



KELLEN CRISTINY RIBEIRO DA SILVA

**SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS, PRINCÍPIOS
TEÓRICOS E APLICAÇÕES: REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

LAVRAS-MG

2019

KELLEN CRISTINY RIBEIRO DA SILVA

**SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS, PRINCÍPIOS TEÓRICOS E
APLICAÇÕES: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso
de Engenharia de Alimentos, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Orientador

LAVRAS-MG

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Kellen Cristiny Ribeiro da.

Sistemas Aquosos Bifásicos, Princípios Teóricos e Aplicações :
Revisão Bibliográfica / Kellen Cristiny Ribeiro da Silva. - 2019.
38 p.

Orientador(a): José Guilherme Lembi Ferreira Alves.

TCC (graduação) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
Bibliografia.

1. Sistemas aquosos bifásicos. 2. Parâmetros físico-químicos. 3.
Aplicações. I. Alves, José Guilherme Lembi Ferreira. II. Título.

KELLEN CRISTINY RIBEIRO DA SILVA

**SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS, PRINCÍPIOS TEÓRICOS E
APLICAÇÕES: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso
de Engenharia de Alimentos, para a
obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 27 de novembro de 2019

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves UFLA

Dr. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo UFLA

Me. Yasmim Fernanda da Silva UFLA

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Orientador

LAVRAS-MG

2019

*A minha família que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu
chegasse até esta etapa da minha vida.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela capacitação e por me permitir chegar até aqui.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pelo aprendizado profissional e pessoal.

À todos os professores que ofereceram suporte ao longo da graduação. Em especial ao meu orientador professor José Guilherme, pela orientação, conhecimento, dedicação e disposição para ajudar.

A todos funcionários do DCA/UFLA.

Aos meus pais Neila e Argemiro, aos meus irmãos Kênia, Keila e Matheus, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À República Mulherama, pelo apoio, incentivo e irmandade em todos os momentos.

Muito obrigada!

RESUMO

O presente trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre sistemas aquosos bifásicos (SAB'S), reúne dados da literatura das diferentes aplicações e utilizações da operação por extração líquido-líquido. Foram descritos os efeitos reportados para os parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, influência do tipo de sal e da massa molar, sobre os dados de equilíbrio de SAB's. Em geral o aumento da temperatura aumenta a região bifásica, o que torna necessário menores quantidades dos constituintes formadores de fase para formar SAB's. Foi constatado em diversos trabalhos que o aumento da inclinação das linhas de amarração com o aumento da carga do ânion. Observou-se que, quanto maior a massa molar dos polímeros, menor a concentração requerida para a separação de fases. Sobre o pH, a maioria dos estudos concluíram que não houve efeito dessa variável sobre a curva binodal, nem influência do pH nas composições das linhas de amarração quando se trata de dados de equilíbrio termodinâmico. Já em relação à partição de biomoléculas, em se tratando de proteínas, o pH pode afetar a partição dessa biomolécula. Sobre a utilização de líquidos iônicos, foi observado que é uma alternativa para purificação de biomoléculas de valor agregado. Como inovação, destaca-se a utilização de copolímeros tribloco em sistemas que necessitam de extratantes que não são hidrossolúveis e para extração de solutos hidrofóbicos e apresentou resultados favoráveis para extração. Foi apresentado a utilização de líquidos iônicos como constituintes de SAB e também como adjuvante em ensaios de partição de biomoléculas. A aplicação de SAB em purificação de ácidos orgânicos foi apresentada. Portanto, esse trabalho contribuiu na compilação de resultados de dados de equilíbrio líquido – líquido apresentados na literatura e demonstrou o potencial da extração líquido- líquido por SAB's para a extração dos mais diversos compostos.

ABSTRACT

This paper presents a bibliographic review on aqueous two-phase systems (ATP's), gathers literature data on the different applications and uses of liquid-liquid extraction operation. The reported effects for physicochemical parameters such as temperature, pH, influence of salt type and molar mass on ATP's equilibrium data were described. Increasing the temperature generally increases the biphasic region, which necessitates smaller amounts of phase-forming constituents to form ATP's. It has been found in several works that the increase of the mooring lines inclination with the increase of the anion charge. It was observed that the higher the molar mass of polymers, the lower the concentration required for phase separation. On pH, most studies concluded that there was no effect of this variable on the binodal curve, nor influence of pH on the mooring line compositions. However, it is noteworthy that when it comes to proteins, pH can affect the partition of this biomolecule. Regarding the use of ionic liquids, it was observed that they are alternatives for purification of value added biomolecules. As an innovation, we highlight the use of triblock copolymers in systems that require non-water soluble extractants and for extraction of hydrophobic solutes and showed favorable results for extraction. The use of ionic liquids as constituents of ATP and also as an adjuvant in biomolecule partition assays has been presented. The application of SAB in purification of organic acids was presented. Therefore, this work contributed to the compilation of liquid-liquid equilibrium results presented in the literature and demonstrated the potential of liquid-liquid extraction by ATP's for the extraction of the most diverse compounds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de grupos de SAB e seus constituintes.....	19
Tabela 2 – Aplicações de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de fases dos constituintes formadores de SAB's expresso em coordenadas retangulares.....	21
--	----

LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
C_{FI}	Composição da fase inferior
C_{FS}	Composição da fase superior
CLA	Comprimento das linhas de amarração
Dex	Dextrana
ELT	Extração líquido- líquido tradicional
EOPO	Co-polímero de óxido de etileno e óxido de propileno
GMP	Glicomacropéptido
HPS	Hidroxipropil-amido
ILA	Inclinação da linha de amarração
K	Coefficiente de partição
LA	Linha de amarração
LI	Líquido iônico
MD	Maltodextrina
P_c	Ponto crítico
PEG	Polietileno glicol
PEO	Poli (óxido de etileno)
pH	Potencial hidrogeniônico
PPG	Polipropilenoglicol
PPO	Poli (óxido de propileno)
PVA	Álcool Polivinílico
PVP	Polivinil pirrolidona
SAB (ATPS)	Sistema Aquoso Bifásico (Aqueous two-phase System)

LISTA DE SIMBOLOS

$^{\circ}C$	<i>grau Celsius</i>
c_{c1}^S	<i>Concentrações de constituinte 1 na fase superior</i>
c_{c1}^I	<i>Concentrações de constituinte 1 na fase inferior</i>
c_{c2}^S	<i>Concentrações de constituinte 2 na fase superior</i>
c_{c2}^I	<i>Concentrações de constituinte 2 na fase inferior</i>
$[C]_{sup}$	<i>Concentrações de equilíbrio do soluto na fase superior</i>
$[C]_{inf}$	<i>Concentrações de equilíbrio do soluto na fase inferior</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO.....	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
3	METODOLOGIA	15
4	REFERENCIAL TEÓRICO	16
4.1	Separação por Extração Líquido-Líquido.....	16
4.2.1	Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	18
4.2.2	Diagrama de equilíbrio de Sistemas Aquosos Bifásicos	20
4.2.3	Coeficiente de Partição	23
4.2.4	Variáveis que influenciam a formação de SAB's	24
4.2.4.1	Efeito da massa molecular e concentração do polímero na formação de SAB	24
4.2.4.2	Efeito do pH na formação de SAB	25
4.2.4.3	Efeito da Temperatura na formação de SAB	26
4.2.4.4	Efeito do tipo do Sal na formação de SAB	27
5	APLICAÇÕES	Erro! Indicador não definido.
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são formados pela mistura de componentes químicos, como polímeros, sais, carboidratos e água, numa certa faixa de concentração, temperatura, que se dividem em duas fases aquosas imiscíveis, em equilíbrio termodinâmico. (ALBERTSSON, 1963)

Os primeiros relatos de estudos envolvendo esse tipo de sistema datam do ano de 1896, quando Beijerinck (1896) descobriu que, ao se misturar soluções aquosas de gelatina e ágar (ou gelatina e amido solúvel), sob dada faixa de temperatura e concentração, formavam-se misturas turvas as quais, quando deixadas em repouso, separavam-se em duas fases límpidas, uma delas (a mais densa) enriquecida em ágar (ou amido) e a outra enriquecida em gelatina, sendo a água o componente majoritário em ambas as fases. Os trabalhos de Tiselius, Porath e Albertsson (1963) evidenciaram a grande aplicabilidade destes sistemas na partição e purificação de materiais biológicos.

As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração, pressão, temperatura e composição. Contudo, como as duas fases dos SAB estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. (CARVALHO,2004)

Em relação às técnicas tradicionais de extração líquido-líquido, os sistemas aquosos bifásicos são vantajosos e, por isso, têm sido aplicados com sucesso na separação e purificação de macromoléculas e partículas celulares. Apresentam alto rendimento e baixo custo. Adicionalmente, o alto conteúdo de água de ambas as fases (80-90 %) implica em alta biocompatibilidade e baixa tensão interfacial, minimizando a degradação das biomoléculas (JOHANSSON, 1998; SALABAT, 2001; GÜNDOZ, 2004)

Entretanto, um dos mais importantes desafios é a predição do comportamento de misturas que apresentam a formação de fases distintas. Muitos estudos estão sendo realizados para compreender os processos termodinâmicos que governam a partição de solutos em SABs. Assim, para reunir os últimos estudos e avanços tecnológicos sobre a aplicação dos SAB's, foi realizado esse trabalho de revisão bibliográfica

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre os principais sistemas aquosos bifásicos, seus dados de equilíbrio líquido-líquido e suas principais aplicações na extração de diversos compostos.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do estudo foram:

- ✓ Discutir a influência de fatores físico-químicos na formação dos sistemas aquosos bifásicos;
- ✓ Apresentar aplicações de sistemas aquosos bifásicos;
- ✓ Apresentar resultados de dados de equilíbrio líquido-líquido disponíveis na literatura;
- ✓ Discorrer sobre as principais inovações quanto aos novos sistemas bifásicos.

3 METODOLOGIA

Foi realizado um estudo através de uma pesquisa bibliográfica, considerando a relevância do tema, buscando aprofundar nos conhecimentos sobre princípios teóricos e aplicações de Sistemas Aquosos Bifásicos. A revisão bibliográfica foi realizada através de consulta em fontes como artigos, periódicos científicos, livros, teses, dissertações e resumos publicados em congresso sobre o tema, explorando as diferentes aplicações para SAB's, fatores que influenciam na sua formação e principais inovações na área.

O trabalho foi conduzido de acordo com as seguintes etapas:

1. Definição da necessidade da pesquisa

Devido à relevância do tema, muitos estudos foram desenvolvidos nos últimos 20 anos. Porém, foi verificada a necessidade de se atualizar as informações sobre esse tipo de processo para direcionamento de futuras pesquisas.

2. Pesquisa bibliográfica

As buscas foram realizadas utilizando o portal de periódicos da CAPES, possibilitando acesso a livros, artigos e periódicos. Foi utilizado na grande maioria das buscas o Google Acadêmico por ser uma ferramenta simples de pesquisa que permite acessar trabalhos acadêmicos, revistas científicas, jornais de universidades e artigos variados de forma gratuita. Utilizou-se também o repositório institucional de universidades que disponibilizam monografias, teses e dissertações defendidas nas diferentes instituições e o banco de dados do Scopus.

3. Seleção das informações

A coleta de dados seguiu as seguintes etapas:

- a) Leitura exploratória de todo material pesquisado, buscando identificar os assuntos de interesse da revisão.
- b) Leitura seletiva realizada através da leitura aprofundada dos estudos com objetivo de selecionar as considerações mais relevantes de cada autor nos últimos anos.
- c) Registro das informações de cada artigo/trabalho sobre resultados obtidos e sobre a influência de algumas variáveis sobre esse processo, além de suas aplicações e inovações.

4. Análise e interpretação dos estudos

Nesta etapa foi realizada a leitura crítica dos estudos com a finalidade de ordenar e resumir as informações contidas nas fontes, de forma a obter resultados relevantes para a presente pesquisa.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Extração Líquido-Líquido

Robbins e Cusack (1997) definiram extração líquido-líquido como uma operação unitária empregada para separar componentes em solução por meio da transferência de massa de tais componentes de uma fase líquida em contato direto com outra fase líquida imiscível a primeira. Essa operação unitária é empregada há cerca de 60 anos na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos (PESSOA JÚNIOR e KILIKIAN, 2005). É aplicada também nas indústrias química, farmacêutica, metalúrgica, alimentícia e no tratamento de resíduos (CUSACK; FREMAUX; GLATZ, 1991; COULSON et al., 1996; DA SILVA; LOH, 2006)

Entretanto, uma desvantagem presente na extração líquido-líquido tradicional (ELT) é o uso de solventes orgânicos que, normalmente, são tóxicos, cancerígenos e/ou inflamáveis. Uma alternativa promissora para substituir a ELT, baseada nos princípios da química verde, são os SAB, constituídos majoritariamente por água, sendo os seus demais componentes formadores (polímeros e sais) não tóxicos nem inflamáveis, o que os torna um sistema de extração ambientalmente seguro. Além disso, seus constituintes são comercialmente acessíveis e de baixo custo (ALCÂNTARA, 2009; DA SILVA; LOH, 2006).

4.2 Sistemas Aquosos Bifásicos

Os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's) são sistemas formados por duas fases líquidas que se encontram em equilíbrio termodinâmico. As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração e composição. Mas como as duas fases do SAB's estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria e energia entre as fases (CARVALHO, 2004).

De acordo com Carvalho (2004), a característica que confere ao SAB larga utilização na partição/purificação de biomateriais é a baixa tensão interfacial, quando comparada àquela existente entre uma fase aquosa e outra não aquosa.

Beijerinck (1896) foi o primeiro pesquisador a relatar a possibilidade de formação de sistemas de duas fases em que o principal constituinte de ambas as fases é a água, ao

misturar soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, em uma dada faixa de temperatura e concentração. O pesquisador observou a formação de misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases (ALBERTSSON, 1986).

Albertsson (1986) foi o pioneiro na utilização dos sistemas aquosos bifásicos em processos de separação, utilizando soluções aquosas de polietilenoglicol e dextrana para a separação de diferentes biomoléculas, evidenciando um potencial de aplicação desses sistemas na partição e/ou purificação de substâncias para as futuras pesquisas científica.

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

De acordo com Silva e Loh (2006) os sistemas denominados aquosos bifásicos (SABs ou, em inglês, APTS) desempenham um papel estratégico pois, as duas fases são formadas predominantemente (60-95%) por água. Os SAB apresentam ainda outras vantagens em comparação aos métodos tradicionais de separação e purificação de biocompostos, como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas, facilidade de separar materiais particulados e permite concentrar a proteína de interesse em uma das fases controlando o volume das mesmas (CASCONE; ANDREWS; ASENJO, 1991).

Contudo, a partição em SAB baseia-se na distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Porém, a predição e a interpretação da partição de biocomponentes em sistemas aquosos bifásicos é uma tarefa complexa, embora a manipulação das propriedades do sistema tornando predominante um determinado tipo de interação venha a ser uma forma de controlar a partição (HATTI-KAUL, 2001). Sendo assim, se torna necessário ampliar os estudos de diferentes SAB para que facilite seu uso em processos de purificação.

4.2.1 Tipos de Sistemas Aquosos Bifásicos

Um sistema aquoso bifásico é composto por duas fases aquosas, sendo a água o componente majoritário do sistema, e possui uma variedade de possibilidades de combinação dos demais componentes formadores (polímero e eletrólito, eletrólito e eletrólito, polímero e polímero, líquido iônico e polímero, álcool e líquido iônico, álcool e sal, líquido iônico e sal, dentre outras possíveis combinações).

O sistema polímero-polímero mais comum é composto de dextrana e Polietilenoglicol (PEG), mas a dextrana é de custo elevado o que inviabiliza o seu uso em larga escala. Os sistemas PEG e sais são atrativos devido ao baixo custo, rápida separação de fases e baixa viscosidade. Por outro lado, apresentam algumas limitações como a desnaturação de biomoléculas em altas concentrações de sais (SILVA e MEIRELLES, 2000).

Os copolímeros tribloco vem sendo amplamente aplicados na formação de SAB's e são constituídos pela junção de três monômeros poliméricos, sendo o segmento central diferente dos segmentos externos. Comumente são constituídos por monômeros de óxido de etileno (PEO) e de monômero de óxido de propileno (PPO), na seguinte ordem PEO-PPO-PEO (de LEMOS et al., 2013; de LEMOS et al., 2012; SANTOS et al., 2015). Essa diferença na estrutura química ao longo de sua cadeia possibilita diferentes tipos de interação, que em temperaturas e concentrações adequadas, têm-se a formação de estruturas micelares com um núcleo hidrofóbico, e uma coroa hidrofílica. A formação desse núcleo hidrofóbico é vantajosa para a utilização de extratantes que não são hidrosolúveis e para extração de solutos hidrofóbicos. Logo, o interior da micela, por ser hidrofóbico, possibilita a solubilização do complexo que contém o analito de interesse ou diretamente o próprio analito (CARVALHO, 2017; RODRIGUES et al., 2008).

Os líquidos iônicos são uma nova classe de sais com ponto de fusão abaixo de 100 °C, cujas características principais incluem alta capacidade de solvatação, baixa inflamabilidade e alta estabilidade térmica e química (MONIRUZZAMAN et al., 2010). Estão sendo aplicados na formação de SAB's e neste caso, o SAB é formado pela mistura de líquido iônico, polímero e água ou líquido iônico, eletrólito e água ou álcool (ZHENG et al., 2015). Estudos como o de Vicente et al. (2016) e Wu et al. (2015) aplicaram líquido iônico para formação de SAB's e partição de enzima e aminoácidos, respectivamente.

O uso de líquidos iônicos na formação de SAB's apresentam algumas desvantagens como elevado custo econômico para sua produção, complexidade de síntese devido à necessidade de várias etapas e reagentes químicos para obtenção do líquido iônico, além de ser tóxico, em alguns casos (LI et al.,2016). Por essas desvantagens, o uso de SAB formados por polímero-sal é comumente mais empregado em estudos de partição de diversos analitos. (CARVALHO, 2017)

Pode-se verificar na Tabela 1 estudos em composições com diferentes constituintes apresentado por Cardoso (2013) evidenciando assim o potencial de aplicação destes sistemas no desenvolvimento de tecnologias para a inovação dos processos industriais.

Tabela 1 - Exemplos de grupos de SAB e seus constituintes

Grupos do SAB	Constituintes	Referência
Polímero - Polímero	PEG/Dextrana	GÜNDÜZ; KORKMAZ,2000
	PEG/ Álcool Polivinílico	PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005
	PEG/Poli ácido acrílico	SARAVANAN et al., 2008
Polímero – Sal Inorgânico	PEG/Fosfato de Potássio	HARAGUCHI et al., 2004
	PEG/Sulfato de Magnésio	OLIVEIRA et al., 2009
	PEG/Tartarato de Sódio	MAGESTE et al., 2009
Solvente Orgânico – Sal Inorgânico	Álcool/Citrato de Sódio	OOI et al., 2009
	Álcool/K ₂ HPO ₄	WANG et al., 2011
	Álcool/Sais de Potássio	REIS et al., 2012
Líquido Iônico – Sal Inorgânico	[C4min]Cl/Fosfato de Potássio	LOUROS et al., 2010
	[C7mim]Cl/Fosfato de Potássio	VENTURA et al., 2011
Líquido Iônico – Carboidratos	[C4min]Cl/D-Maltitol	FREIRE et al., 2011
Líquido Iônico – Aminoácidos	[C4min]Cl/L-Lisina	DOMÍNGUES-PÉREZ et al., 2009

Adaptado de Cardoso (2013).

A utilização de carboidratos como substitutos potenciais de sais inorgânicos e polímeros para a formação de SAB, são recentes. A utilização de açúcares em SAB já foi abordada por Wang et al. (2008), em combinação com acetonitrila, bem como por Wu, Zhang, Wang (2008) e Freire et al. (2011) que utilizaram os açúcares em combinação com os líquidos iônicos. Os carboidratos são utilizados em SAB's na separação de determinadas substâncias que não toleram a presença de sais (Monteiro Filho, 2010).

Na tabela 2 são exemplificados alguns exemplos de SAB's aplicados na extração, separação e purificação de biomoléculas.

Tabela 2 - Aplicação de Sistemas Aquosos Bifásicos

Biomolécula	SAB
BSA e ovalbumina	PEG – Dextrana
Endopoligalacturonase	PEG- Polivinil álcool
Amiloglucosidase	PEG- Na ₂ SO ₄
β-galactosidase, lisozima	PEG- Dextrana
Álcool desidrogenase	PEG- Hidroxipropil-amido (HPS)
BSA	PEG- Goma guar
Ácido láctico	EOPO – Dextrana
Lignina	PEG- K ₂ CO ₃ , NH ₄ SO ₄
α-amilase	PEG – MgSO ₄
β-ig, BSA, caseína	Dextrana - Goma guar
Glutenina	PEG – Dextrana
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PEG – Maltodextrina (MD)
Lisina, glicina	PEG- Dextrana

Adaptado de Oliveira, 2006.

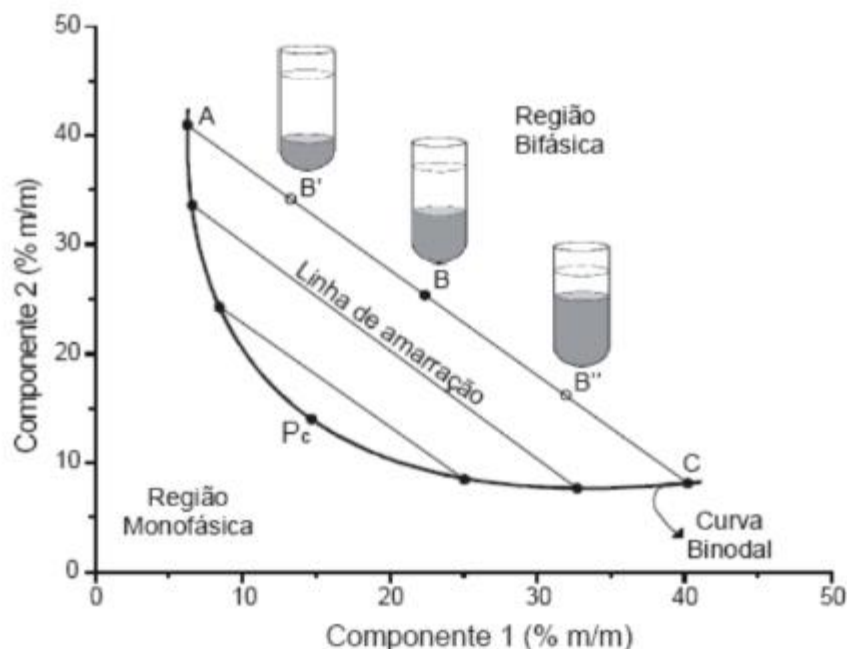
4.2.2

Aquosos Bifásicos

Diagrama de equilíbrio de Sistemas

Diagramas de equilíbrio são representações gráficas dos dados de equilíbrio de fases. São compostos pela linha de equilíbrio ou curva binodal, que delimita as regiões monofásica e bifásica e pelas linhas de amarração, que unem as composições do ponto de mistura e das fases no equilíbrio (MCCABE; SMITH; HARRIOT, 1993).

Figura 1 - Diagrama de fases dos constituintes formadores de SAB's expresso em coordenadas retangulares



Fonte: Carvalho (2007)

Para SAB, os diagramas de equilíbrio são normalmente mostrados em gráficos cartesianos. A concentração de um dos polímeros ou do sal é representada no eixo horizontal e a concentração do outro polímero, no eixo vertical (MONTEIRO FILHO, 2001).

O diagrama apresenta informações como a curva binodal que delimita a região onde o sistema é monofásico da região onde o sistema é bifásico, podendo assumir diferentes posições no diagrama em função de parâmetros como temperatura, pH e natureza dos componentes do sistema (RENGIFO, 2015; de LEMOS, 2011). As Linhas de Amarração (LA) ligam pontos no diagrama que representam a composição da fase superior (C_{FS}) e a composição da fase inferior (C_{FI}), quando as mesmas estão em equilíbrio termodinâmico (CARVALHO, 2017)

Há no diagrama de fases também o ponto crítico (P_c), a diminuição sucessiva nos comprimentos das linhas de amarração (CLA) leva ao encontro do ponto crítico (P_c). À medida que as composições das duas fases do sistema se aproximam deste ponto, a

diferença entre as propriedades termodinâmicas dessas fases diminui até que, teoricamente, tornam-se iguais (ANDRADE, 2011).

Um conjunto de pontos que se situa na região bifásica e que esteja em uma mesma linha de amarração fornece as fases que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.) e as propriedades extensivas diferentes (massa, volume, etc.) (CUNHA, 2008)

Segundo Andrade (2011), um importante parâmetro a ser analisado em estudos de partição utilizando SABs é o CLA (Comprimento da linha de amarração), que é definido matematicamente pela Equação 1.

$$CLA = [(C_{c1}^S - C_{c1}^I)^2 + (C_{c2}^S - C_{c2}^I)^2]^{1/2} \quad (1)$$

Onde, C_{c1}^S e C_{c1}^I são as concentrações de constituinte 1 na fase superior e inferior respectivamente e C_{c2}^S e C_{c2}^I são as concentrações de constituinte 2 na fase superior e na fase inferior respectivamente em % (m/m) .

Sendo assim, espera-se que, se um soluto possui maior afinidade por uma das fases do SAB, à medida que se aumenta o CLA, mais distintas são as propriedades termodinâmicas intensivas entre as duas fases e mais distintos serão os coeficientes de partição (K) deste soluto.

À medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, elevando, conseqüentemente, a eficiência na extração e/ou partição do soluto de interesse (PEI et al., 2012).

A inclinação da linha de amarração (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, por exemplo (ALBERTSSON, 1986; CARDOSO, 2013). O valor da inclinação pode ser calculado de acordo com a Equação 2:

$$ILA = \frac{C_{c1}^S - C_{c1}^I}{C_{c2}^S - C_{c2}^I} \quad (2)$$

Onde, C_{C1}^S e C_{C1}^I são as concentrações de constituinte 1 na fase superior e inferior respectivamente e C_{C2}^S e C_{C2}^I são as concentrações de constituinte 2 na fase superior e na fase inferior respectivamente.

Este parâmetro apresenta-se como uma característica importante dos diagramas de fases uma vez que o seu valor é geralmente constante, quando está presente em um SAB com polímeros na composição (ALBERTSSON, 1986). Sua avaliação, comparação com uma média para um dado sistema e nova medição para valores afastados dessa média é provavelmente o melhor método para obter diagramas de fases confiáveis (CARDOSO, 2013; ZASLAVSKY, 1995).

4.2.3 Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição é definido como a razão entre a concentração de uma biomolécula nas fases de superior e inferior (WANG et al., 2011). As biomoléculas, aplicadas nos SAB's para extração e purificação distribuem-se entre as duas fases aquosas, podendo ser definido um coeficiente de partição desta biomolécula, pela utilização da Equação 3:

$$K = \frac{[C]_{Sup}}{[C]_{Inf}} \quad (3)$$

Onde $[C]_{Sup}$ e $[C]_{Inf}$ são as concentrações de equilíbrio do soluto na fase superior e inferior, respectivamente.

Essa distribuição depende tanto das características da biomolécula que se distribui (massa molar, carga, hidrofobicidade superficial, etc.), quanto da natureza do SAB utilizado (reagentes, massa molar, concentração, pH, força iônica, etc.). Embora a manipulação das propriedades do sistema venha a ser uma forma de controlar a partição das biomoléculas no sistema, controlá-la ainda é uma difícil tarefa (CARDOSO 2013; CHAIWUT, RAWDKUEN, BENJAKUL, 2010; GIRALDO-ZUÑIGA, COIMBRA, MINIM, 2001).

4.2.4 Variáveis que influenciam a formação dos SAB's

Diversos fatores como: constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza e tamanho da partícula alvo; pH e natureza do eletrólito do sistema bifásico influenciam na separação de fases em SAB e, conseqüentemente, o processo extrativo de um determinado biocomposto (ALBERTSSON, 1986).

4.2.4.1 Efeito da massa molecular e concentração do polímero na formação do SAB

Quanto maior for a massa molar do polímero, menor é o volume de água disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986).

A massa molar do polímero influencia na separação do biomaterial por alteração do diagrama de fase (isto é, por influenciar a composição das fases) e por mudança no número de interações polímero-proteína. Em geral, o aumento na massa molar de um dos polímeros (em sistemas polímero e polímero) levará a uma separação mais acentuada do material em outra fase. Entretanto, a magnitude desse efeito decresce com o aumento da cadeia do polímero (ALBERTSSON, 1986; FORCINITI; HALL, 1991).

Com relação à concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases se desloca em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero. A viscosidade das fases também aumenta com o aumento na concentração do polímero e isto pode influenciar a partição da proteína alvo (ASENJO, 1990; ALBERTSSON, 1986).

No que diz respeito a massa molar do polímero, quanto maior a massa molar dos polímeros, menor a concentração requerida para a separação de fases, e ainda, quanto maior a diferença no tamanho molecular entre os dois polímeros, mais assimétrica é a binodal (ALBERTSSON, 1986).

No trabalho de Tubío et al. (2006), verificaram em sistemas aquosos compostos por citrato de sódio + PEGs de diferentes massas molares, pH 9,2 e a 22°C, que as curvas binodais se tornaram assimétricas e mais próximas da origem com o aumento da massa molecular do PEG, e com isso menores concentrações de PEG eram necessárias para que ocorresse a separação de fases.

Ainda sobre a influência da massa molar dos polímeros em SAB's, Monteiro Filho (2001) estudou o equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos (SAB) formados por água + um açúcar (glicose, maltose ou maltodextrina) + um polímero sintético (PPG ou um co-polímero de PEG-PPG) a (25 e 30) °C. Obteve 13 diagramas com as misturas que apresentaram formação de duas fases líquidas e observou que o aumento da massa molar dos polímeros aumentou a região bifásica. Carvalho (2004) obteve resultados semelhantes estudando o efeito de duas massas molares de PEG em SAB's compostos por polímero + sais orgânicos e água.

Em outros trabalhos como da Silva e Meirelles (2001) e Zafarani-Moattar e Sadeghi (2001) foi também observado o mesmo comportamento, ou seja, aumento da região bifásica como consequência da maior massa molar do polímero constituinte do sistema.

Alves et al. (2008), determinaram experimentalmente o equilíbrio líquido-líquido de 3 sistemas contendo polietileno glicol (massas molares 600, 1500 e 3000) e citrato de sódio a 25 °C com objetivo de prever a influência da massa molecular do PEG no equilíbrio líquido-líquido das fases. Além disso, os resultados experimentais foram correlacionados com o modelo VERS (Equação do Virial com frações superficiais relativas) para o excesso de Gibbs energia de soluções aquosas de eletrólitos com baixa massa molecular e polímeros neutros. Esse modelo também foi utilizado para prever a influência da temperatura e massa molecular do PEG no equilíbrio líquido-líquido e para comparação com dados da literatura de tais equilíbrios líquido-líquido. Comparando com os dados experimentais do trabalho e de diversos outros autores, concluiu que o modelo apresentado obteve uma boa correlação com tais dados.

4.2.4.2 Efeito do pH na formação do SAB

Estudando o efeito do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do SAB PEG/fosfato, Ferreira, Padilha, Tambourgi (2009) concluíram que não houve deslocamento significativo da binodal em relação aos diferentes pHs estudados nem influência do pH nas composições das linhas de amarração. Nesse estudo ela utilizou sistemas PEG com massas molares de 1500, 4000 e 6000 e tampões fosfato variando de 6 a 8, em condições normais.

Se tratando de partição de proteínas, Alcântara (2009) relatou que o pH, indiretamente, pode afetar a partição de uma proteína e modificar a composição das fases dos SAB, seja a posição da linha binodal, seja o comprimento da linha de

amarração. O pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (DA SILVA; LOH, 2006).

4.2.4.3 Efeito da temperatura na formação do SAB

A temperatura pode levar a mudanças na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros alterando a forma da curva binodal no diagrama de fases (CARVALHO, 2004). Um deslocamento da curva binodal pode levar, facilmente, o sistema para a região monofásica (BAMBERGER et al., 1985).

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero e polímero ou polímero e sal. Para o sistema PEG e dextrana, foi constatada 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 (ALCÂNTARA, 2009).

Oliveira (2006), apresentou o estudo de sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (PEG 1500 e PEG 4000), sais inorgânicos (sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio) e água. Os sistemas PEG 1500 + citrato de sódio foram analisados nas temperaturas de (10, 35 e 45) °C, enquanto que os sistemas PEG 4000 + sulfato de zinco ou sulfato de cobre foram estudados nas temperaturas de (5, 10, 35 e 45) °C e os sistemas compostos por PEG 4000 + citrato de sódio foram estudados nas temperaturas (5, 10, 25, 35 e 45) °C. Conclui que ocorreu um aumento da inclinação da linha de amarração com o aumento da temperatura. Resultados semelhantes foram obtidos por Sé e Aznar (2002) estudando o efeito da temperatura em sistemas PEG 4000 + fosfato de potássio + água, entre (10 e 30) °C, por Mishima et al. (1995), Zafarani-Moattar e Sadeghi (2004) e Murugesan e Perumalsamy (2005).

De acordo com Zafarani-Moattar e Sadeghi (2001), esse efeito ocorre porque as composições das fases no equilíbrio mudam com a variação de temperatura. O seu aumento em sistemas bifásicos PEG + sal causa um aumento da concentração de PEG na fase superior e uma diminuição da concentração de sal na fase inferior. 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.

Foi estudado por Graber et al. (2004) o efeito das temperaturas de 5 °C, 25 °C e 45 °C em sistemas PEG 4000 + sulfato de lítio + água, concluindo que o aumento da temperatura provocou o deslocamento da curva binodal aumentando a região bifásica, o que implica numa menor concentração do sal e do polímero necessárias para a formação dos sistemas aquosos bifásicos. Zafarani-Moattar e Gasemi (2002) investigaram a influência da temperatura (25, 35 e 45) °C em sistemas aquosos PEG 6000 + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e PEG 6000 + $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, verificando também uma expansão da área bifásica com o aumento da temperatura. Conclusão semelhante foi obtida nos trabalhos de Zafarani-Moattar e Sadeghi (2001), para sistemas PEG 6000 + Na_2HPO_4 e PEG 6000 + NaH_2PO_4 e por Voros, Proust, Fredenslund (1993), em sistemas PEG 2000 + Na_2CO_3 .

De uma forma geral, os autores concluíram que o aumento da temperatura provoca diminuição da solubilidade mútua, ou seja, aumento da região bifásica. Igualmente, pode ser dito que o aumento da temperatura favorece a formação do SAB.

4.2.4.4 Efeito do tipo do Sal na formação do SAB

A adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados (ALCÂNTARA, 2009). Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados (SARUBBO, 2000).

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. Verificou que a concentração de PEG necessária à separação de fases no sistema PEG + sulfato de dextrana + água, adicionado de sais, dependia do tipo de sal usado. E ainda, que se uma quantidade suficiente de sal fosse adicionada, não era necessário incorporar PEG ao sistema para que ocorresse a separação das fases. Desta forma, surgiram os primeiros sistemas aquosos bifásicos do tipo polímero + sal + água (CARVALHO, 2004).

Zafarani-Moattar e Sadeghi (2004) verificaram o efeito do tipo de sal sobre o equilíbrio de fases em sistemas aquosos PVP + Na_2HPO_4 e PVP + Na_3PO_4 , foi verificado que o aumento da carga do ânion de $-1(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$ para $-3(\text{PO}_4^{3-})$ diminuiu a concentração de sal necessária para a separação de fases. Resultados semelhantes aos

dos sistemas PEG e os sais NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e Na_3PO_4 , estudado por Zafarani-Moattar e Sadeghi (2001). Constataram também o aumento da inclinação das linhas de amarração com o aumento da carga do ânion. Tal efeito se deve à maior capacidade de hidratação dos ânions de maior valência sobre os de valência menor.

Carvalho (2004), estudando a influência do tipo de sal em SAB's compostos por polímero (PEG 1500 e PEG 4000) + sais orgânicos (fosfato de potássio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e citrato de sódio) e água, observou que os sistemas constituídos pelo sulfato de sódio possuem maior região bifásica do que aqueles formados por sulfato de lítio e citrato de sódio, sob as mesmas condições, isto é, o sulfato de sódio possui maior capacidade de induzir a separação de fases que o sulfato de lítio e o citrato de sódio.

5 APLICAÇÕES DE SAB'S

Atualmente, os sistemas aquosos bifásicos são aplicados mais eficientemente em etapas iniciais dos processos de purificação, mas em casos raros podem até mesmo substituir os clássicos sistemas cromatográficos. (DA SILVA; LOH,2006).

Alcântara (2009) estudou o processo de extração em sistemas aquosos bifásicos para a otimização do fracionamento das proteínas do soro de leite α -lactoalbumina (α -la), β -lactoglobulina (β -lg) e glicomacropéptido (GMP). Utilizou sistemas com (PEG) 2000 e sais de fosfato de potássio, citrato de sódio e sulfato de lítio, avaliando a influência do pH, temperatura, concentração de PEG, concentração de sal e concentração de NaCl sobre a partição das proteínas. Concluiu que SAB podem ser utilizados para fracionamento desse tipo de proteína e que dentre os sistemas avaliados, os SAB adicionados de soro integral, apresentaram: maior taxa de redução da α -la e GMP na fase inferior e maior fator de purificação da β -lg na fase salina.

Com o objetivo de desenvolver novos SAB's baseados em acetonitrila associada à carboidratos, polióis, polímeros naturais (dextrana) e álcool polivinílico e sua aplicação na partição da vanilina, Cardoso (2013) determinou os diagramas de fase e o efeito da estrutura dos carboidratos, polióis, dextrana e álcool polivinílico sobre a formação do sistema bifásico foi avaliada. Além de carboidratos de elevada pureza, açúcares comerciais de grau alimentício também foram testados e mostraram ser capazes de formar SAB's. Nos sistemas avaliados a vanilina migrou preferencialmente para a fase rica em acetonitrila e concluiu que a recuperação da vanilina na fase rica em

acetonitrila mostrou-se superior a 90% nos sistemas acetonitrila/carboidrato, e acetonitrila/polióis, a recuperação de vanilina foi maior que 70% a temperatura de 15 °C utilizando SAB's constituídos por acetonitrila/dextrana e nos sistemas constituídos por acetonitrila/PVA a recuperação foi de 78,84% para um pH de 4,7 e a temperatura de 5 °C. Tais resultados apoiam o enorme potencial destes novos sistemas a serem explorados na extração dos mais diversos compostos de valor agregado.

Dentre os diferentes estudos recentes, Pereira et al. (2010) estudaram a influência da adição de líquidos iônicos (LI) no SAB constituído por PEG 600 e Na₂SO₄, e perceberam que a separação do L-triptofano na presença de pequenas quantidades de líquidos iônicos foi bastante eficiente na formação do sistema e induziram diretamente a mudança do coeficiente de partição da biomolécula.

Michel et al. (2015), utilizou o sistema aquoso bifásico com líquido iônico constituído por [C4mim][Cl] e do sal K₂HPO₄ para particionar as proteínas do soro de leite, α -lactalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina. Obteve valores de eficiência de extração acima de 87% e notaram que as proteínas migram principalmente para a fase rica em líquido iônico (fase superior). Concluíram que esse SAB's salino com o líquido iônico pode ser considerada uma alternativa promissora para a extração de proteínas de soro de leite.

Ainda sobre a utilização de líquido iônicos, Pignata, Bonomo e Sousa (2014) determinaram diagramas de equilíbrio para sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico [C2min]Cl + Fosfato de Potássio + Água. Os diagramas foram determinados nas temperaturas de 20, 30, 40 e 50 °C e em pH 7,5, 8,0 e 8,5. Constataram que não houve efeito da temperatura sobre a formação da região bifásica para os sistemas estudados. Quanto ao efeito do pH, observaram que o aumento do pH ocasionou um aumento da região bifásica em todas as temperaturas estudadas.

Como o preço de dos líquidos iônicos ainda são relativamente altos, Souza et al. (2014) utilizaram como alternativa a aplicação de líquidos iônicos como adjuvante para controlar a partição de antioxidantes (propil galato e eugenol) em SAB's formados por PEG(1500 e 8000) + fosfato de potássio + Líquido iônico [C_nmim]Cl (n = 2 a 8). Os resultados sugerem que os antioxidantes (propil galato e eugenol) tem uma maior afinidade para a fase mais hidrofóbica (fase rica em PEG) de peso moleculares menores (PEG 1500) em SAB convencional formado por PEG e sais. No entanto, SAB com base em PEG + sal + LI + água proporcionam eficiências de extração melhoradas, especialmente com o [C6mim]Cl para a extração do eugenol, apresentando rendimento

de 99 %. Para o propil galato, a eficiência de extração é completa (100%) e em geral, independente do uso de LI em SAB à base de PEG 1500, sendo o [C8mim]Cl a exceção a este comportamento, pela sua auto-agregação e conseqüente formação de agregados.

Sobre a influência da concentração de polietilenoglicol (PEG) 1500 sobre a partição de ácido láctico no sistema PEG1500, citrato de sódio e água em pH igual a 7, Canobre et al. (2017) utilizaram delineamento composto central rotacional (DCCR) para testar concentrações de PEG no sistema PEG 1500, citrato de sódio e água. Os resultados obtidos mostraram que sistemas formados por 18% PEG e 12% de citrato de sódio e sistemas formados por 24% PEG e 15% citrato de sódio, apresentaram maiores e menores valores de coeficiente de partição respectivamente, sendo os tratamentos mais interessantes para partição do ácido láctico.

Silva et al. (2017) avaliaram a influência da concentração de PEG sobre a partição de ácido propiônico no sistema PEG1500, citrato de sódio e água em pH igual a 7, em três concentrações de PEG 1500 (16,7; 21 e 25,2%*m/m*) e concentração de citrato fixada em 13,5%*m/m*. Os resultados obtidos mostram que nessas condições o ácido propiônico tem muita afinidade com a fase rica em PEG, podendo ser viável uma purificação desse ácido usando sistemas aquosos bifásicos.

Ngome (2019), utilizou SAB para purificação de ácido propiônico obtido de fermentação em sistemas PEG 1500/4000, citrato de sódio e água em pH igual a 7. Ao determinar os coeficientes de partição foram obtidas as melhores condições nos sistemas que possuíam 16,7%*m/m* PEG 1500 e 13,7% *m/m* de citrato e nos sistemas com 24 %*m/m* PEG 4000 e 15%*m/m* de citrato. Este último sistema obteve uma eficiência de 68,15%, evidenciando que SAB's têm potencial para ser aplicados no processo de purificação de ácido propiônico obtido por fermentação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho discorreu sobre a influência da temperatura, do tipo de sal, pH e da massa molar nos dados de equilíbrio de SAB's presentes na literatura e apresentou aplicações desses sistemas.

Observou-se, de uma forma geral, que ocorre um aumento da inclinação da linha de amarração com o aumento da temperatura e que o aumento da temperatura provoca o deslocamento da curva binodal aumentando a região bifásica, o que implica numa menor concentração do sal e do polímero necessárias para a formação dos sistemas aquosos bifásicos. Ou seja, pode ser dito que o aumento da temperatura favorece a formação do SAB.

Foi constatado na literatura o aumento da inclinação das linhas de amarração com o aumento da carga do ânion. Visto também que quanto maior a massa molar dos polímeros, menor a concentração requerida para a separação de fases.

Sobre o pH, a maioria dos estudos concluíram que não houve deslocamento significativo da binodal em relação aos diferentes valores de pH estudados nem influência do pH nas composições das linhas de amarração quando se trata de dados de equilíbrio termodinâmico. Porém vale ressaltar que quando se trata da partição de proteínas, o pH pode afetar a migração dessas biomoléculas.

Sobre a utilização de líquidos iônicos, foi observado que são alternativas para purificação de biomoléculas de valor agregado e também como adjuvante na formação de SAB.

Foi relatado também que a utilização de copolímeros tribloco tem sido aplicado em sistemas que necessitam de extratantes que não são hidrossolúveis e para extração de solutos hidrofóbicos.

A utilização de sistemas compostos por acetronitrila associada à carboidratos, polióis, dextrana e álcool polivinílico foi apresentada como alternativa para extração de vanilina.

Foi apresentada a utilização de SAB's como alternativa para a partição e purificação de ácidos orgânicos.

Portanto, esse trabalho contribuiu para reunir resultados já obtidos e demonstrando o enorme potencial dessa extração líquido- líquido para purificação dos mais diversos compostos de valor agregado

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell and Macromolecules**. 3rd ed. New York: John Wiley, 1986.

ALCÂNTARA, L. A. P. **Otimização do fracionamento das proteínas de soro de leite por operação de extração líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos**. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

ALVES, J. G. L. F. et al. Aqueous two-phases systems of poly(ethylene glycol) and sodium citrate: experimental results and modeling. **Chemical Eng**, New York, v. 53, p.1587- 1594, 2008.

ANDRADE, V. M. de. **Sistemas aquosos bifásicos: determinação de equilíbrio de fase e aplicação para partição de alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

ASENJO, J. A. **Separation Processes in Biotechnology**. 1st ed. New York: Marcell Dekker, 1990.

BAMBERGER, S. et al. Preparation of phase system and measurent of their physicochemical properties. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISCHER, D. Partitioning in aqueous two-phase system. Orlando: **Academic Press**, 1985.

BEIJERINCK, M. W. **Ueber eine eigentümlichkeit der löslichen stärke**. Zentralblatt für Bakteriologie, Natur, v.2, p. 697 – 699, 1896.

CANOBRE, N. G. et al. Partition of l (+) - lactic acid using polyethylene glycol/sodium citrate aqueous two-phase systems. In: Simpósio nacional de bioprocessos, 21., 2017, Aracaju. **Anais [...]**. Aracaju - SE: [s. n.], 2017.

CARDOSO, G. de B. **Desenvolvimento de novos sistemas aquosos bifásicos compostos por acetonitrila para a extração de vanilina**. 2013. 175p. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, 2013.

CARVALHO, C. P. **Estudo do equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água**. 2004. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

CARVALHO, M. M. **Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por poli(etileno glicol) 6000, sulfato de cobre ou sulfato de zinco e água, em função da temperatura**. 2007. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

CARVALHO, R. de Al. **Diagramas de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por PEO 400 + sais inorgânicos + água e estudo da extração de ácido monometilarsônico (MMA) utilizando sistemas aquosos bifásicos.** 2017. 66f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2017.

CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 13, p. 629, 1991.

CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from calotropis procera latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1148-1155, 2010.

COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. **Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido.** 1ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2003.

COULSON, J.M. et al. **Chemical engineering - particle technology and separation processes.** 4th ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1996.

CUNHA, E. V. C. **Equilíbrio líquido-líquido em sistemas aquosos bifásicos água + PEG 8000+ sal: determinação experimental e modelagem termodinâmica.** 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.

CUSACK, R.W.; FREMAUX, P.; GLATZ, D. A fresh look at liquid-liquid extraction. **Chemical Eng**, New York, v. 98, p.66-76, 1991.

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

DA SILVA, L.H.M.; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química nova**, São Paulo, v. 29, p. 1345 - 1351, 2006.

DE LEMOS, L.R. et al. Copper recovery from ore by liquid-liquid extraction using aqueous two-phase system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 237-238, p. 209-214, 2012.

DE LEMOS, L.R. et al. Green separation of copper and zinc using triblock copolymer aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 115, p. 107-113, 2013.

DE LEMOS, L.R. 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**, v. 305, p. 19-24, 2011.

DOMÍNGUES-PÉREZ, M. et al. Extraction of biomolecules using aqueous biphasic systems formed by ionic liquids and aminoacids. **Separation and Purification Technology**, v. 72, p. 85-91, 2010.

FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. da S.; TAMBOURGI, E. B. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/ fosfatos. **Exacta**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2009.

FORCINITI, D.; HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v. 61, p. 243-262, 1991.

FREIRE, M. G. et al. Aqueous biphasic system composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. **Green Chemistry**, v. 13, p. 1536-1545, 2011.

GIRALDO-ZUÑIGA, D.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Coeficiente de partição da α Lactoalbumina e β -Lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos influência da massa molar do polímero. **Ciência y Tecnología Alimentaria**, v. 3, p. 149-155, 2001.

GRABER, T. A. et al. 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**, v.49, p.1661- 1664, 2004.

GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.255-258, 2000.

GÜNDÜZ, U.; TOLGA, A. Optimization of bovine serum albumin sorption and recovery by hydrogels. **J. Chromatography B**. 2004, 807, 13-16.

HARAGUCHI, L.H. et al. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. **Fluid Phase Equilibria**, v. 215, p. 1- 15, 2004.

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

LI, N. et al. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. **Talanta**, v. 152, p. 23–32, 2016.

LOUROS, C. L. S. et al. Extraction of biomolecules using phosphonium-based ionic liquids + K₃PO₄ aqueous biphasic systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1777-1791, 2010.

MAGESTE, A.B. et al. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, ed. 45, p. 7623–7629, 2009.

MCCABE, W. L.; SMITH, J.C.; HARRIOT, P. **Unit operations of chemical engineering**, 5rd ed. New York: McGraw-Hill, 1993.

MICHEL, B. et al. Partição de proteínas de soro de leite em sistemas aquosos bifásicos baseados em líquidos iônicos. **Química nova**, São Paulo, v. 38, n. 9, p. 1148-1152, 2015.

MISHIMA, K. et al. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and dipotassium hydrogenphosphate. **Fluid Phase Equilibria**, v.107, p. 269-276, 1995.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 295-314, 2010.

MONTEIRO FILHO, E. de S. **Determinação experimental e modelagem de equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos formados por polímeros, água e sacarídeos**. 2001. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

MONTEIRO FILHO, E. S. Sistemas Aquosos Bifásicos: Uma Alternativa para Purificação de Biomoléculas e Simulação de Sistemas Líquidos Complexos. **Ciência & Tecnologia**, São Paulo, v. 1, p. 33-41, 2010.

MURUGESAN, T.; PERUMALSAMY, M. Liquid-liquid Equilibria of Poly (ethyleneglycol) 2000 + Sodium Citrate + Water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. **J. Chem Eng Data**, v. 50, p.1392-1395, 2005.

NGOME, M. T. **Aproveitamento de subprodutos da indústria de alimentos para produção de ácido propiônico por fermentação e purificação usando sistemas aquosos bifásicos**. 110 p. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2019

OLIVEIRA, F. C. et al. Ovomuroid partitioning in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, p. 55–60, 2009.

OLIVEIRA, R. M. de. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas**. 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

OOI, C. W. et al. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1083-1087, 2009.

PEI, Y. et al. Partitioning behavior of amino acids in aqueous twophase systems formed by imidazolium ionic liquid and dipotassium hydrogen phosphate. **Journal of Chromatography A**, v.1231, p. 2-7, 2012.

PEREIRA, J.F.B. et al. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. **Green Chemistry**, v. 12, p. 1661-1669, 2010.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, p. 440, 2005.

PIGNATA, M.C.; BONOMO, R.C.F.; SOUSA, R.C.S. Estudo do equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, sal e água. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, n. 20, 2014, Florianópolis. **Resumos**. p. 1 – 8.

REIS, I. A. O. et al. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2453-2461, 2012.

RENGIFO, A.F.C. et al. Phase diagrams, densities and refractive indexes of poly(ethylene oxide) + organic salts + water aqueous two-phase systems: Effect of temperature, anion and molar mass. **Fluid Phase Equilibria**, v. 406, p. 70–76, 2015.

ROBBINS, L. A.; CUSACK, R. W. Liquid-liquid extraction operations. In: PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's chemical engineer's handbook**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1997, cap. 15, p. 1441 – 1443.

RODRIGUES, G.D. et al. Liquid–liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. **Separation and Purification Technology**, v. 62, p. 687–693, 2008.

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

SANTOS, L.H. et al. Selective removal of calcium from sulfate solutions containing magnesium and nickel using aqueous two phase systems (ATPS). **Hydrometallurgy**, v. 156, p. 259–263, 2015.

SARAVANAN, S. et al. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)-poly(acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**, v. 43, ed. 9, p. 905-911, 2008.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. 2000. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.

SÉ, R. A. G.; AZNAR, M. Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + potassium phosphate at four temperatures: Experimental determination and thermodynamic modeling. **J. Chem Eng Data**, v. 47, p. 1401-1405, 2002.

SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibrium in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 273-278, 2000.

SILVA, K. C. R. da et al. Influência da concentração de polietileno glicol sobre a partição de ácido propiônico no sistema PEG 1500/citrato de sódio. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA, 30., 2017, Lavras. **Anais [...]**. Lavras – MG, 2017.

SOUZA, R.L. et al. Extração de antioxidantes utilizando sistemas aquosos bifásicos com líquidos iônicos como adjuvante. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, n. 20, 2014, Florianópolis. **Resumos**. p. 1 - 6.

TISELIUS, A.; PORATH, J.; ALBERTSSON, P. A. Separation and Fractionation of Macromolecules and Particles. **Science**, v. 141, p. 13-20, 1963.

TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P-A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 1036-1043, 1985.

TUBÍO, G. et al. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly (ethylene glycols) of diferente Molecular Weight and Sodium Citrate. **J. Chem. Eng. Data**, v. 50, p. 1392 - 1395, 2005.

VENTURA, S. P. M. et al. Design of ionic liquids for lipase purification. **Journal of Chromatography**, v. 87, p. 2679, 2011.

VICENTE, F.A. et al. Recovery of bromelain from pineapple stem residues using aqueous micellar two-phase systems with ionic liquids as co-surfactants. **Process Biochemistry**, v. 51, ed. 4, p. 528–534, 2016.

VOROS, N.; PROUST, P.; FREDENSLUND, A. Liquid-liquid phase equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. **Fluid Phase Equilib**, v. 90, p. 333-353, 1993.

WANG, B. et al. Sugaring-out: A novel phase separation on extraction system. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 2595-2600, 2008.

WANG, Y. et al. Application of water-miscible alcohol-based aqueous two-phase systems for extraction of dyes. **Separation Science and technology**, v. 46, p. 1283-1288, 2011.

WU, B.; ZHANG, Y.; WANG, H. Phase behavior for ternary system composed of ionic liquid + saccharides + water. **Journal of Physical Chemistry, B.**, v. 112, p. 6426-6429, 2008.

WU, D. et al. Specific cooperative effect for the enantiomeric separation of amino acids using aqueous two-phase systems with task-specific ionic liquids. **Journal of Chromatography A**, v.1395, p. 65–72, 2015.

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

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

ZAFARANI-MOATTAR, M.; SADEGHI, R. Phase Behavior of Aqueous Two-Phase PEG + NaOH System at Different Temperatures. **J. Chem Eng Data**, v. 49, p. 297-300, 2004.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning**, 1st ed., New York: Marcel Dekker, 1995.

ZHENG, Y. et al. Mechanism of gold (III) extraction using a novel ionic liquid-based aqueous two phase system without additional extractants. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 123–127, 2015.