes.....	15
Tabela 2 - Valores estimados dos coeficientes a_0 , a_1 e a_2 para os diferentes sistemas estudados.....	27
Tabela 3 - Concentração dos componentes no ELL do SAB formado por PEG 4.000 g mol ⁻¹ (w_1) + NaHSO ₃ (w_2) + H ₂ O (w_3) nas temperaturas (288,15 à 318,15) K em percentagem mássica.....	29
Tabela 4 - Concentração dos componentes ao longo da curva binodal para o SAB formado por PEG 4.000 g mol ⁻¹ (w_1) + NaHSO ₃ (w_2) + H ₂ O (w_3) nas temperaturas (288,15 à 318,15) K em percentagem mássica.....	30
Tabela 5 - Concentração dos componentes no ELL do SAB formado por PEG 6.000 g mol ⁻¹ (w_1) + NaHSO ₃ (w_2) + H ₂ O (w_3) nas temperaturas (288,15 à 318,15) K em percentagem mássica.....	31
Tabela 6 - Concentração dos componentes ao longo da curva binodal para o SAB formado por PEG 6.000 g mol ⁻¹ (w_1) + NaHSO ₃ (w_2) + H ₂ O (w_3) nas temperaturas de 288,15 à 318,15 K em percentagem mássica.....	32
Tabela 7 - Concentração dos componentes no ELL do SAB formado por PEG 10.000 g mol ⁻¹ (w_1) + NaHSO ₃ (w_2) + H ₂ O (w_3) nas temperaturas (288,15 à 318,15) K em percentagem mássica.....	33
Tabela 8 - Concentração dos componentes ao longo da curva binodal para o SAB formado por PEG 10.000 g mol ⁻¹ (w_1) + NaHSO ₃ (w_2) + H ₂ O (w_3) nas temperaturas (288,15 à 318,15) K em percentagem mássica.....	34
Tabela 9 - Valores da ILA obtidos experimentalmente para o SAB formado por PEG 4.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + H ₂ O.....	39

Tabela 10 - Valores da ILA obtidos experimentalmente para o SAB formado por PEG 6.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + H ₂ O.....	39
Tabela 11 - Valores da ILA obtidos experimentalmente para o SAB formado por PEG 4.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + H ₂ O.....	40
Tabela 12 - Análises do pH dos SAB formados por PEG 4.000, 6.000 e 10.000 g mol ⁻¹ (w ₁) + NaHSO ₃ (w ₂) + H ₂ O (w ₃) na temperatura de 298,15K, ao longo de 72 horas.....	42
Tabela 13 - Valores das composições de das fases superiores (S) e inferiores (I) SAB formados por PEG 4.000, 6.000 e 10.000g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + água em T = 298,15K até 78 h. Composições de misturas monitoradas da 1ª e 5ª LAL.....	44
Tabela 14 - Parâmetros de ajustes de Othmer-Tobias e Bancroft para os SAB formados por PEG (4.000, 6.000 e 10.000) g mol ⁻¹ +NaHSO ₃ + água nas temperaturas de 288,15 a 318,15K.....	46
Tabela 15 - Ajuste dos parametros das curvas binodais obtidas pela equação (8).....	48

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO	12
1.1 -	HISTÓRICO.....	12
1.2 -	DEFINIÇÃO DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB).....	15
1.3.1 -	Elementos de Estudo dos SAB	17
1.4 -	FATORES QUE INFLUENCIAM A FOMAÇÃO DOS SAB.....	20
1.4.1 -	Massa Molar e Concentração do Polímero	20
1.4.2 -	Tipo e Concentração do Sal	20
1.4.3 -	Temperatura	22
1.5 -	MONTAGEM DE DIAGRAMAS DE FASES DA MISTURA FORMADA ENTRE PEG (4.000,6.000 e 10.000) + NaHSO ₃ + H ₂ O.....	23
2 -	METODOLOGIA	25
2.1-	MATERIAIS.....	25
2.2 -	OBTENÇÃO DAS CURVAS BINODAIS.....	25
2.3 -	MONTAGEM E ANÁLISES DOS SAB.....	25
2.4 -	CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES.....	25
2.5 -	MONITORAMENTO DO pH DAS FASES.....	27
3 -	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
3.1-	EFEITO DA TEMPERATURA.....	28
3.2 -	EFEITO DA MASSA MOLAR DO PEG.....	39

3.3 - MONITORAMENTO DO pH DAS FASES (ANÁLISES).....	40
3.4 - AJUSTE DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO.....	44
3.5 – AJUSTE DAS BINODAIS.....	46
4- CONCLUSÃO	48
5- REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Nesta seção serão abordados os principais fatores históricos da área.

1.1 HISTÓRICO

As primeiras soluções aquosas que segregaram fases, consideradas como *Sistemas Aquosos Bifásicos* foram descobertas em 1896. Beijerinck, em seus experimentos de microbiologia, observou um fenômeno diferente ao se misturas soluções aquosas de gelatina e ágar (ou amido), no qual havia uma formação de duas fases líquidas (BEIJERINCK, 1986).

Posteriormente em 1929, Ostwald e Hertel em seus estudos tentando entender a separação de fases desses materiais, verificaram que para variadas fontes de amido, eram necessárias diferentes concentrações para a separação das fases (ALBERTSSON,1986).

Alguns anos depois em 1947, Dobry e Boyer-Kawenoki estudaram a mistura de pares de polímeros solúveis em água ou em solventes orgânicos, para confirmar se há a ocorrência ou não de separação de fases. Em seus estudos constataram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, e concluíram que a formação de SAB entre esses polímeros era um fenômeno geral (HATTI-KAIL,2000).

Uma grande ascensão para essa técnica de separação líquido-líquido foi através dos trabalhos de Albertsson (1986), no qual observou que quando uma proteína foi colocada uma proteína em um sistema aquoso bifásico, a distribuição desta biomolécula é desigual entre essas duas fases. Esses estudos serviram de precursores para as analogias com processos de extração líquido-líquido (ALVES et al, 2004).

A partir desses estudos foram publicados trabalhos que envolvem aplicação destes sistemas à partição ou purificação de materiais biológicos, desde proteínas até células, como relata Merchuk (MERCHUCK; ANDREWS; ASENIO, 1998).

Com o avanço da pesquisa nessa área, em 1971 Ryden & Albertsson, fizeram a primeira publicação no qual havia dados de tensão interfacial em sistemas formados por PEG e dextrana, onde foi relatado um comportamento característico em função de duas variáveis termodinâmicas; o comprimento da linha de amarração (CLA) e a massa molar dos dois polímeros. Atualmente, outras variáveis características desses sistemas como: temperatura, natureza dos íons, pH e etc., já estão bem definidas para propor uma modelagem (RYDEN et al, 2004).

Cerca 10 anos após a publicação de Albertsson, em 1984 Brooks e colaboradores, estudaram o mesmo sistema e fizeram a proposta de uma relação exponencial entre a tensão interfacial e a diferença de composição entre as duas fases, expressa pelo comprimento da linha de amarração (BROOKS; FISHER, 1995).

Em 1995 Zaslavsky sugeriu que outra possível caracterização dos SAB poderia ser feita pela inclinação das linhas de amarração (ILA ou STL). Para este autor, a grandeza STL (“Slope of the Tie Line”) é constante para as linhas de amarração de um SAB (ZASLAVSKY,1995). Esta afirmação, foi confirmada com maior precisão por Madeira em 2008 que apresentou um método para confirmar que as grandezas extensivas fossem constantes ao longo da STL para os sistemas aquosos bifásicos investigados (MADEIRA, 2008).

Prosseguindo os estudos em 1998: Tada e Loh, obtiveram com a adição de CH_2Cl_2 a um sistema aquoso bifásico formado por Na_2SO_4 e PEG resultava em um sistema trifásico, onde, a fase mais densa era formada pela mistura H_2O e Na_2SO_4 , a fase intermediária era composta por PEO e CH_2Cl_2 , enquanto a fase superior era formada por PEO e H_2O . Outras tentativas foram feitas, por exemplo, a adição de n-hexano, a este sistema trifásico, na qual gerava um sistema tetrafásico em que a nova fase era a menos densa e formada por mistura de CH_2Cl_2 e n-hexano (TADA; LOH, 2004) .

Com o avanço da técnica em 2003, Rogers e seus colaboradores foram os primeiros desenvolverem um sistema com soluções aquosas de líquidos iônicos com imidazólio. Esses sistemas formaram SAB em presença de soluções de certos sais inorgânicos, como por exemplo K_3PO_4 (ROGERS; BRIDGES; GUROWSKI, 2007).

Na mesma década alguns trabalhos visaram as aplicações desses sistemas, como por exemplo, em 2007: Zhang detalhou a partição de biomoléculas em sistemas contendo acetonitrila e água à baixa temperatura (ZHANG, 2007).

Dois anos depois, em 2009, seguindo a mesma analogia de aplicações, novos SAB foram desenvolvidos. Coutinho e colaboradores utilizaram líquidos iônicos para a formação de sistemas bifásicos contendo PEG e sulfato para partição de aminoácidos (COUTINHO; CLAÚDIO; SILVEIRA, 2010).

Dentre os diferentes estudos, em 2014, Pereira e colaboradores estudaram a influência de vários líquidos iônicos nos SAB constituído por polietilenoglicol e Na_2SO_4 , e perceberam que a separação do L-triptofano na presença dos líquidos iônicos foi bastante eficiente no sistema, tal fenômeno proporcionou diretamente a mudança do coeficiente de partição da biomolécula (PEREIRA; SOBRAL; FREIRE; SANTOS, 2014).

Nos últimos anos alguns trabalhos foram feitos utilizando a incorporação de nanopartículas nesses sistemas, um exemplo bem recente neste ano de 2015, foi relatado por Raghavarao e colaboradores; que desenvolveram estudos de partição de uma enzima em SAB com nanopartículas de ouro incorporadas (RAGHAVARAO, 2015).

De maneira geral a Tabela 1 mostra os estudos atuais para alguns SAB da literatura específica em composições com diferentes constituintes com potencial de aplicação destes sistemas no desenvolvimento de tecnologias para a inovação dos processos industriais.

Tabela 1- Exemplo de alguns SAB recentes e seus constituintes.

Principais SAB	Constituintes	Referência
Polímero- Polímero	PEG/Dextrana	Gunduz e Korkmaz,2000
	PEG/PVA	Pessoa Jr, Kilikian, 2005
	PEG/Poli ácido acrílico	Saravanan, 2008
Polímero- Sal Inorgânico	PEG/ Fosfato de Potássio	Haraguchi, 2004
	PEG/ Sulfato de Magnésio	Oliveira, 2009
	PEG/ Tartarato de Sódio	Mageste,2009
	PEG/Sulfito de Sódio	Alvarenga , Virtuoso 2011
Líquido Iônico –Sal Inorgânico	[C4min]Cl./Fosfato de Potássio	Louros 2010
	[B4min]Cl/Sulfato de Magnésio	Alvarenga, Virtuoso,2012
Líquido Iônico – Carboidratos	[C4min]Cl/D-Maltitol	Freire, 2011
Líquido Iônico- Aminoácidos	[C4min]Cl/L-Lisina	Dominguez-Perez 2009
PEG- Sal Inorgânico (Nanopartículas)	PEG/Sulfato de Magnésio	Madhusudhan, Tavanandi e Raghavarao, 2015

Fonte: Do autor.

1.2 DEFINIÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS-SAB

Por definição um Sistema Aquoso Bifásico (SAB) é uma mistura formada por três componentes, na qual essa mistura segrega em duas fases após atingir um equilíbrio. Há décadas os SAB estão sendo expressivamente usados com processos de separação envolvendo íons (BULGARIU,2013), pequenas moléculas (VICENTE,2014), macromoléculas (COSTA,2015) e uma variedade de biomateriais, incluindo bactérias (L.C.EFFIO, L.et. all, 2015), e organelas celulares (PRAT, 2002). Muitos trabalhos relatam a aplicação de SAB com processos de clarificação, concentração e purificação, possibilitando a obtenção de elevados rendimentos, além de recuperação de materiais e posteriormente um aumento de escala (GRABER,2004).

Estes sistemas podem ser compostos por diversos materiais, com misturas de dois polímeros diferentes, tais como poli(etilenoglicol) e dextrana; polímeros e sal, tais como PEG e sulfato de sódio; pela mistura de dois sais que são os classificados como líquidos iônicos; ou até mesmo com nanopartículas incorporadas(NASCIMENTO,2010).

Em literatura específica, um SAB geralmente é descrito pela sua grande quantidade de água em suas fases. Essa observação empírica serve para SAB tradicionais que envolvem sais ou polímeros, já que as quantidades desses materiais devem ser realmente pequenas para a formação desses sistemas. Porém, alguns sistemas contendo líquidos iônicos apresentam frações de solutos maiores que a fração de água.

Segundo Rito-Palomares, os SAB podem ter um alto valor comercial/farmacêutico, devido aos processos de recuperação de materiais, como por exemplo, os trabalhos de SAB que contém polímero e visam a reciclagem deste por aquecimento da fase polimérica (RITO-PALOMARES,2004).

Os sistemas tradicionais (polímero-polímero ou polímero-sal) apresentam uma vantagem com relação as técnicas convencionais de separação que usam solventes orgânicos. Devido ao seu alto teor de água presente nas fases, esses SAB chegam a apresentar valores de 80 a 90% em fração mássica de água aproximadamente. A elevada fração de água nesses sistemas é propícia para materiais de origem biológica. Outra vantagem é que esses SAB proporcionam menor impacto no meio ambiente quando comparado a outros processos de separação/extração que usam solventes orgânicos. Sendo assim, trabalhos recentes correlacionam os SAB com alguns dos princípios da Química Verde.

Os sistemas mais citados são aqueles formados por PEG. Uma justificativa para esse fato, mencionada em vários trabalhos, está relacionada com as características que o polímero apresenta, como baixo custo e toxicidade, biodegradabilidade elevada e alta solubilidade em água, além do que os polímeros do tipo PEG apresentam aplicações biotecnológicas e são usados também como catalizadores em sínteses.

Atualmente, foram obtidos um grande volume de dados para equilíbrio contendo sal e polímero. Esses experimentos tem combinado PEG com diferentes tipos de sais, por exemplo, sulfitos, sulfatos, carbonatos, cloretos, nitratos, tartaratos (LEMOS et al, 2011) dentre outros, sendo que em literatura específica até o presente momento não há dados de equilíbrio para bissulfito de sódio e PEG.

1.3 ELEMENTOS DE ESTUDOS DOS SAB

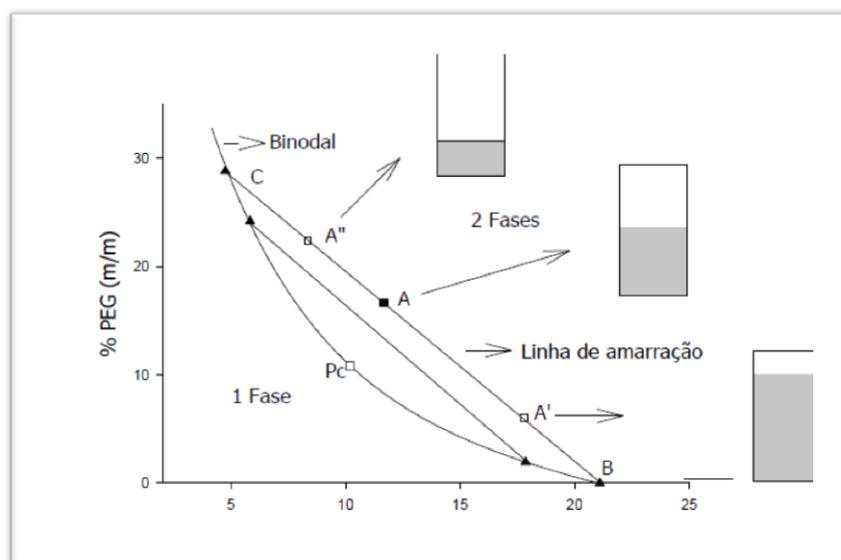
Nesta seção serão descritos todos elementos básicos que definem os SAB.

1.3.1 Diagrama de Fases

Os diagramas de fases para equilíbrio líquido-líquido são muito usados nos trabalhos que envolvem os SAB, e através desses diagramas uma série de parâmetros são estudados. Basicamente um diagrama de fases, representam graficamente a composição dos constituintes dos sistema em temperatura e pressão definidas.

Um dos exemplos de diagrama de fases, está representado na Figura 1, onde mostra a composição das fases no equilíbrio, em coordenadas retangulares. Nesse tipo de diagrama é omitida a concentração do solvente, neste caso a água. A concentração desse solvente pode ser obtida pela diferença entre os outros componentes presentes na mistura.

Figura 1: Modelo de diagrama de fases de um sistema aquoso bifásico representando a mistura formada por sal, polímero e água, no modelo de coordenadas retangulares.



Fonte: Do autor.

Pela a análise desse diagrama, podemos dividi-lo em duas regiões por uma linha denominada binodal ou curva do equilíbrio, em suma essa linha representa o “limite” entre as regiões monofásica e bifásica. Essa curva é obtida experimentalmente, geralmente por um método já bem definido na literatura como método de titulação turbidimétrica. Sistemas cuja composição fica abaixo da linha binodal formam apenas uma fase, enquanto os que ficam acima da binodal formam duas fases (ZAFARANI-MOATTAR, 2001).

Nesse diagrama também são representadas as linhas de amarração (linha CAB) que, para determinada composição global do sistema (A) fornece a concentração dos solutos nas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos C (fase superior) e B (fase inferior). Em uma análise direta convencionam-se que qualquer conjunto de pontos globais (A,A',A'') que esteja sobre a mesma LA fornecerá dados de equilíbrios que consideramos como propriedades termodinâmicas intensiva iguais, tais como composição, densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), porem as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc.). Esse tipo de determinação experimental é aplicado em diversas trabalhos seguindo o mesmo raciocínio para as fases inferiores, podendo ser confirmados nos trabalhos de Zaslavsky e Loh (2004).

Um outro parâmetro usado para estudar a separação de fases em SAB que pode ser descrito por uma dado numérico de referência é o comprimento da linha de amarração (CLA), este parâmetro é muito usado para medir a diferença das propriedades intensivas entre as fases em equilíbrio. O CLA é determinado geometricamente pela equação de Pitágoras, onde é considerado o CLA como a hipotenusa , e seus catetos são formados pela diferença da concentração dos componentes nas fases, sendo assim o CLA pode ser calculado pela equação (1):

$$CLA = [(w_1^{sup} - w_1^{inf})^2 + (w_2^{sup} - w_2^{inf})^2]^{0.5} \quad (1)$$

Onde w_1 e w_2 correspondem a diferença de concentração de PEG e sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa, respectivamente. À medida que aumenta o valor do CLA, torna-se maior a diferença de composição entre as fases. Uma outra inferência desse parâmetro, segundo Malpiedi, é que o aumento da CLA ocasiona a diminuição do volume livre nas fases de fundo do sistema (MALPIEDI, 2008).

Outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração (ILA). A ILA é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química, como a temperatura e a massa molar, um dos

exemplos importantes está no trabalho de Carvalho (CARVALHO, 2007), onde ele define que valor da inclinação pode ser calculado pela equação:

$$ILA = \frac{W_1^{sup} - W_1^{inf}}{W_2^{sup} - W_2^{inf}} \quad (2)$$

Este parâmetro apresenta atualmente como uma característica importante dos diagramas de fases uma vez que o seu valor é geralmente constante, sendo assim esses dados acabam servindo de referências para comparações afim de se obter diagramas de fases confiáveis.

Um outro conceito muito singular desses diagramas é o ponto crítico (Pc), neste ponto as propriedades (composição, volume entre outras) de ambas as fases são teoricamente as mesmas. Portanto, quanto mais a composição do sistema se aproxima do Pc, menor é a diferença entre as fases, ou seja, no Pc, as composições e os volumes entre as fases são teoricamente iguais. No entanto, nas proximidades do Pc existem pequenas alterações na composição dos sistemas, que provocam expressivas mudanças na qual o sistema varia de uma para duas fases e vice-versa. Este ponto pode ser obtido pela intersecção de uma linha que passa pelo ponto médio de várias LA, com a binodal. O ponto limite é o ponto onde a binodal é tangente à linha que une os segmentos iguais nos eixos do diagrama. A posição relativa do ponto limite e do Pc define a simetria do diagrama de fases. Quando há uma coexistência destes dois pontos coincidem o diagrama de fases considera-se simétrico, segundo Muller A (MULLER, 2013).

1.4 FATORES QUE INFLUECIAM A FORMAÇÃO DE SAB

Para cada sistema existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases, é necessário levantar dados e fazer testes de equilíbrio. Alguns desses diagramas estão disponíveis na literatura, porém é importante que ao testar um novo sistema se construa um diagrama nas condições de trabalho a serem utilizadas na extração (temperatura, pH, massa molar do PEG e adição de suspensões biológicas e outros).

1.4.1 Massa molar e concentração do polímero

Os polímeros são conhecidos por terem a capacidade de estabilizar estruturas particuladas e com atividades biológicas. De uma forma geral, quanto maior for a massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas, para uma determinada composição de fases, tanto menor será a concentração necessária, desse mesmo polímero, para que ocorra separação de fases e, menor será a partição de material biológico para a fase rica em polímero.

Quanto maior for a massa molar do polímero, menor será o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (AZIMAIE,2010). Com relação à concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero.

1.4.2 Tipo e Concentração do Sal

Albertsson (1986) observou que a separação de fases em misturas contendo polieletrólitos depende fortemente da força iônica e do tipo de íon presente no sistema. E ainda, que se uma quantidade suficiente de sal fosse adicionada, não seria necessário adicionar PEG ao sistema para que ocorresse a separação das fases. Desta forma, surgiram os primeiros SAB do tipo polímero-sal-água.

Zafarani-Moattar investigaram a formação de fases com os seguintes sais: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e Na_3PO_4 , todos apresentando o mesmo cátion, porém com ânions de diferentes valências. Eles verificaram que o aumento da carga do ânion diminui a concentração de sal necessária para a separação de fases (ZAFARANI-MOATTAR, 2004). Similar tendência foi observada por Goddard para SAB com NaOH , Na_2SO_4 e Na_3PO_4 . A eficiência do ânion na formação de fases foi encontrada na seguinte ordem decrescente: $\text{PO}_4^{-3} > \text{SO}_4^{-2} > \text{OH}^{-1}$

(GODDARD, 2002). Nesse sentido, Zafarani-Moattar, descreveram que ânions com uma maior valência são melhores agentes *salting-out* do que ânions com valência mais baixa, porque o ânion torna-se mais hidratado e assim diminui a quantidade disponível para hidratar o PEG.

Comparando-se sais que contém o mesmo cátion, mas ânions diferentes com mesma carga (NaH_2PO_4 e NaHSO_4), a eficiência é aumentada do sal de sulfato para o sal de fosfato, pois a solubilidade deste em água é mais baixa do que o sal de sulfato. Em relação aos sais que apresentam o mesmo ânion, mas com cátions monovalentes de diferentes tamanhos (K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Na_2HPO_4), pode-se observar que a região bifásica aumenta quando o tamanho do cátion decresce segundo os estudos de equilíbrio de Gasemi. Este comportamento pode ser analisado considerando dois cátions (ou dois ânions) da mesma valência. Considerando dois íons de diferentes raios e, portanto diferentes densidades de carga, o íon de menor raio (e maior densidade de carga) irá interagir com o PEG em maior proporção, favorecendo a interação entre o PEG e o sal, resultando na maior quantidade de sal necessária à saturação da cadeia do polímero e na diminuição da região bifásica.

1.4.3 Temperatura

A influência da temperatura é um dos parâmetros mais estudados nesses trabalhos de equilíbrio líquido-líquido devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio. Geralmente, para baixas temperaturas (menores que 20 °C) a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas de fases próximos do ponto crítico podem ser mais influenciados pela mudança de temperatura devido à sua instabilidade, quando a curva binodal é deslocada, podendo assim o sistema passar facilmente para a região monofásica

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero e polímero ou polímero e sal, e outros. Um bom exemplo é o sistema formado por PEG e dextrana, no qual foi constatado que com o aumento da temperatura era necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG e sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada (TABOADA, 2005).

Em sistemas que contem PEG, podemos constatar que a atração entre as moléculas de PEG aumenta com o aumento da temperatura, enquanto a interação entre as moléculas de PEG e as moléculas de água diminui. Em outras palavras, as moléculas de PEG tornam-se mais hidrofóbicas com o aumento da temperatura, e conseqüentemente as moléculas de PEG podem ser dissolvidas em quantidade de matéria igual a da água. Alguns trabalhos relatam outro conceito muito usado nesses sistemas que é o coeficiente de partição⁴⁷, como por exemplo, Johansson, que descreve um aumento do coeficiente de partição com a temperatura; outros que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura, relatado por Tjerneld, mais recentemente trabalhos com sais e líquidos iônicos relatam que a modificação da temperatura, faz com que alguns sistemas invertam as suas fases (CASTRO, 2005).

1.5 MONTAGEM DE DIAGRAMAS DE FASES DA MISTURA FORMADA ENTRE PEG (4.000, 6.000 e 10.000) + NaHSO₃ + H₂O.

A aplicação dos SAB como técnica de separação e purificação de materiais diversos, em especial os biomateriais é largamente dependente do estudo do comportamento de fases desses sistemas, expresso como diagramas de fase. Estes sistemas podem ser compostos por misturas aquosas de dois polímeros (polímero A + polímero B), tal como poli(etileno glicol) (PEG) e dextrana, polímero e sal, tal como poli(etileno glicol) (PEG) e fosfato de potássio, ou mesmo dois sais com o advento dos chamados líquidos iônicos. Tanto os SAB formados pelas misturas de polímero-polímero e polímero-sal em água possuem vantagens em relação às convencionais técnicas utilizando solventes orgânicos devido ao elevado teor de água nas duas fases em equilíbrio. Esta elevada proporção de água (frações mássicas entre 80% e 90%) nas fases do SAB proporciona um ambiente biocompatível aos materiais de origem biológica, além de proporcionar menor impacto ao ambiente quando comparado com outros processos de separação/extração que empregam solventes orgânicos.

Os SAB mais citados na literatura são aqueles formados por polietilenoglicol, devido a gama de características que este polímero apresenta, como baixo custo e toxicidade, biodegradabilidade, elevada solubilidade em água. Os polímeros do tipo PEG ainda são utilizados em processos biotecnológicos, na medicina e como solvente e catalizador em sínteses orgânicas (COSTA, 2015).

Novos SAB obtidos com bissulfito de sódio podem agregar características interessantes com potencial aplicação em processos de separação/extração e/ou pré-concentração na área de engenharia de alimentos. Neste trabalho, dados experimentais para SAB compostos por PEG 4.000, 6.000 e 10.000 g mol⁻¹ + bissulfito de sódio + água nas temperaturas de 288,15; 298,15; 308,15 e 318,15K, foram levantados com o objetivo de estudar a influencia da temperatura e da massa molar do PEG no equilíbrio de fases.

O bissulfito de sódio é um sal muito usado na indústria de alimentos como agente conservante, que por sua vez ajuda prevenir a oxidação e preservar o sabor de alguns alimentos. Em enlatados o bissulfito de sódio é usado para retardar o escurecimento causado por oxidação e em alguns casos é usado como microbicida. Geralmente o bissulfito de sódio favorece o desprendimento de dióxido de enxofre quando adicionado em água ou produtos contendo água. O dióxido de enxofre por sua vez matará leveduras, fungos e bactérias, sendo assim este reagente é considerado como um aditivo conservante. Uma outra utilização do bissulfito é como sequestrante de oxigênio no tratamento de água para reduzir o potencial de

corrosão desta. Alguns processos físicos de conservação de alimentos como desidratação e armazenamento a baixas temperaturas, possuem algumas limitações. Alguns alimentos não podem passar por processos deste modo, pois podem alterar suas propriedades organolépticas, como sabor e odor. Sendo assim, uma boa possibilidade consiste em retirar oxigênio do médio e controlar a luminosidade, utilizando embalagens adequadas. No caso de conservantes, o bissulfito se torna uma boa alternativa, já que apresenta essas características.

2 METODOLOGIA

Nesta seção serão descritas as metodologias usadas para realização deste trabalho.

2.1 MATERIAIS

O polietilenoglicol com massa molar média de 4.000 g mol^{-1} , 6.000 g mol^{-1} e $10.000 \text{ g mol}^{-1}$ foram adquiridos da Aldrich (EUA). O reagente de grau analítico NaHSO_3 (bissulfito de sódio) foi obtido da Synth (Brasil) e água Mili-Q II (Milipore, EUA) foi usada para preparar todas as soluções aquosas.

2.2 OBTENÇÃO DAS CURVAS BINODAIS

O método turbidimétrico de acordo com a metodologia descrita em literatura específica, foi utilizado para obtenção das curvas bimodais.

Esse método do ponto de turvação para determinar as curvas é conhecido como “cloud point”. Todo procedimento foi realizado em banho termostático (TC 184 Tecnal, Brasil), sob temperatura controlada variando entre 288,15; 298,15; 308,15 e 318,15 K com precisão de $\pm 0,1\text{K}$.

2.3 MONTAGEM E ANÁLISES DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Utilizou-se 10,0000 g de diferentes sistemas aquosos bifásicos foram preparados a partir da mistura de quantidades apropriadas de soluções estoque de PEG e bissulfito de sódio em água numa balança analítica (Shimadzu, Ag 220 com uma incerteza de $\pm 0,0001 \text{ g}$) para determinar as linhas de amarração. Logo em seguida com a mistura dos componentes, os sistemas foram vigorosamente agitados e então deixados em repouso por 24 horas sob temperatura controlada 288,15; 298,15; 308,15 ou 318,15K em um banho termostático (QUMIS-BR, com uma incerteza de 0,1K). Alíquotas das fases foram coletadas, evitando-se a interface, e tiveram suas composições analisadas.

2.4 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES

Para determinar a concentração do sal usou-se alíquotas das fases para análise em fotômetro de chama de Na (Tecnal, TC 4M, USA) dos eletrólitos na faixa de 10^{-3} à $10^{-2} \%$

m/m. Através de uma curva de calibração foi feita análises de soluções de bissulfito de sódio apresentaram a mesma sódio tanto em água como em soluções diluídas de PEG (4.000, 6.000 e 10.000g mol⁻¹) 10⁻² % m/m. O desvio padrão da porcentagem mássica do sal através deste método foi de ± 0,10. O polímero foi quantificado por medidas à 298,15K utilizando um refratômetro (Analytic Jena AG Abbe 09-2001, Alemanha). A aditividade dos índices de refração dos componentes foi utilizada para determinar a concentração do polímero nas fases.

Para soluções aquosas diluídas contendo um polímero e um sal, a relação entre o índice de refração (n_D) e a fração mássica de PEG (w_1), e NaHSO₃ (w_2) é dada por

$$n_D = a_0 + a_1w_1 + a_2w_2 \quad (3)$$

Esta equação foi utilizada para analisar as fases do sistema poli(etileno glicol) + NaCl + H₂O por Chegluget (CHEGLUGET et al,1994). Os valores estimados dos coeficientes a_0 , a_1 , e a_2 para o presente trabalho é mostrado na Tabela 1. O desvio padrão das porcentagens mássicas obtidas foi na ordem de 0,05%. A concentração de água foi obtida por diferença das frações mássicas do sal e do polímero. Todas as medidas analíticas foram feitas em triplicata.

Tabela 2 – Valores estimados dos coeficientes a_0 , a_1 e a_2 para os diferentes sistemas estudados.

Sistemas	a_0	a_1	a_2
PEG 4.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + H ₂ O	1,331	1,478x10 ⁻³	1,479x10 ⁻³
PEG 6.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + H ₂ O	1,331	1,468x10 ⁻³	1,469x10 ⁻³
PEG 10.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + H ₂ O	1,331	1,458x10 ⁻³	1,459x10 ⁻³

Fonte: Do autor.

Determinadas as concentrações das fases, as linhas de amarração para os SAB estudados foram obtidas assim como o comprimento da linha de amarração (CLA) e a inclinação da linha de amarração (ILA). As equações utilizadas para determinação da CLA e da ILA foram, respectivamente,

$$CLA = [(w_1^{sup} - w_1^{inf})^2 + (w_2^{sup} - w_2^{inf})^2]^{0.5} \quad (4)$$

$$ILA = \frac{w_1^{sup} - w_1^{inf}}{w_2^{sup} - w_2^{inf}} \quad (5)$$

onde w_1^{sup} e w_2^{inf} representam a concentração (em porcentagem mássica) de PEG 4.000, 6.000 ou 10.000 g mol⁻¹ (4) e bissulfito de sódio (5) na fase superior respectivamente no

equilíbrio. Similarmente, w_1^{inf} e w_2^{inf} representam a concentração dos componentes na fase inferior.

2.5 MONITORAMENTO DO pH DAS FASES DURANTE O EQUILÍBRIO

Para obtenção dos valores de pH dos sistemas, foi utilizado PHmetro de bancada (Marca Bel - Modelo W3b com precisão de $\pm 2\text{mV}$) na temperatura de 298,15K. Para cada SAB (PEG 4.000, 6.000 e 10.000 g mol^{-1} + NaHSO_3 + H_2O) utilizou-se dois pontos globais (1 e 5) de cada sistema, e analisou-se o pH de cada fase (inferior e superior). A verificação do pH foi feita sistematicamente de 30 em 30 minutos até atingir o equilíbrio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão abordados os resultados obtidos com a realização deste trabalho.

3.1 EFEITO DA TEMPERATURA

As Tabelas 3 à 8 mostram os dados experimentais referentes aos equilíbrios líquido-líquido e das curvas binodais, todos expressos em fração molar, para os SAB estudados. Os subscritos 1, 2 e 3, nas tabelas representam os componentes, polímero, sal e água respectivamente.

Tabela 3 - Concentração dos componentes no ELL do SAB formado por PEG 4.000 g mol⁻¹ (w_1) + NaHSO₃ (w_2) + H₂O (w_3) nas temperaturas 288,15K à 318,15 K em porcentagem mássica.

LA	CLA	Pontos Globais			Fase Superior			Fase Inferior			ILA
		w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	
288.15 K											
1	27.87	17.80	20.07	62.13	36.52	10.83	52.65	11.40	22.90	65.69	-2.08
2	31.87	18.67	20.66	60.66	38.25	10.58	51.17	10.05	25.42	64.54	-1.90
3	35.29	19.95	22.01	58.03	40.04	10.29	49.67	9.28	27.58	63.14	-1.78
4	39.56	20.86	23.07	56.07	41.46	10.09	48.46	7.55	30.47	61.97	-1.66
5	43.86	21.61	23.56	54.83	44.00	10.00	46.00	6.29	32.40	61.32	-1.68
298.15 K											
1	21.92	19.08	14.95	65.97	35.52	10.63	53.85	14.40	16.50	69.09	-3.60
2	26.72	20.04	15.98	63.98	36.95	10.42	52.62	11.64	18.99	69.37	-2.96
3	30.91	21.03	17.02	61.95	38.85	10.18	50.97	10.03	21.34	68.62	-2.58
4	33.50	22.00	17.99	60.01	40.76	9.99	49.25	9.76	22.67	67.57	-2.44
5	37.45	23.08	18.99	57.93	43.27	9.69	47.04	8.90	24.57	66.54	-2.31
308.15 K											
1	18.74	17.46	15.04	67.50	30.23	10.86	58.91	12.33	16.43	71.23	-3.21
2	23.27	17.97	16.04	65.99	32.22	10.57	57.20	10.23	18.18	71.59	-2.89
3	26.90	18.50	16.97	64.53	34.14	10.32	55.53	9.17	20.31	70.52	-2.50
4	30.35	19.02	17.98	63.00	36.86	10.16	52.98	8.97	22.13	68.90	-2.33
5	34.42	19.53	19.01	61.46	39.65	10.00	50.34	8.15	23.88	67.96	-2.27
318.15 K											
1	20.98	18.00	14.00	68.00	30.12	10.03	59.84	10.01	16.00	73.99	-3.37
2	25.94	19.10	14.94	65.96	32.79	9.90	57.31	8.29	18.42	73.29	-2.87
3	29.73	19.84	16.18	63.98	34.52	9.67	55.80	7.00	20.93	72.06	-2.44
4	33.68	21.00	17.00	62.00	36.00	9.40	54.60	5.45	23.57	70.97	-2.16
5	38.01	22.00	17.96	60.04	38.00	9.17	52.83	4.00	26.17	69.83	-2.00

Fonte: Do autor.

Tabela 4 - Concentração dos componentes ao longo da curva binodal para o SAB formado por PEG 4.000 g mol⁻¹ (w_1) + NaHSO₃ (w_2) + H₂O (w_3) nas temperaturas 288,15 à 318,15 K em porcentagem mássica.

288.15K		298.15K		308.15K		318.15K	
w_1	w_2	w_1	w_2	w_1	w_2	w_1	w_2
47.34	8.70	46.59	9.55	46.11	10.10	38.62	9.17
44.46	10.05	44.24	10.32	44.46	10.05	37.02	9.42
39.80	10.41	40.17	9.93	39.98	10.17	35.73	9.39
38.57	10.36	38.74	10.13	38.74	10.13	33.25	9.58
34.74	10.75	37.41	10.31	37.41	10.31	31.09	9.75
33.54	10.90	36.18	10.48	36.32	10.27	30.18	9.72
37.10	11.05	35.02	10.64	34.19	10.39	28.27	10.07
35.88	11.38	34.06	10.59	32.30	10.50	26.59	10.37
31.72	11.43	33.03	10.74	31.37	10.64	24.50	10.59
29.78	11.99	32.06	10.87	30.49	10.77	22.01	11.20
27.97	12.65	31.15	11.00	29.67	10.90	20.50	11.47
25.30	13.05	30.28	11.13	27.52	11.08	19.13	11.84
22.97	13.64	29.47	11.24	25.00	11.48	17.57	12.22
21.25	14.56	25.51	11.54	22.43	11.89	2.26	27.40
3.55	38.01	23.27	12.00	20.39	12.10	3.01	26.06
3.83	36.43	20.21	12.56	18.57	12.60	3.69	24.84
5.22	34.36	18.69	13.08	0.92	39.54	4.30	23.73
5.76	32.88	3.13	38.26	1.33	37.83	4.87	22.71
6.59	31.35	3.43	36.65	2.10	36.04	5.39	21.78
7.03	30.11	3.70	35.18	2.43	34.61	6.18	20.81
7.14	29.11	4.32	33.63	3.46	32.93	6.60	20.03
7.82	27.91	4.89	32.21	3.71	31.73	7.00	19.30
8.18	26.92	5.41	30.90	3.93	30.62	7.37	18.63
8.77	25.89	5.58	29.85	4.47	29.44	7.71	17.99
9.57	24.83	6.04	28.72	4.97	28.34	9.29	16.57
10.07	23.95	6.47	27.68	5.13	27.45	10.21	15.87
10.54	23.13	6.86	26.71	5.57	26.50	11.83	14.64
10.97	22.36	7.23	25.80	5.71	25.72	13.29	13.90
12.00	21.41	7.84	24.85	6.10	24.88	15.28	13.05
13.64	19.79	7.90	24.17	6.22	24.19		
15.15	18.80	9.21	21.90	8.36	21.68		
16.99	17.74	10.29	20.03	10.29	18.35		
18.78	16.75	11.41	18.79	12.75	16.54		
		12.68	17.24	14.56	14.83		
		14.35	15.75				
		15.76	14.51				

Fonte: Do autor.

Tabela 5 - Concentração dos componentes no ELL do SAB formado por PEG 6.000 g mol⁻¹ (w_1) + NaHSO₃ (w_2) + H₂O (w_3) nas temperaturas 288,15 à 318,15 K em percentagem mássica.

LA	CLA	Pontos Globais			Fase Superior			Fase Inferior			K
		w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	
288.15 K											
1	26.82	15.41	11.45	73.14	31.62	5.27	63.11	6.45	14.52	79.03	2.75
2	31.04	17.77	11.97	70.26	34.73	5.02	60.25	5.90	16.51	77.59	3.28
3	35.98	19.60	12.22	68.18	37.74	4.71	57.55	4.36	18.14	77.50	3.85
4	40.82	20.74	12.72	66.54	40.97	4.01	55.02	3.43	20.04	76.53	5.84
5	43.87	22.52	13.03	64.45	43.67	3.78	52.55	3.36	21.10	75.54	6.27
298.15 K											
1	33.22	12.34	12.39	75.27	32.66	3.15	64.19	2.73	17.04	81.93	5.40
2	34.46	13.02	14.37	72.61	33.83	2.82	63.35	2.65	18.34	80.97	6.50
3	37.15	13.02	15.97	71.01	36.05	2.56	61.39	2.42	19.23	80.73	7.51
4	40.70	13.54	16.80	69.66	39.07	2.15	58.78	2.12	20.34	80.11	9.46
5	44.90	13.82	19.94	66.24	42.67	1.98	55.35	2.02	22.34	79.84	11.28
308.15 K											
1	22.07	12.03	9.35	78.62	25.17	4.99	69.84	4.74	13.34	81.92	2.67
2	25.21	13.11	10.02	76.87	27.19	3.98	68.83	4.15	14.21	81.64	3.57
3	29.39	14.23	10.57	75.20	30.72	3.63	65.65	3.72	15.23	81.05	4.19
4	33.11	15.23	11.47	73.30	33.65	3.33	63.02	3.06	16.01	80.93	4.80
5	35.37	16.02	12.02	71.96	35.24	3.13	61.63	2.72	17.04	80.24	5.44
318.15 K											
1	27.15	15.44	7.30	77.26	27.46	2.54	69.99	2.45	13.11	84.44	5.16
2	30.37	16.23	8.23	75.54	29.90	2.38	67.72	1.97	14.32	83.71	6.01
3	33.57	17.89	8.74	73.37	32.42	2.07	65.51	1.88	16.01	82.11	7.73
4	38.79	18.44	9.07	72.49	36.78	1.68	61.54	1.45	17.68	80.87	10.52
5	43.74	21.24	9.89	68.87	41.71	1.69	56.61	1.22	18.23	80.55	10.78

Fonte: Do autor.

Tabela 6 - Concentração dos componentes ao longo da curva binodal para o SAB formado por PEG 6.000
 $\text{g mol}^{-1} (w_1) + \text{NaHSO}_3 (w_2) + \text{H}_2\text{O} (w_3)$ nas temperaturas 288,15 à 318,15K em porcentagem mássica.

288,15K		298,15K		308,15K		318,15K	
$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$
64,25	1,58	66,05	1,62	64,73	1,36	68,02	0,72
51,02	2,31	53,04	1,74	55,39	1,62	61,68	0,79
47,87	2,75	50,15	1,92	50,12	1,89	56,45	0,83
45,34	2,98	47,77	2,01	47,85	2,11	51,77	0,91
42,34	3,33	45,16	2,28	45,28	2,28	48,78	0,98
40,34	3,81	43,54	2,57	41,29	2,65	42,91	1,13
37,99	4,06	39,65	2,66	38,89	3,17	40,16	1,31
35,29	4,77	35,89	2,89	36,01	3,7	38,78	1,35
33,77	5,02	33,18	3,18	34,24	3,88	36,52	1,5
32,78	5,21	31,76	3,44	32,65	4,05	34,31	1,73
30,53	5,51	29,19	3,77	30,63	4,23	30,76	1,94
29,09	6,11	28,25	4,39	26,41	4,46	27,62	2,15
27,74	6,38	25,32	4,54	24,85	4,6	25,68	2,59
26,78	6,56	22,14	5,01	22,11	4,65	24,05	3,2
22,19	7,04	18,88	5,36	19,78	4,73	20,61	3,42
19,47	8,37	16,64	6,73	16,86	4,99	17,12	4,22
18,92	9,45	15,28	7,45	13,78	6,55	12,04	5,35
16,42	9,89	14,04	8,39	12,73	7,83	11,45	6,39
14,35	10,34	13,25	9,12	10,45	8,43	10,03	7,23
13,95	11,87	9,34	10,64	9,54	10,23	8,78	8,27
12,34	12,45	8,74	11,37	8,45	11,87	7,23	9,24
11,67	13,88	7,32	12,45	7,23	12,73	6,44	10,35
10,78	14,72	7,02	13,83	6,34	13,78	4,74	12,73
8,83	15,87	6,45	14,37	5,12	14,54	4,01	13,89
7,45	17,89	5,73	16,77	4,22	15,37	3,64	14,27
6,45	18,67	5,34	17,92	3,02	16,39	2,02	15,33
5,73	19,33	5,02	18,24	2,12	17,34	1,78	16,78
4,49	20,54	5,75	19,33	1,85	18,66	1,02	17,22
4,02	22,56	4,42	21,34	1,75	19,12	0,98	18,39
3,73	24,78	4,02	23,65	1,45	20,13	0,75	19,45

Fonte: Do Autor.

Tabela 7 - Concentração dos componentes no ELL do SAB formado por PEG 10.000 g mol⁻¹ (w₁) + NaHSO₃ (w₂) + H₂O (w₃) nas temperaturas 288,15 à 318,15K em porcentagem mássica.

LA	CLA	Pontos Globais			Fase Superior			Fase Inferior			K
		w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	
288.15 K											
1	30.84	12.72	10.70	76.58	33.27	3.89	62.84	5.05	16.34	78.61	4.20
2	33.62	13.05	11.45	75.50	35.65	3.75	60.60	4.90	17.34	77.76	4.62
3	37.09	13.55	11.97	74.48	38.43	3.55	58.02	4.36	18.22	77.42	5.13
4	41.59	13.76	12.22	74.02	41.54	3.22	55.24	3.43	19.87	76.70	6.16
5	45.69	14.01	12.72	73.27	45.22	3.05	51.73	3.36	21.35	75.29	7.00
298.15 K											
1	31.17	12.39	11.02	76.59	32.66	2.73	64.61	3.73	14.33	81.93	5.25
2	32.74	12.88	11.54	75.58	33.83	2.65	63.52	3.66	15.37	80.97	5.80
3	35.53	13.07	11.82	75.11	36.05	2.42	61.53	3.23	16.04	80.73	6.62
4	38.95	14.28	12.35	73.37	39.07	2.12	58.81	3.02	16.87	80.11	7.95
5	42.89	14.54	13.01	72.45	42.67	2.02	55.31	2.67	17.49	79.84	8.65
308.15 K											
1	27.74	12.03	9.05	78.92	29.56	2.65	67.79	3.57	12.35	84.08	4.66
2	29.73	12.51	10.02	77.47	31.22	2.34	66.44	3.45	12.95	83.60	5.53
3	32.75	13.03	10.57	76.40	33.72	2.21	64.07	3.12	13.89	82.99	6.28
4	37.58	13.43	11.07	75.50	38.58	2.01	59.41	3.05	14.33	82.62	7.12
5	40.81	14.02	11.52	74.46	41.22	1.94	56.84	2.55	14.97	82.48	7.71
318.15 K											
1	26.88	9.05	9.03	81.92	27.46	2.33	70.21	2.03	11.24	86.73	4.82
2	29.48	9.34	9.58	81.08	29.90	2.16	67.94	1.94	11.73	86.33	5.43
3	32.42	9.89	9.89	80.22	32.42	2.01	65.57	1.67	12.34	85.99	6.13
4	37.16	10.12	10.14	79.74	36.78	1.65	61.57	1.32	12.78	85.90	7.74
5	42.35	11.05	10.72	78.23	41.71	1.22	57.07	1.06	13.56	85.38	11.11

Fonte: Do Autor.

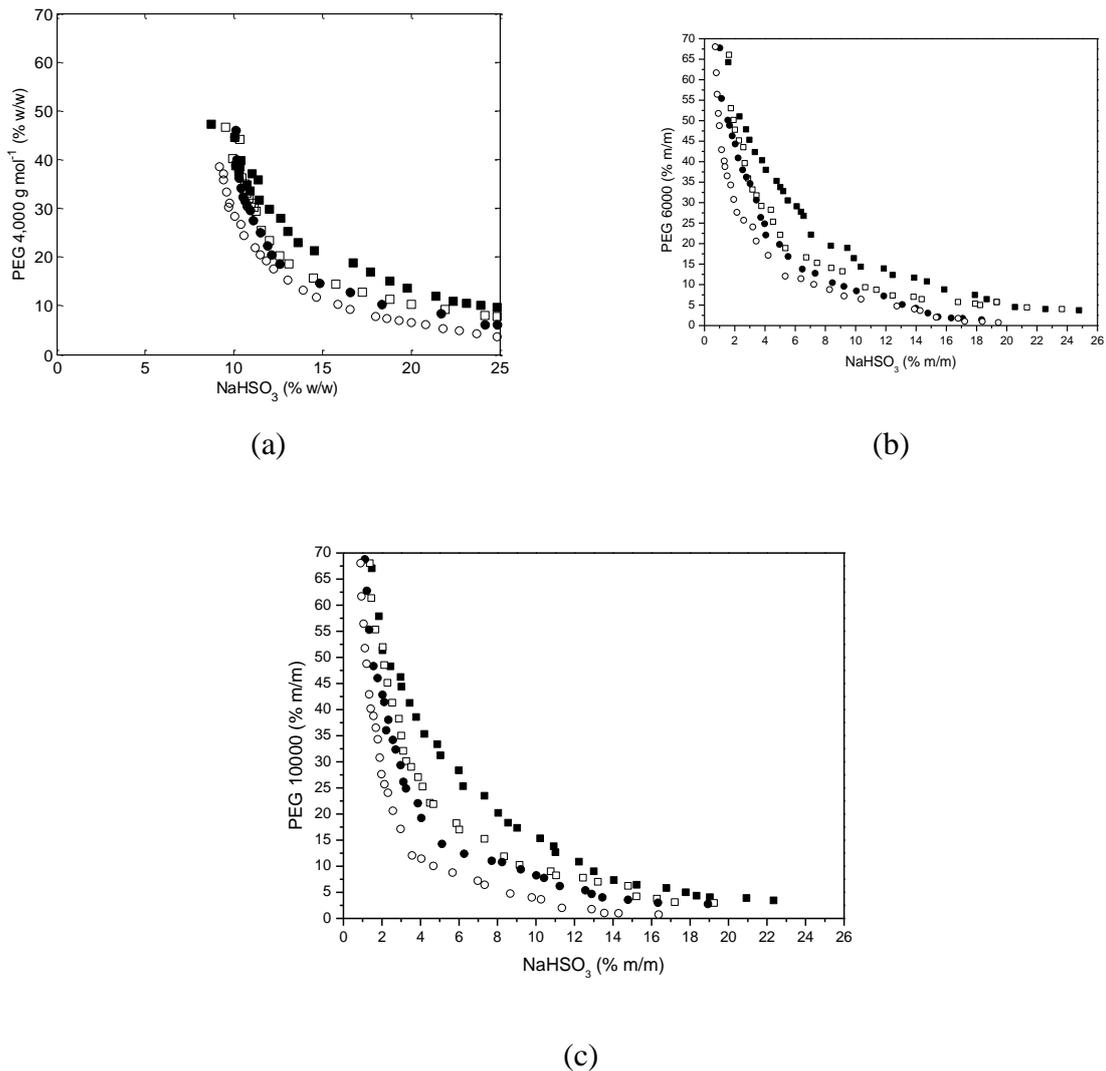
Tabela 8 - Concentração dos componentes ao longo da curva binodal para o SAB formado por PEG $10.000 \text{ g mol}^{-1}$ (w_1) + NaHSO_3 (w_2) + H_2O (w_3) nas temperaturas 288,15 à 318,15 K em porcentagem mássica.

288,15K		298,15K		308,15K		318,15K	
$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$	$100w_1$	$100w_2$
67,03	1,48	68,04	1,37	68,78	1,12	68,02	0,89
57,87	1,85	61,34	1,45	62,73	1,22	61,68	0,94
51,34	2,03	55,34	1,67	55,27	1,34	56,45	1,05
48,26	2,45	51,97	2,05	48,33	1,57	51,77	1,12
46,23	2,98	48,54	2,12	46,02	1,78	48,78	1,21
44,37	3,02	45,12	2,29	42,84	2,03	42,91	1,34
41,27	3,44	41,33	2,54	41,42	2,12	40,16	1,42
38,56	3,78	38,23	2,89	38,03	2,34	38,78	1,57
35,34	4,21	35,02	3,01	36,02	2,23	36,52	1,69
33,36	4,88	32,11	3,11	34,18	2,57	34,31	1,79
31,24	5,04	30,12	3,27	32,34	2,72	30,76	1,89
28,37	5,99	29,01	3,52	29,33	2,98	27,62	1,98
25,33	6,22	27,03	3,88	26,15	3,12	25,68	2,14
23,49	7,32	25,23	4,11	24,89	3,25	24,05	2,32
20,22	8,04	22,14	4,49	22,03	3,87	20,61	2,57
18,34	8,55	21,89	4,67	19,22	4,05	17,12	2,98
17,33	9,02	18,23	5,87	14,28	5,12	12,04	3,57
15,34	10,22	17,02	6,02	12,39	6,27	11,45	4,05
13,83	10,92	15,23	7,32	11,03	7,71	10,03	4,67
12,67	11,02	11,9	8,34	10,79	8,24	8,78	5,67
10,87	12,23	10,24	9,15	9,39	9,21	7,23	6,98
9,02	13,01	9,03	10,77	8,25	10,02	6,44	7,34
7,34	14,05	8,23	11,05	7,74	10,42	4,74	8,67
6,45	15,23	7,78	12,45	6,2	11,24	4,01	9,78
5,84	16,77	7,01	13,22	5,37	12,57	3,64	10,27
5,01	17,78	6,22	14,78	4,67	12,89	2,02	11,35
4,34	18,34	4,23	15,22	4,03	13,45	1,78	12,89
4,07	19,03	3,78	16,28	3,55	14,78	1,02	13,55
3,89	20,93	3,11	17,21	3,01	16,34	0,98	14,29
3,45	22,34	2,95	19,25	2,76	18,93	0,75	16,37

Fonte: Do Autor.

A Figura 2 apresenta comparações entre as curvas binodais obtidas experimentais nas diversas temperaturas estudadas para os sistemas (a) PEG 4.000 g mol⁻¹ e (b) PEG 6.000 g mol⁻¹ (c) PEG 10.000 + bissulfito de sódio + água.

Figura 2 - Comparação entre as curvas binodais experimentais



Fonte: Do autor.

Nota: (a) PEG 4000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O nas temperaturas de (■) 288,15K; (□) 298,15K; (●) 308,15 e (○) 318,15K, (b) PEG 6000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O nas temperaturas de de (■) 288,15K; (□) 298,15K; (●) 308,15 e (○) 318,15K. (c) PEG 10000 g mol⁻¹ + Na₂HSO₃ + H₂O nas temperaturas de (■) 288,15K; (□) 298,15K; (●) 308,15 e (○) 318,15K.

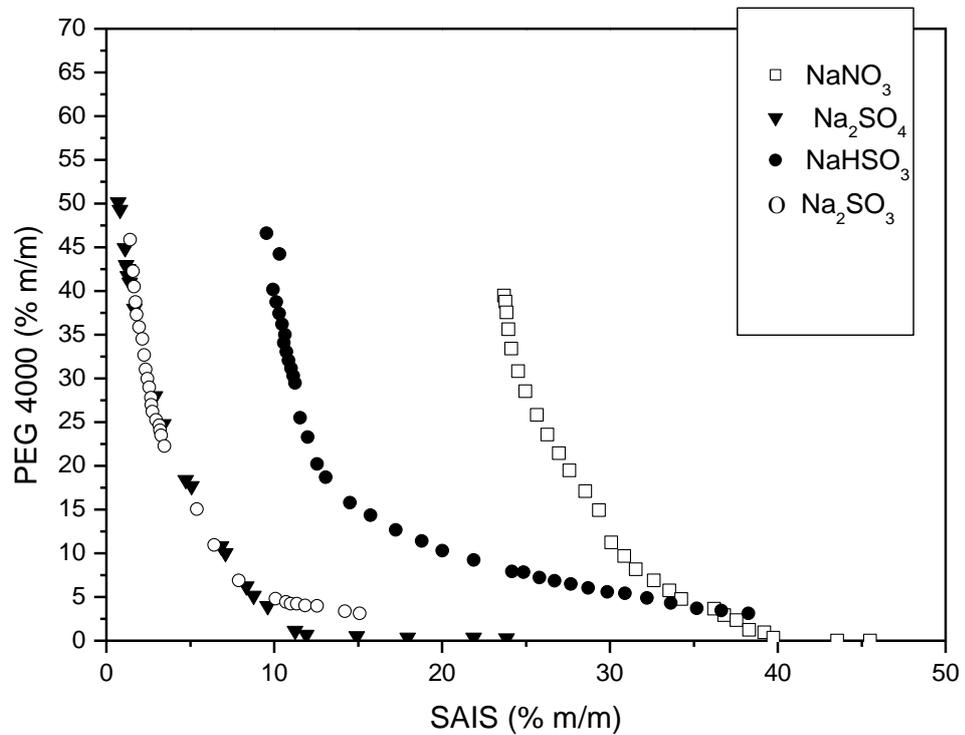
A Figura 2 (a), (b) e (c) mostram o comportamento dos sistemas com PEG 4.000 g mol⁻¹ + bissulfito de sódio + água e PEG 6.000 g mol⁻¹ + bissulfito de sódio + água e PEG 10.000 g mol⁻¹ + bissulfito de sódio respectivamente. Pode-se observar na figura uma redução

da área bifásica com o decréscimo da temperatura indicando que o processo de separação de fases é endotérmico em ambos os casos. Este comportamento está de acordo com os resultados relatados para outros sistemas aquosos bifásicos formados por outros sais relatados na literatura (sulfito de sódio, tartarato de sódio, citrato de sódio). O efeito da temperatura sobre os sistemas aquosos bifásicos é amplamente estudado; fatores importantes como: massa molar, tipo de ânion conjugado com a temperatura modifica a região bifásica.

É possível determinar em trabalhos com outros sais como (sulfatos, citratos, tartaratos) e polímeros com mesa massa molar uma singularidade que se refere a um aumento da região bifásica com o aumento da temperatura. De maneira direta, verifica-se também que em baixas temperaturas, em sua maioria abaixo de 15°C, é difícil haver formação de SAB, e em alguns casos não há formação de SAB. Uma explicação relevante para esse fenômeno observado é a diminuição da hidrofobicidade das moléculas, pois a redução da temperatura irá causar um aumento de atração entre o PEG e as moléculas de água resultando em uma mistura com dificuldade em segregar fases.

Atualmente, já está descrita uma série de ânions para indução de separação de fases nos SAB, na qual é conhecida como “série de Hofmeister”, sendo que os ânions kosmotropicos são os melhores segregadores de fases numa determinada temperatura. No caso do bissulfito, este ânion se assemelha muito com o sulfito. Na figura 4 é possível confirmar esta série através das binodais comparativas entre diferentes ânions de misturas compostas por PEG 4.000 na temperatura de 298,15K. Nota-se claramente que a área bifásica para os sistemas formados por íons sulfatos é bem maior que a dos outros dois ânions. Este resultado é compatível esta série para ânions, onde o ânion sulfato é conhecido por seu maior efeito kosmotrópico, sendo, portanto, um melhor indutor da segregação de fases em SAB (ALVES, 2004).

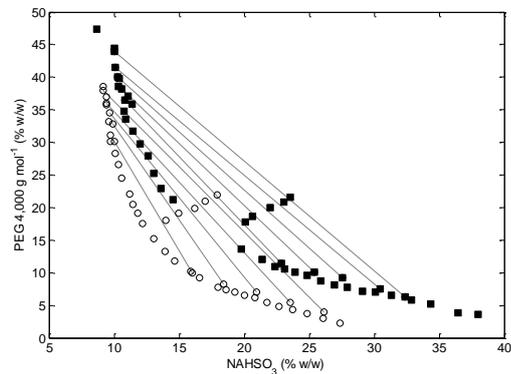
Figura-3: Comparação entre as curvas binodais experimentais na temperatura de 298,15K contendo PEG 4.000 g mol⁻¹ com sais de sódio com diferentes ânions + H₂O (▼) Na₂SO₄; (○) Na₂SO₃; (●) NaHSO₃ (presente trabalho); e (■) NaNO₃.



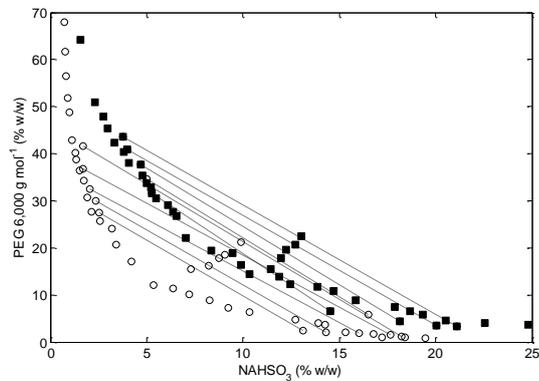
Fonte : Adaptado de (LEMOS, 2011; YAGUCI, 2012; ZAFARANI-MOATTAR, 2010)

Pelas análises do comportamento do parâmetro inclinação da linha de amarração (ILA) pode ser avaliado o efeito da temperatura no equilíbrio de fases. Este parâmetro é definido como a relação entre a variação das concentrações de polímero e sal em cada uma das fases do sistema e desta forma pode avaliar a quantidade de sal necessária para a segregação de fases.

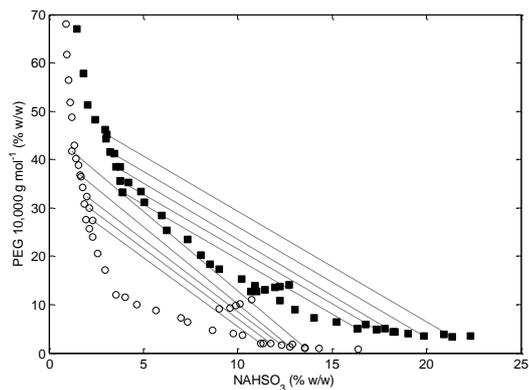
Figura 4- Linhas de amarração experimentais para os sistemas.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Do autor.

Nota: (a) PEG 4000 g mol^{-1} + NaHSO_3 + H_2O

(b) PEG 6000 g mol^{-1} + NaHSO_3 + H_2O

(c) PEG 10000 g mol^{-1} + NaHSO_3 + H_2O nas temperaturas (○) 318,15 K e (●) 288,15 K.

Pela Tabela 9 é possível determinar que os valores da ILA para o SAB formados por PEG 4.000 g mol^{-1} + bissulfito de sódio + água nas diferentes temperaturas. De acordo com os resultados observa-se que uma elevação da temperatura promove um aumento da ILA (Figura

2 a). Isto pode ser explicado pelo aumento de hidrofobicidade das moléculas de PEG com a elevação da temperatura promovendo maior interação entre as macromoléculas. Em outras palavras, o aumento da temperatura irá causar uma redução de atração entre o PEG e as moléculas de água, o que resulta em um aumento da concentração deste polímero na fase superior e uma diminuição da concentração de sal na fase inferior, implicando no aumento da ILA. Um aumento da CLA também foi observado em cada temperatura estudada com o aumento da composição local. Resultados similares a estes são relatados na literatura e são esperados devido ao aumento da diferença entre as propriedades físico químicas das fases com o aumento da concentração dos componentes.

A Tabela 9 apresenta os valores ILA para o sistema PEG 4.000 g mol⁻¹+ sulfito de sódio + água (Figura 2b), e o comportamento é semelhante ao relatado para o sistema formado pro PEG 6000 g mol⁻¹ e 10000 g mol⁻¹

Tabela 9 - Valores da ILA obtidos experimentalmente para o SAB formado por PEG 4.000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O.

LA	T (K)			
	288,15	298,15	308,15	318,15
1	-2.08	-3.60	-3.21	-3.37
2	-1.90	-2.96	-2.89	-2.87
3	-1.78	-2.58	-2.50	-2.44
4	-1.66	-2.44	-2.33	-2.16
5	-1.68	-2.31	-2.27	-2.00

Fonte: Do Autor.

Tabela 10 - Valores da ILA obtidos experimentalmente para o SAB formado por PEG 10.000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O.

LA	T (K)			
	288,15	298,15	308,15	318,15
1	-2.72	-2.15	-2.45	-2.37
2	-2.51	-2.01	-2.25	-2.34
3	-2.49	-2.02	-2.33	-2.21
4	-2.34	-2.03	-2.41	-2.21
5	-2.33	-2.00	-2.34	-2.45

Fonte: Do Autor.

Tabela 11 - Valores da ILA obtidos experimentalmente para o SAB formado por PEG 10.000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O.

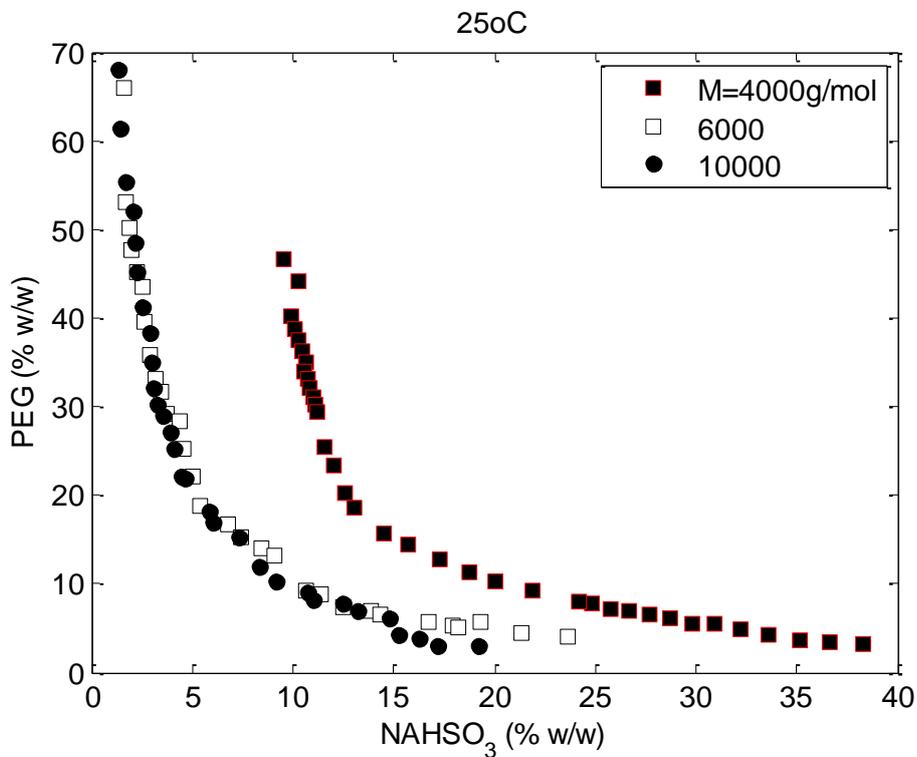
LA	T (K)			
	288,15	298,15	308,15	318,15
1	-2.27	-2.49	-2.68	-2.92
2	-2.26	-2.37	-2.62	-2.99
3	-2.32	-2.41	-2.62	-2.99
4	-2.29	-2.44	-2.89	-3.19
5	-2.29	-2.59	-2.97	-3.42

Fonte: Do Autor.

3.2 EFEITO DA MASSA MOLAR DO PEG

As curvas binodais para os SAB formados por bissulfito de sódio e PEG com diferentes massas molares são mostrados na Figura 5.

Figura 5 – Diagramas de fases para os SAB formados por: (■) PEG 4.000, (□) PEG 6.000 e (●) PEG 10.000 g mol⁻¹ a 298,15 K.



Fonte: Do autor.

Pode-se observar nesta figura que a curva binodal para os SAB formados por PEG de maior massa molar + bissulfito de sódio + água à 298,15K esta mais próximo da origem. Este comportamento já foi relatado na literatura para outros SAB formados por PEG .

A diferença entre as binodais do PEG 6.000 e PEG 10.000 são poucas, mas já no PEG 4.000 ela se torna um pouco mais nítida, um fator importante que deve ser levado em consideração é seu caráter hidrofóbico, esse caráter está sendo aumentado quando aumenta a massa molar do polímero, isso causa uma maior incompatibilidade entre seus componentes, sendo assim, é necessário uma menor concentração de PEG para segregação de fases. Quando eleva-se a massa molar de um polímero, aumenta seu caráter hidrofóbico.

Nesse trabalho pode ser observado, por meio comparativo, que para sistemas com sulfito de sódio a segregação com PEG entre massa com intervalo de $2.000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ é melhor enquanto que para o bissulfito as segregações acima de um intervalo massa molar 2.000 g/mol se torna melhor, como por exemplo PEG 4.000 e PEG 10.000 (ALVARENGA, 2014).

Outro fator importante que foi observado é o aumento da inclinação das linhas de amarração, mostrando então que a quantidade de sal necessária para separar as fases também é reduzida quando PEG possui massas molares maiores.

3.3 MONITORAMENTO DO pH DAS FASES

Foi verificado o pH de 30 em 30 minutos, até atingir um valor constante em aproximadamente 6h, como mostra a tabela 11. Verificou-se o pH das fases após 30h, 54h e 78h, sendo que nas últimas análises constatou-se um equilíbrio em seu valor.

Tabela 12- Análises do pH dos SAB formados por PEG 4.000, 6.000 e 10000 g mol⁻¹ + NaHSO₃ + H₂O na temperatura de 298,15K ao longo de 72 horas. (FS: fase superior, FI: fase inferior).

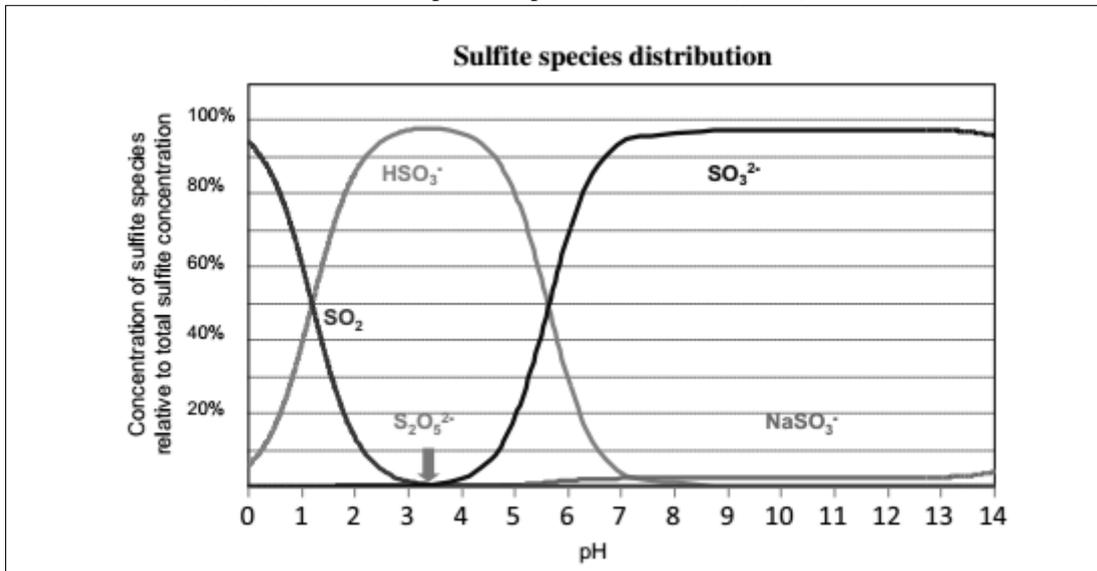
Tempo (h)	Fase	pH (PEG 4.000)		pH (PEG 6.000)		pH (PEG 10.000)	
		1ª CLA	5ª CLA	1ª CLA	5ª CLA	1ª CLA	5ª CLA
0.5	S	4.75	4.64	4.87	4.79	4.85	4.89
	I	4.25	4.12	4.34	4.25	4.55	4.68
1.0	S	4.82	4.79	4.88	4.87	4.88	4.95
	I	4.10	4.02	4.15	4.17	4.34	4.64
1.5	S	4.86	4.84	4.90	4.98	4.97	4.98
	I	4.03	3.89	4.10	4.15	4.17	4.44
2.0	S	4.86	4.88	4.90	4.90	4.96	5.02
	I	4.00	3.89	4.06	4.05	4.12	4.15
2.5	S	5.00	4.90	4.90	4.80	4.96	5.03
	I	4.00	3.89	4.06	4.03	4.11	4.14
3.0	S	4.90	4.90	4.95	4.80	4.98	5.03
	I	4.00	3.89	4.04	4.00	4.08	4.13
4.0	S	4.98	4.90	4.95	4.85	4.99	5.03
	I	3.98	3.89	4.02	3.97	4.05	4.10
5.0	S	4.98	4.90	4.95	4.85	4.99	5.03
	I	3.98	3.89	4.01	3.97	4.05	4.07
6.0	S	4.98	4.90	4.95	4.95	4.99	5.04
	I	3.98	3.89	3.99	3.97	4.03	4.06
30	S	4.98	4.89	4.95	4.70	4.99	5.04
	I	3.91	3.89	3.99	3.95	4.03	4.06
54	S	4.99	4.98	4.95	4.96	5.01	5.04
	I	3.90	3.89	3.98	3.95	4.03	4.06
78	S	4.99	4.98	4.95	4.96	5.01	5.04
	I	3.90	3.89	3.98	3.95	4.03	4.06

Fonte: Do Autor.

Uma preocupação nas manipulações de reagentes que contém SO₃ é a sua decomposição. Esse efeito se dá pela oxidação do radical sulfito SO₃, para sulfato SO₄.^{44,45} Sendo assim, é relevante levantar dados de pH em um controle cinético para verificar se não há modificação na matéria prima no qual se constitui esse tipo de sistema. Estudos demonstram⁴⁵ que há uma faixa de pH para o (bissulfito) HSO₃, nos quais esses valores variam na temperatura ambiente, entre 2 e 5, dependendo de suas concentrações.

A figura 6, mostra relação dessas substâncias em função na decomposição em água do radical SO₂ e sua alteração de pH.

Figura - 6 : Distribuição das espécies de sulfito em função de seu pH. Abaixo de pH 1 o dióxido de enxofre (SO_2) domina, entre pH 1,5 e pH 6 de bissulfito (HSO_3^-).



Fonte: Adaptado de (MULLER, 2013)

As medições de pH nas fases superior e inferior para a primeira e quinta linhas de amarração dos SAB estudados, a cada temperatura, foram conduzidos a fim de verificar a estabilidade da espécie HSO_3^- durante 78 horas. Os valores de pH ficaram entre 4,70-5,04 para as fases superiores 3,89-4,68 para as fases inferiores. É conhecido o fato de que as espécies de sulfito podem existir em diferentes formas, em solução aquosa em função do pH. Os resultados obtidos estão dentro da gama de pH de 1,5-6,0 a qual está tipicamente relacionada com a prevalência de isômeros bissulfito (HSO_3^- e SO_3H^-) (MULLER, 2013). Num trabalho recente publicado pelo nosso grupo que envolve a fase de equilíbrio de SAB formado por PEG + Na_2SO_3 + água, foi observada para todas as fases analisadas, que há valores de pH alcalino típico para a predominância esperada do sulfito de espécies (SO_3^{2-}) no meio. Estes estudos podem ser vistos como complementares, uma vez que torna possível para um interesse específico em purificação / extração de uma substância qualquer, optar por usar SAB contendo alcalina ou fases ácidas (HSO_3^-), uma vez que a capacidade desses ânions para formar SAB é muito semelhante. Na análise da composição das fases superior e inferior realizados após as medições de pH, verificou-se que, logo que as primeiras 3 horas de equilíbrio as composições já foram alcançados no âmbito do intervalo de erro considerado (<2%), mas ainda apresentava alguma turbidez fases. De qualquer forma, para os estudos de equilíbrio dos vários SAB citadas neste trabalho, foram decididas de esperar um tempo mais longo do que cerca de 2 horas (24 a 72 horas) para se obter fases límpidas e para garantir a condição de equilíbrio termodinâmico.

Tabela 13 - Valores das composições de das fases superiores (S) e inferiores (I) dos SAB formados por PEG 4.000, 6.000 e 10.000g mol⁻¹ + NaHSO₃ + água em T = 298,15K até 78 h. Composições de misturas monitoradas da 1ª e 5ª linha de amarração.

		PEG 4.000				PEG 6.000				PEG 10.000			
		1 L.A.		5 L.A.		1 L.A.		5 L.A.		1 L.A.		5 L.A.	
% (w/w)		PEG	SAL	PEG	SAL	PEG	SAL	PEG	SAL	PEG	SALT	PEG	SAL
0.5h	T.P.	31.79	2.95	37.44	2.44	33.78	3.78	43.23	3.28	34.23	2.95	42.98	3.08
	B.P	5.03	10.55	3.12	15.88	1.98	16.03	1.98	21.22	2.93	10.55	2.05	16.03
1h	T.P.	31.69	2.93	37.08	2.23	33.55	3.67	43.02	3.17	34.01	2.93	42.97	2.87
	B.P	5.13	10.75	3.23	15.92	2.05	16.34	1.98	21.82	3.01	10.75	2.45	16.34
1.5h	T.P.	31.22	2.85	36.99	2.1	33.52	3.55	42.78	2.98	33.65	2.85	42.9	2.67
	B.P	5.22	10.85	3.35	15.95	2.23	16.22	2.34	21.97	3.05	10.85	2.47	16.22
2h	T.P.	31.2	2.83	37.54	2.05	33.57	3.43	42.55	2.95	33.64	2.83	42.87	2.55
	B.P	5.32	10.99	3.54	15.98	2.39	16.32	2.34	21.97	3.12	10.99	2.48	16.12
2.5h	T.P.	31.2	2.75	37.54	2.01	33.6	3.22	42.54	2.95	33.23	2.75	42.56	2.43
	B.P	5.49	11.08	3.54	16.03	2.44	16.34	2.34	22.12	3.48	11.08	2.56	16.34
3h	T.P.	31.2	2.68	37.54	1.98	33.61	3.17	42.54	2.9	33.23	2.68	42.34	2.43
	B.P	5.6	11.24	3.55	16.12	2.54	16.45	2.35	22.14	3.556	11.24	2.66	16.45
4h	T.P.	31.2	2.65	37.54	1.92	32.62	3.17	42.54	2.9	33.05	2.65	42.34	2.43
	B.P	5.6	11.78	3.54	16.25	2.54	16.99	2.35	22.14	3.78	11.78	2.75	16.99
5h	T.P.	31.2	2.66	37.54	1.85	32.62	3.18	42.54	2.9	33.05	2.66	42.34	2.43
	B.P	5.6	11.94	3.54	16.25	2.54	17.09	2.35	22.14	3.78	11.94	2.75	17.09
6h	T.P.	31.18	2.65	37.54	1.81	32.6	3.18	42.54	2.9	33.06	2.65	42.34	2.43
	B.P	5.6	11.94	3.53	16.25	2.54	17.09	2.35	22.14	3.79	11.94	2.75	17.09
30h	T.P.	31.18	2.65	37.54	1.81	32.66	3.13	42.54	2.9	33.05	2.65	42.34	2.43
	B.P	5.6	11.92	3.53	16.25	2.54	17.09	2.35	22.14	3.78	11.92	2.75	17.09
54h	T.P.	31.18	2.65	37.54	1.81	32.66	3.13	42.54	2.9	33.05	2.65	42.34	2.43
	B.P	5.66	11.92	3.53	16.25	2.54	17.09	2.35	22.14	3.78	11.92	2.75	17.09
78h	T.P.	31.15	2.66	37.52	1.81	32.66	3.12	42.54	2.90	33.05	2.66	42.3	2.43
	B.P	5.66	11.92	3.53	16.24	2.54	17.05	2.35	22.14	3.78	11.92	2.75	17.05

Fonte: Do Autor.

3.4 AJUSTES DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO

Os dados experimentais de quase equilíbrio apresentados nas tabelas 2 a 4 foram ajustados teoricamente através das equações empíricas de Othmer-Tobias (6) e de Brancroft (7) de forma a avaliar a consistência dos dados experimentais obtidos

$$\ln\left(\frac{1-w_1^t}{w_1^b}\right) = \ln k_1 + n \ln\left(\frac{1-w_2^t}{w_2^b}\right) \quad (6)$$

$$\ln\left(\frac{w_3^b}{w_2^b}\right) = \ln k_2 + r \ln\left(\frac{w_3^t}{w_1^t}\right), \quad (7)$$

onde k_1 , n , k_2 e r são parâmetros de ajuste. Esta consistência refere-se à presença de erros aleatórios significativos no preparo ATPS e/ou análise da composição das fases. Esse tipo de procedimento tem sido frequentemente utilizado em outros trabalhos envolvendo ATPS .

De forma geral, a linearidade (R^2 próximo de 1) das correlações propostas, por exemplo entre $\ln\left(\frac{1-w_1^t}{w_1^b}\right)$ e $\ln\left(\frac{1-w_2^t}{w_2^b}\right)$ para equação (6), indica o grau de consistência dos dados experimentais, ou seja se existe a presença de erros aleatórios significativos. Contudo para erros sistemáticos, como por exemplo de calibração da balança, os coeficientes de correlação linear (R^2) são pouco sensíveis nas fases (BIEHOU,2005), de forma que é importante conferir a devida calibração dos instrumentos de medidas usados no estudo de equilíbrio de fases.

A tabela 13 são apresentados os parâmetros ajustados (k_1 , n , k_2 , r) das equações (6) e (7) para três sistemas aquosos bifásicos em quatro diferentes temperaturas. O coeficiente de correlação (R^2) para cada ajuste também é apresentando na tabela 13. Os valores obtidos para R^2 foram superiores a 0,90 em todos os ajustes e são consideradas suficientes para afirmar que os dados são consistentes experimentalmente (RENON, 1968). Com base nestes modelos ajustados é teoricamente possível prever novas linhas de ligação para as regiões do diagrama que não foi estudada experimentalmente.

Tabela 14. Parâmetros de ajustes de Othmer-Tobias e Bancroft para os SAB formados por PEG (4.000, 6.000 e 10.000) g mol^{-1} + NaHSO_3 + água nas temperaturas de 288,15 a 318,15K.

T	Othmer-Tobias			Bancroft		
	N	k_1	R^2	r	k_2	R^2
PEG 4.000 g mol^{-1} + NaHSO_3 + água						
288.15	0.6209	0.8239	0.9784	1.3317	1.7275	0.9695
298.15	0.6417	0.6588	0.9500	1.2752	2.3671	0.9627
308.15	0.8722	0.5671	0.9826	0.9990	2.1976	0.9855
318.15	0.5457	0.9258	0.9909	1.5896	1.5854	0.9891
PEG 6.000 g mol^{-1} + NaHSO_3 + água						
288.15	1.1221	0.3007	0.9920	0.8273	3.0257	0.9924
298.15	1.3441	0.2533	0.9758	0.7282	2.8004	0.9723
308.15	1.7670	0.1093	0.9849	0.5294	3.3557	0.9818
318.15	1.4730	0.1685	0.9261	0.6151	3.4939	0.9203
PEG 10.000 g mol^{-1} + NaHSO_3 + água						
288.15	1.5151	0.1682	0.9959	0.6184	3.2502	0.9961
298.15	1.7977	0.0871	0.9247	0.4933	3.9408	0.9150
308.15	2.3409	0.0251	0.9391	0.3845	4.8387	0.9344
318.15	3.0058	0.0054	0.9829	0.3147	5.6857	0.9811

Fonte: Do Autor

3.5 AJUSTE DAS BINODAIS

Os dados experimentais das curvas binodais para os ATPS formados por PEG 4.000, 6.000 e 10.000 g mol⁻¹ + bissulfito de sódio + água foram ajustados pela equação empírica (8) proposta por Merchuk (MERCHUCK, 1998):

$$w_1 = a \exp(bw_2^{0.5} - cw_2^3) \quad (8)$$

onde a, b e c são parâmetros de ajuste, w_1 e w_2 são as frações mássicas de polímero e sal, respectivamente. Os parâmetros para estas equações foram determinados pelo método de otimização de Nelder-Neard (método simplex)⁴⁷, utilizando a função objetivo “E” dada por :

$$E = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|w_i^{exp} - w_i|}{w_i^{exp}} \quad (9)$$

onde w_i^{exp} representa as frações mássicas do componente 1 para linha de amarração i obtidas experimentalmente. Para comparação da qualidade dos ajustes encontrados pela equação (9) como outros trabalhos da literatura usamos como referência um erro médio definido por

$$e = \sqrt{\sum \frac{(w_1^{exp} - w_1)^2}{n}} \quad (10)$$

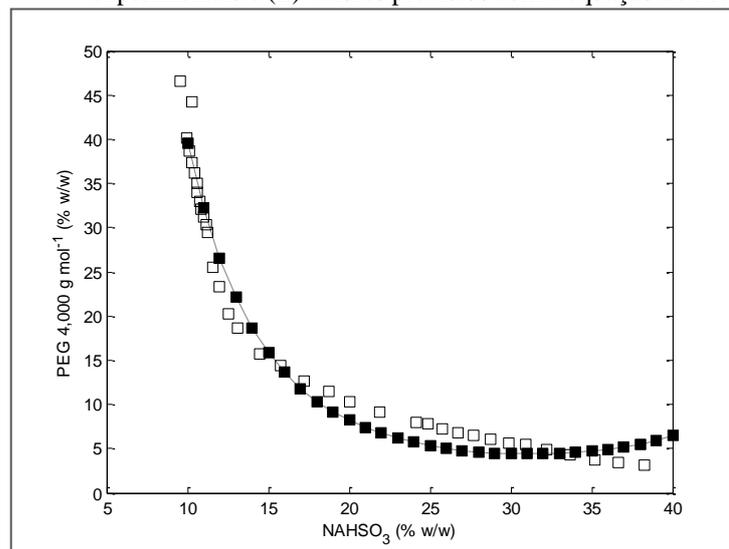
Os parâmetros do ajuste (a, b e c) e o erro são apresentados na tabela 14. Todos os ajustes apresentam valores de erro menores que 0,05 ($e < 0,05$). Esses valores estão de acordo com outros ajustes para sistemas formados com PEG + MgSO₄ + água, PEG +fosfatos +água, etc. A figura 7 mostra a curva binodal experimental e ajustada para o sistema contendo PEG 4.000 + NaHSO₃ + água em T=(298.15)K, para todos os casos o valor de e é inferior 0.05 e abaixo do valor de e encontrado nas referências (OTTO, 2007) .

Tabela15-Ajuste dos parametros das curvas binodais obtidas pela equação (8):

T/K	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>sd</i> *
PEG 4.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + água				
288.15	6.8064	-8.9646	9.8091	0.0134
298.15	35.276	-14.336	43.397	0.0216
308.15	68.180	-16.448	45.827	0.0257
318.15	57.840	-16.889	75.617	0.0092
PEG 6.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + água				
288.15	1.4605	-6.6724	-36.872	0.0099
298.15	2.0490	-9.9131	86.817	0.0198
308.15	1.8869	-9.3455	-58.118	0.0247
318.15	1.5803	-11.378	98.0723	0.0252
PEG 10.000 g mol ⁻¹ + NaHSO ₃ + água				
288.15	1.4767	-6.8819	-90.809	0.0124
298.15	2.3231	-10.852	106.20	0.0146
308.15	2.3231	-12.043	181.40	0.0166
318.15	3.1761	-16.915	423.77	0.0154

Fonte: Do Autor.

Figura 7. Curva binodal experimental e ajustada do PEG 4.000 g mol⁻¹+ NaHSO₃+ água a 298,15 K (□) resultados experimentais e (■) valores previstos com a equação de Merchuk.



Fonte: Do Autor.

4. CONCLUSÃO

O comportamento de fases para novos sistemas aquosos formados por PEG 4.000, 6.000 ou 10.000 g mol⁻¹ + bissulfito de sódio + água nas temperaturas de 288,15; 298,15; 308,15; e 318,15K foi estudado neste trabalho. Os efeitos da alteração da massa molar do polímero e da temperatura no equilíbrio destes sistemas foram avaliados, além disso a cinética do bissulfito de sódio através do monitoramento do pH das fases. Sendo assim observou-se que a elevação da temperatura, nesses SAB estudados, provocou um aumento na inclinação da linha de amarração (ILA), fato atribuído ao aumento da hidrofobicidade dos polímeros com a elevação da temperatura. Efeito semelhante também foi observado ao se elevar a massa molar do polímero em ambos o que ocasionou o aumento do caráter hidrofóbico das moléculas de polímero. Nos SAB formados por PEG 10.000 g mol⁻¹ uma maior incompatibilidade entre os componentes do sistema foi verificada experimentalmente, o que resultou em segregação das fases pela adição de menores concentrações do sal. Por fim, o equilíbrio nos valores de pH das fases, demonstra que não há decomposição do Bissulfito em Sulfato, pois os valores de pH encontrados estão dentro da faixa de pH para o bissulfito descrito na literatura. Sendo assim, foi desenvolvido um novo SAB com bissulfito de sódio que poderá ser precursor de trabalhos futuros, já que não há na literatura específica SAB contendo bissulfito de sódio com esses PEG estudados.

REFERÊNCIAS

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. Nova York: Wiley, 1986.

ALVARENGA B,G; VIRTUOSO L.S.;LEMES N.HT; SILVA L.A; Measurement and Correlation of the Phase Equilibrium of Aqueous Two Phase Systems Composed of polyethylene(glycol) 1500 or 4000 + sodium sulfite +water at different temperatures. **Journal of Chemical &Engineering Data**, 2014

ALVES, J. G. L. et al. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **J. Chromatography B**, n. 743, p. 235-239, 2004.

AZIMAIE, R.; et al. Liquid-liquid phase equilibrium of $MgSO_4$ and PEG1500 aqueous two-phase system. **Physics and Chemistry of Liquids**, n. 48, p. 764–772, 2010.

BEIJERINCK, M. W. Mitteilung uber eine eigentumlichkeit der loslichem starke. Centrabl, Bakteriologie, **Parasitenkunde Infektioskrankheiten**, n. 22, p. 699-701, 1986.

BIEHOU, M. et al. Liquid-Liquid Phase Equilibrium in the Ternary System Poly (ethylene glycol) + Cs_2CO_3 + H_2O . **J. Chem. Eng. Data**, n. 50. P. 792-795, 2005.

BRIDGES, N. J.; GUROWSKI, K. E.; ROGERS, R. D. Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS). **Green Chem.**, n. 9, p.177-183, 2007.

BROOKS, D.E. and FISHER, D. (Eds.) Partition in aqueous two phase systems. **Academic Press**, Orlando, tla, p.1-8, 1995.

BULGARIU. L, BULGARIU D., Selective extration of Hg(II), Cd(II) and Zn(II) ions from aqueous media by a green chemistry procedure using aqueous two-phase systems, **Sep. Purif. Technol.** 118, 209-216, 2013.

COSTA, M. J. L. et al. Scale-up of recombinant cutinase recovery by whole broth extraction with PEG-phosphate aqueous two-phase. **Bioseparation**, n. 9, p. 231–238, 2000.

COSTA , A. R., COIMBRA, J. S., FERREIRA, L.A., Partitioning of bovine lactoferrin in aqueous two-phase system containing poly(ethylene glycol) and sodium citrate, **Food Biop. Proces.** 95, 118-124, 2015.

CARVALHO, P. C. et al. Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278,15 to 318,15) K. **J. Chem. Eng. Data**, n. 52, p. 351-356, 2007.

MULLER,A; BRUNNER B, BREUER C.,The oxygen isotope equilibrium fractionation between sulfite species and water . **Geochimica et Cosmochimica Acta** 120, 562–581, 2013.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **J. Chromatogr. B**, n. 807, p. 3-11. 2004.

CASTRO, B. D.; AZNAR, M. Liquid-liquid equilibrium of water+PEG 8000 + Magnesium sulfate or sodium sulfate aqueous two-phase systems at 35oC: Experimental determination and thermodynamic modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, n. 3, p. 463-470, 2005.

CHEGLUGET, E. L. et al. Liquid-liquid Equilibrium of Aqueous Mixtures Poly (propylene glycol) with NaCl. **J.Chem. Eng. Data**, n. 39, p. 127-130, 1994

COHEH, L. M.; EITEMAN, M. A.; GAINER, J. L. Predicting Partition Coefficients of Amino Acids in Aqueous Two-Phase Systems. **Separation Science and Technology**, n. 30, p. 225 – 237, 1995.

COUTINHO, J. A. P., CLÁUDIO, A. F. M., FREIRE, C. S. R., SILVEIRA, A.J.D., Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Sep. Purif. Technol.** 75, 39-47, 2010.

GRABER, T. A.; Liquid-Liquid Equilibrium of the Aqueous Two-Phase System Water + PEG 4000 + Lithium Sulfate at Different Temperatures. Experimental Determination and Correlation. **J. Chem. Eng. Data**, n. 49, p. 1661–1664, 2004.

HAGHTALAB, A.; MOKHTARANI, B. The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K₂HPO₄ or Na₂SO₄). **Fluid Phase Equilibria**, n. 215, p. 151-161, 2004.

HARRIS, J. M. Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications. Nova York: **Plenum Press**, 1992.

JAYAPAL, M. REGUPATHI, I. MURUFESAN T. Liquid–Liquid Equilibrium of Poly(ethylene glycol) 2000 + Potassium Citrate + Water at (25, 35, and 45) °C. **J. Chem. Eng. Data**, n. 52, p. 56-59, 2007.

L.C.EFFIO, L.et. all, Downstream processing of virus-like particles, Single-stage and multi-stage aqueous two-phase extraction, **J. Chromatogr.** 1383, 35-46, 2015.

LEMOS, L. R. D. et al. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene oxide) 1500 and different electrolytes ((NH₄)₂SO₄, ZnSO₄ and K₂HPO₄): Experimental and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, n. 305, p. 19-24, 2011.

MADEIRA, P. P.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A.; MIKHEEVA, L. M.; Correlations between distribution coefficients of various biomolecules in different polymer/polymer aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilib.** 267, 150-157, 2008.

MALPIEDI, L. P. et al. Liquid–Liquid Equilibrium Phase Diagrams of Polyethyleneglycol + Sodium Tartrate + Water Two-Phase Systems. **J. Chem. Eng. Data**, n. 53, p. 1175-1178, 2008.

MARTINS, J. P. et al. Liquid–Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. **J. Chem. Eng. Data**, n. 53, p. 238-241, 2008.

MERCHUCK, J.C., ANDREWS, B. A., ASENIO, J. A., Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion, *J. Chromatography B*. 711, 285-293, 1998.

NASCIMENTO, K. S. et al. Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology. **Separation and Purification Technology**, n. 75, p. 48–54, 2010.

OTTO, M. *Chemometrics: Statistical and Computer Application in Analytical Chemistry*, **Wiley-VCH**, 2007.

PEREIRA, F. D. S., REIS, I. A. O., SOBRAL, C. R.S., FREIRE, M.G., SANTOS, S.B., Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-sal-based aqueous two-phase systems. **Separ. Sci. Technol.** In press. 2014.

PRAT, L. R. Introduction: **Water. Chem. Rev.**, n. 102, p. 2625–2626, 2002.

RAGHAVARAO, K.S.M.S, et. all. Partitioning of Invertase in Nanoparticle Incorporated Aqueous Two phase Systems Current **Biochemical Engineering**, 1, 155-164, 2015.

RYDEN et al. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **J. Chromatography B**, n. 743, p. 235 –239. 2004.

TABOADA, M. E.; GALLEGUILLOS, H. R. GRABER, T. A. Compositions, Densities, Conductivities, and Refractive Indices of Potassium Chloride or/and Sodium Chloride + PEG 4000 + Water at 298,15 and Liquid-Liquid Equilibrium of Potassium Chloride or Sodium Chloride + PEG 4000 + Water at 333,15 K. **J. Chem. Eng. Data**, n. 50, p. 264-269, 2005.

TADA, E. d. S., LOH, W.; PESSÔA-FILHO, P. A. Phase equilibrium in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide-propylene oxide block copolymers and dextran. **Fluid Phase Equilib.** 218,221-228, 2004.

VICENTE, A. F., MALPIEDI, L. P., Design of novel aqueous micellar two-phase systems using ionic liquids as co-surfactants for the selective extraction of (bio)molecules, **Sep. Purif. Technol.** 135 259-267, 2014.

YAGUCI D. et. al., Aqueous two-phase system-derived biofilms for bacterial interaction studies, **Biomacromolecules**, 10,2655-2661, 2012.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; HAMIDI, A. A. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Poly(ethylene glycol)-Potassium Citrate System. *J. Chem. Eng. Data*, n. 48, p. 262-265, 2001.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning**. Nova York: Marcel Decker, 1995.

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

OTTO, M. **Chemometrics: Statistical and Computer Application in Analytical Chemistry**, Wiley-VCH, 2007.

CASTRO, B. D.; AZNAR, M. Liquid-liquid equilibrium of water+PEG 8000 + Magnesium sulfate or sodium sulfate aqueous two-phase systems at 35°C: Experimental determination and thermodynamic modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, n. 3, p. 463-470, 2005.