



FERNANDA DE ALMEIDA SAINT'YVES

**PARTIÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS DO TIPO PEG/CITRATO**

**LAVRAS - MG
2020**

FERNANDA DE ALMEIDA SAINT'YVES

**PARTIÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM SISTEMAS
AQUOSOS BIFÁSICOS DO TIPO PEG/CITRATO**

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

Prof. José Guilherme Lembi Ferreira Alves
Orientador

Prof. Luciano Jacob Corrêa
Coorientador

LAVRAS – MG
2020

*Aos meus pais Silvana e Edgar com todo o meu amor,
carinho e gratidão.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus por me proporcionar sabedoria, força de vontade e a possibilidade de poder conquistar mais um sonho.

Aos meus pais Silvana e Edgar, por terem me dado a oportunidade de me tornar quem eu sempre desejei ser, agradeço por serem e fazerem tanto por mim, por acreditarem e apoiarem sempre, por confiarem, se abdicarem e dedicarem, por demonstrarem o mais grandioso sentimento em todos os mínimos gestos.

Aos meus irmãos, Giovanna, Madjara, Carla, Max e Matherson, por fazerem parte da minha história, por todo amor e carinho.

Ao Deleon, por estar sempre ao meu lado em qualquer circunstância, por me amar, compreender, incentivar e ser o melhor companheiro que eu poderia ter.

À todos meus familiares pela torcida e apoio durante todos estes anos.

Ao meu orientador, José Guilherme Lembi Ferreira, pela orientação, incentivo e apoio. Pela confiança, pelas contribuições e sugestões, por ser sempre presente e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório. É um orgulho ter desenvolvido esta dissertação sob sua orientação.

Ao meu coorientador, Luciano Jacob Corrêa, pela disponibilidade em me ajudar, por todos os conselhos, incentivo e apoio.

À minha coordenadora de curso, Zuy Magriotis, pelo apoio e incentivo durante toda a graduação.

À todos os professores da Engenharia Química que dedicaram seu tempo e sua sabedoria em minha formação acadêmica.

Aos Professores, técnicos e demais funcionários da UFLA, pela receptividade e atenção.

Aos amigos: Thayná, Wesllen, Bianca e Fernanda, pela amizade, companheirismo, por terem feito parte desta luta e terem ficado ao meu lado todos os dias.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB): Cristiano, Moisés, Dina, professora Olga e Taináh, pelo acolhimento e por todas as contribuições.

Aos meus amigos de Varginha, principalmente Rachel, Yasmin, Gislene, que mesmo distantes se demonstraram tão presentes.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade e auxílio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

*“Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista.”
(Aldo Novak)*

RESUMO

O ácido propiônico é um dos principais ácidos carboxílicos produzidos industrialmente e possui diversas aplicações nas indústrias químicas, alimentícias, farmacêuticas e na agricultura. A produção convencional do ácido propiônico é conduzida por síntese química utilizando matérias-primas obtidas do petróleo, mas alternativas envolvendo recursos renováveis e usando processos fermentativos vêm sendo exploradas dada a preocupação com o esgotamento das reservas de petróleo. Para a recuperação e purificação de compostos biológicos, uma das alternativas de operações de separação é a extração líquido-líquido (ELL). Para produtos biológicos, um tipo de ELL adequado, no qual ambas as fases são ricas em água, são os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB). O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito das concentrações de polietilenoglicol (PEG) e citrato de sódio na partição de ácido propiônico no sistema aquoso bifásico do tipo PEG/citrato de sódio/água. Para isso, foi conduzido um delineamento composto central rotacional (DCCR) com 11 tratamentos, com duas variáveis independentes: concentração de PEG 1500 e concentração de citrato de sódio. A acidez total e o coeficiente de partição de cada amostra foram determinados e a partir destes, foram calculados os rendimentos de extração de ácido propiônico. Os resultados obtidos foram analisados, utilizando o programa Statistica 8.0, considerando-se um nível de significância de 5%. A única variável que exerceu efeito estatisticamente significativo foi a concentração do citrato de sódio, que apresentou efeito negativo sobre o coeficiente de partição. Os melhores sistemas para a partição de ácido propiônico foram os com menores valores de coeficiente de partição e com alto valor de rendimento, que são os tratamentos 6 e 4, no qual são constituído por 25,2% PEG 1500 e 13,5% de citrato de sódio, e 24% PEG 1500 e 15% de citrato de sódio, respectivamente.

Palavras-chave: Sistemas Aquosos Bifásicos. Extração Líquido-Líquido. Ácido Propiônico.

ABSTRACT

Propionic acid is one of the main industrially produced carboxylic acids and has several applications in the chemical, food, pharmaceutical and agricultural industries. The production of propionic acid is driven mainly by chemical synthesis using raw materials obtained from oil, but alternatives using renewable resources and using fermentative processes have been explored due to the concern with the depletion of oil reserves. For the recovery and purification of biological compounds, one of the alternatives for unitary operations is liquid-liquid extraction (ELL). For biological products, a suitable type of ELL, in which both phases are rich in water, are the Biphasic Aqueous Systems (SAB). The objective of this work was to evaluate the effect of the concentrations of polyethylene glycol (PEG) and sodium citrate on the partition of propionic acid in the two-phase aqueous system of the type PEG/sodium citrate/water. For this, a central rotational composite design (DCCR) was conducted with 11 treatments, with two independent variables: PEG 1500 concentration and sodium citrate concentration. The total acidity and partition coefficient of each sample were determined and from these, the extraction yields of propionic acid were calculated and the results obtained were analyzed using the Statistica 8.0 program, considering a significance level of 5%. The only variable that had a statistically significant effect was the concentration of sodium citrate, which had a negative effect on the partition coefficient. The best systems for the partition of propionic acid were those with the lowest values for partition coefficient and with a high yield value, which are treatments 6 and 4, which consist of 25.2% PEG 1500 and 13.5% sodium citrate, and 24% PEG 1500 and 15% sodium citrate, respectively.

Keywords: Biphasic Aqueous Systems. Liquid-Liquid Extraction. Propionic Acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido propiônico.....	13
Figura 2 - Consumo mundial de ácido propiônico em 2016.....	15
Figura 3 - Diagrama de fases representado em coordenadas retangulares.....	18
Figura 4 - Soluções estoques de PEG 1500 (60% m/m) e citrato de sódio (30% m/m).....	30
Figura 5 - Aparelho pHmêtro utilizado para ajustar pH das soluções.....	31
Figura 6 - Incubadora B.O.D.....	32
Figura 7 - Tubos retirados da B.O.D com as fases em equilíbrio termodinâmico.....	32
Figura 8 - Amostras colocadas em microtubos.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	17
Tabela 2 - Aplicação de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	23
Tabela 3 - Matriz do DCCR para 2 variáveis independentes em valores codificadas	30
Tabela 4 - Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água.....	30
Tabela 5 - Resultados para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água.....	36
Tabela 6- Resultados da regressão para coeficiente de partição do ácido propiônico	37
Tabela 7- Análise de variância dos resultados para coeficiente de partição do ácido propiônico (K_p) para o sistema PEG 1500/citrato de sódio. ($F_{tab, 5\%, 5,5} = 5,05$).....	38
Tabela 8 - Resultados da análise estatística para a relação de fases (R_f) no sistema PEG 1500/citrato de sódio.....	39
Tabela 9 - Resultados da análise estatística de efeitos sobre o rendimento no sistema PEG 1500/citrato de sódio.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Objetivos.....	12
1.1.1	Objetivo geral.....	12
1.1.2	Objetivos específicos.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Ácido Propiônico.....	13
2.2	Sistemas Aquosos Bifásicos.....	15
2.2.1	Tipos de Sistemas.....	16
2.2.2	Componentes dos Sistemas Aquosos Bifásicos.....	17
2.2.3	Diagrama de Fases.....	18
2.2.4	Coefficiente de Partição.....	20
2.3	Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB.....	21
2.3.1	Efeito da Temperatura.....	21
2.3.2	Efeito do pH.....	21
2.3.3	Efeito da massa molar.....	22
2.4	Aplicações de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	23
2.5	Métodos de Recuperação e Purificação de Ácido Propiônico.....	25
2.6	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Método.....	29
3.2	Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos.....	30
3.3	Determinação dos Coeficientes de Partição.....	34
3.4	Determinação do Rendimento de Purificação do Ácido Propiônico.....	34
3.5	Métodos Analíticos.....	35
3.5.1	pH.....	35
3.5.2	Acidez titulável.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	Coefficiente de Partição Médio.....	36
4.2	Relação de Fases.....	39
4.3	Rendimento de Purificação do Ácido Propiônico.....	40

5	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O ácido propiônico é um dos principais ácidos carboxílicos e possui diversas funções em indústrias químicas, alimentícias, farmacêuticas e na agricultura. Este atua como conservante e principalmente como inibidor fúngico em alimentos. É empregado na fabricação de plásticos, gomas químicas, corantes, agentes emulsionantes, monômeros, tintas e soluções de galvanoplastia. Na agricultura é utilizado como herbicida, já na área farmacêutica em produção de perfumes, bioaromas, medicamentos antiartríticos e anti-inflamatórios não esteróides (CALDERÓN, 2012; JESUS, 2016).

A produção do ácido propiônico é conduzida especialmente por síntese química e as matérias-primas são obtidas principalmente do petróleo. Mas, alternativas utilizando recursos renováveis e usando processos fermentativos vêm sendo exploradas dada a preocupação com o esgotamento das reservas de petróleo e com o desenvolvimento sustentável, além da demanda por ácidos naturais, produzidos naturalmente (YANKOV et al., 2004).

Várias tecnologias convencionais de purificação têm sido amplamente empregadas, como a precipitação com hidróxido de cálcio. Entretanto, o processo utilizando matérias-primas não-renováveis (petróleo) gera resíduos poluentes ao meio ambiente e não é sustentável.

Dessa forma, para a recuperação e purificação de compostos biológicos, como proteínas, enzimas, ácidos, vírus, anticorpos e organelas celulares, uma das alternativas de operações unitárias é a extração líquido-líquido (ELL) (SILVA, 2006).

Uma opção de extração líquido-líquido, adequada para produtos biológicos, são os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's). Estes sistemas foram originalmente propostos por Albertson em 1958 e são estudados há mais de 50 anos (WANG et al., 2010).

Os SAB's formam-se espontaneamente e são compostos por três ou mais espécies químicas, que em determinadas faixas de composição, pH e temperatura separam-se em duas fases distintas, no qual o componente majoritário é a água (CARVALHO, 2017). Estas fases aquosas imiscíveis coexistem em equilíbrio pela adição de sólidos solúveis em água, que podem ser dois polímeros, um polímero e um sal, ou dois sais (ASENJO et al., 2012).

Em relação às técnicas tradicionais, os SAB's são vantajosos, pois possuem elevada biocompatibilidade com os solutos (minimizando a degradação das moléculas), baixo custo, alto rendimento, rápida transferência de massa, além de permitir o fácil aumento de escala e a possibilidade de reciclar os reagentes que formam as fases (OLIVEIRA, 2006).

Desenvolver processos de extração mais eficazes, ambientalmente seguros e

economicamente viáveis aplicados para a purificação e separação de diferentes materiais como, produtos biológicos, é uma questão relevante e de interesse industrial. Neste sentido, o presente trabalho visou estudar a partição do ácido propiônico em Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) do tipo PEG/sal e determinar os efeitos das concentrações de polietilenoglicol e citrato de sódio na partição do ácido propiônico nesses sistemas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar a partição do ácido propiônico em Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo PEG/sal.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a relação de fases, coeficientes de partição e rendimento de extração do ácido propiônico para cada ponto de mistura do sistema PEG1500/citrato de sódio/água, selecionando as melhores condições de partição.
- Avaliar o efeito da concentração de polietilenoglicol (PEG) 1500 e do citrato de sódio sobre a partição de ácido propiônico no sistema PEG1500/citrato de sódio/água.

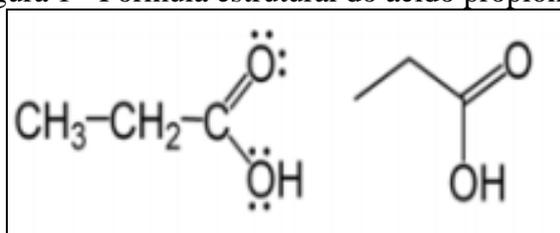
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácido Propiônico

O ácido propiônico, segundo Barbosa (2011), é um ácido carboxílico saturado simples de corrente aberta encontrado na natureza. É um composto orgânico constituído por três átomos de carbono, apresenta fórmula molecular ($C_3H_6O_2$) e possui massa molar de 74 g/mol.

Suas propriedades são intermediárias como: temperatura de fusão ($-21\text{ }^\circ\text{C}$), de ebulição ($141\text{ }^\circ\text{C}$) e viscosidade, comparadas com as dos ácidos carboxílicos de cadeias menores, como por exemplo, os ácidos fórmicos e acéticos, e os ácidos carboxílicos maiores (COÊLHO, 2011).

Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido propiônico.



Fonte: Cêelho (2011).

Seu nome vem da palavra grega *pro* (o primeiro) e *pion* (gordura). Esse ácido é conhecido na nomenclatura usual como ácido propílico ou ácido propiônico e na nomenclatura *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como ácido propanóico (NGOME, 2013).

Em estado puro, o ácido propiônico, é um líquido incolor, corrosivo, capaz de inibir o crescimento de fungos e de algumas bactérias e é o responsável pelo cheiro característico do queijo suíço (SNYDER, 1995).

Segundo Jay (2000), o ácido propiônico possui diversas funções, como por exemplo, de conservantes de pães, bolos, queijos e outros alimentos principalmente como inibidor de mofo. Sua ação inibidora tende a ser altamente específica contra fungos.

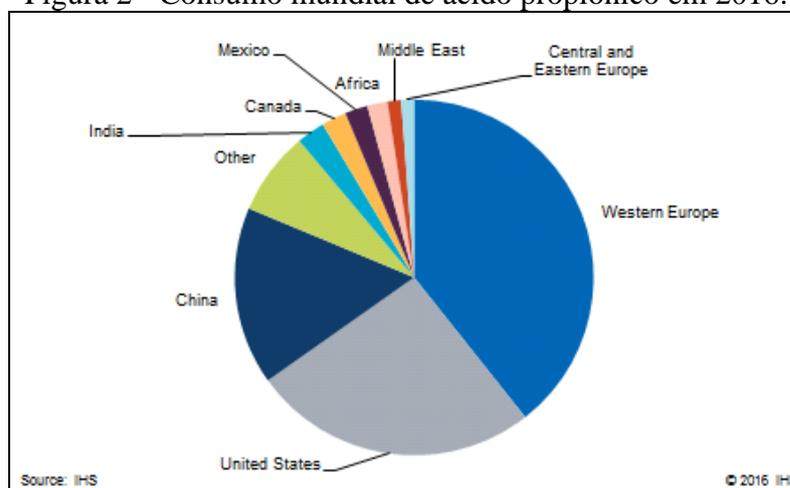
Além disso, na indústria química o ácido propiônico é utilizado em plásticos, gomas químicas, corantes, flavorizantes artificiais, em produtos de perfumaria, agentes emulsionantes, monômeros, resinas, tintas e soluções de galvanoplastia. Na agricultura é utilizado como herbicida, já na área farmacêutica em produção de medicamentos antiartríticos e anti-inflamatórios não esteróides (JESUS, 2016).

Outra importância de ácidos orgânicos, como o ácido propiônico e láctico, são para lavar e higienizar as carcaças de animais após o abate, com a finalidade de diminuir o transporte de agentes patogênicos e elevar a vida útil do produto. O ácido propiônico é considerado quimicamente como um ácido fraco ($pK_a=4,85$) tendo a capacidade de inibir o crescimento de diversos microorganismos. Essa inibição é causada pela dissociação da molécula do ácido no citoplasma da célula, liberando um próton e diminuindo o pH (CALDERÓN, 2012).

Segundo estatísticas apresentadas pela IHS Chemical em janeiro de 2016, a preservação de alimentos para animais, de grãos e produção de propionatos de cálcio e sódio, representam quase 80% do consumo mundial de ácido propiônico em 2016, antes 78,5% em 2012. Cerca de 51% do consumo global de ácido propiônico é para uso em alimentos para animais e preservação de grãos, enquanto quase 29% são utilizados na produção de propionatos de cálcio e sódio, ambos utilizados na indústria de alimentos para animais. Perspectivas de crescimento mundial para o ácido propiônico e seus sais na alimentação/preservação e alimentos de origem animal são significativos.

A Figura 2 mostra o consumo mundial de ácido propiônico no ano de 2016:

Figura 2 - Consumo mundial de ácido propiônico em 2016.



Fonte: IHS Chemical (2016).

A Europa Ocidental responde por cerca de 40% do consumo mundial de ácido propiônico em 2016, seguida pela América do Norte com cerca de 30% e Ásia com cerca de 23%; nessas regiões ocorre um grande volume de alimentos para animais, preservação de grãos e propionatos de cálcio/sódio. O crescimento do consumo entre 2016 e 2021 será mais alto nos mercados em desenvolvimento da Ásia, Oriente Médio, África e América Central e do Sul (IHS CHEMICAL, 2016).

O ácido propiônico é produzido industrialmente por síntese química e as principais vias são: pelo processo Rippe que utiliza etileno, dióxido de carbono e vapor; pela oxidação direta de hidrocarbonetos e pela oxidação do propanol e do propanal (CALDERÓN, 2012).

O ácido propiônico pode ser também produzido por bactérias propiônicas, via rota dos ácidos dicarboxílicos com ácidos acéticos e succínico como subprodutos. Entretanto, o rendimento e produtividade baixos devido à inibição do ácido propiônico no crescimento celular e na síntese de ácido propiônico ainda são problemas para produção por fermentação. Esse baixo rendimento ressalta a importância de desenvolver duas estratégias: fermentação extrativa propiônica e produção de ácido propiônico com bactérias tolerantes ao ácido propiônico obtidas por meio de adaptação evolutiva (NGOME, 2013).

2.2 Sistemas Aquosos Bifásicos

A realização de extração líquido-líquido de forma convencional utilizando-se solventes orgânicos e soluções aquosas normalmente não é apropriada para separações biológicas, como de células e proteínas, devido à baixa estabilidade e solubilidade destas em solventes orgânicos. Uma alternativa à extração líquido-líquido tradicional, compatível na recuperação e purificação de compostos biológicos, é a partição em Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's).

A utilização de SAB's oferece vantagens, como a isenção de componentes tóxicos e inflamáveis, baixo custo, além de possuir curto tempo de processamento, fácil separação de materiais particulados, fácil expansão de escala, e em alguns casos são biodegradáveis e recicláveis (ZHANG, et al., 2014).

Mas, a principal característica que confere aos SAB's larga utilização na partição de biomateriais é a baixa tensão interfacial, quando comparada àquela existente entre uma fase aquosa e outra não aquosa. Isto se deve a água ser o componente majoritário do sistema aquoso bifásico. A água está em maior quantidade nas três regiões do SAB (fase superior, interface e fase inferior). Deste modo, a composição em todas estas regiões é muito parecida, resultando em pequena diferença entre a energia livre de Gibbs das mesmas, e consequentemente pequeno valor de tensão interfacial (MARTINS et al., 2008).

A diminuição da energia livre de Gibbs no sistema, constituído por diferentes polímeros, favorece a separação de fases, pois a interação entre as moléculas destes é de caráter repulsivo, estando assim o sistema em um estado energeticamente favorável quando as moléculas dos mesmos encontram-se separadas (ALBERTSSON, 1960).

Sistemas Aquosos Bifásicos são misturas ternárias compostas predominantemente por água (70 a 90% das fases), que sob certas condições termodinâmicas de composição, temperatura e pressão, apresentam duas fases diferentes em equilíbrio termodinâmico. As fases são imiscíveis, sendo a superior composta principalmente por polímero e a fase inferior composta predominantemente por eletrólito. Os SAB's podem ser formados pela mistura de soluções de dois polímeros quimicamente distintos, um polímero e um sal, e atualmente existem outras alternativas de sistemas utilizando-se surfactantes, compostos micelares ou líquidos iônicos. Estes componentes são misturados acima das condições termodinâmicas críticas acima de certas concentrações (LLADOSA, et al., 2012).

Segundo Albertsson (1960), a extração líquido-líquido em misturas macromoleculares foi manifestada pela primeira vez em 1896 por Beijerink. Ele observou que quando se misturava soluções aquosas de ágar e gelatina, por exemplo, aparecia uma mistura turva que separava em duas camadas líquidas, no qual a predominância na fase superior era a gelatina e na inferior o ágar. Em 1947, Dobry e Boyer Kawenoki estudaram grande número de combinação de pares de polímeros e observaram que em alguns casos quando dois polímeros se reúnem, uma das fases se torna rica em polímeros, enquanto a outra fase consiste principalmente de solvente. Mas, somente em 1958, que Albertsson desenvolveu experimentos utilizando soluções aquosas de polietilenoglicol e dextrana em processos de biosseparação, sendo o pioneiro na utilização dos chamados Sistemas Aquosos Bifásicos.

2.2.1 Tipos de Sistemas

Há uma grande variedade de polímeros hidrófilos, naturais ou sintéticos, capazes de formar fases quando misturados com um sal ou outro polímero. Os Sistemas Aquosos Bifásicos mais utilizados são formados por PEG + Dextrana ou PEG + sais, pois estes possuem como vantagens a disponibilidade em grande quantidade no mercado e também por serem atóxicos. Porém, para uso em escala industrial o custo da Dextrana é muito elevado. Por isso, o sistema PEG + sal tem sido utilizado para extração de enzimas em larga escala, principalmente por possuir aumento na seletividade e redução da viscosidade.

Simultaneamente estes sistemas possuem restrições como a desnaturação de biomoléculas, principalmente quando altas concentrações de sal são empregadas. Para solucionar estas limitações, novos substitutos estão sendo utilizados no lugar de Dex ou do sal, por exemplo, o hidroxipropilamido (HPS) + PEG, maltodextrina (MD) + PEG, goma de castanheira (CTG) + PEG. Outros sistemas, estudados atualmente, são compostos por PPG ou

copolímero tribloco de PEG – PPG + água + sacarídeo de baixa massa molar como glicose e maltose. Estes SAB's são empregadas principalmente na separação de determinados componentes que não toleram a presença de sais, além disso, observou-se que o aumento da região bifásica nestes sistemas é causado pelo aumento da massa molar (ZHANG, et al., 2014).

Na Tabela 1 são apresentados alguns Sistemas Aquosos Bifásicos típicos.

Tabela 1 – Exemplos de Sistemas Aquosos Bifásicos.

Polímero	Polímero
Polipropilenoglicol	Polietilenoglicol (PEG) Dextrana (Dx) Polivinil álcool (PVA) Maltodextrina (MD) Dextrana (Dx) Ficoll
Polietilenoglicol	Hidroxipropil-amido (HPS) Polivinil alcohol (PVA) Polivinil pirrolidona (PVP) Maltodextrina (MD)
Polímero	Componente de baixa massa molar
Polietileno glicol e copolímeros	Sais inorgânicos: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$, Na_2HPO_4 , K_2CO_3 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4 , Na_3Cit , Glicose, maltose
Polietileno glicol Polipropileno glicol	Sais inorgânicos: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 Glicerol

Fonte: Zaslavsky (1995).

2.2.2 Componentes dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Nesse trabalho usou-se o sistema aquoso bifásico do tipo PEG/citrato de sódio e água, que tem sido muito utilizado para aplicações de purificação, pelo baixo custo dos componentes (ALVES et al., 2008).

- Polietilenoglicol (PEG): O polietilenoglicol, $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, é um polímero não iônico, sintético, hidrofílico usado em muitas aplicações bioquímicas e industriais como de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes.

Devido ao seu caráter não tóxico, esse produto químico pode também ser empregado em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. É utilizado também na separação de macromoléculas biológicas por meio da extração líquido-líquido e da precipitação. Devido a todas estas aplicações, o PEG se tornou o polímero mais amplamente utilizado em soluções aquosas de moléculas biológicas. Além disso, este pode ser considerado o melhor agente precipitante na produção de cristais de proteínas, etapa fundamental na determinação da

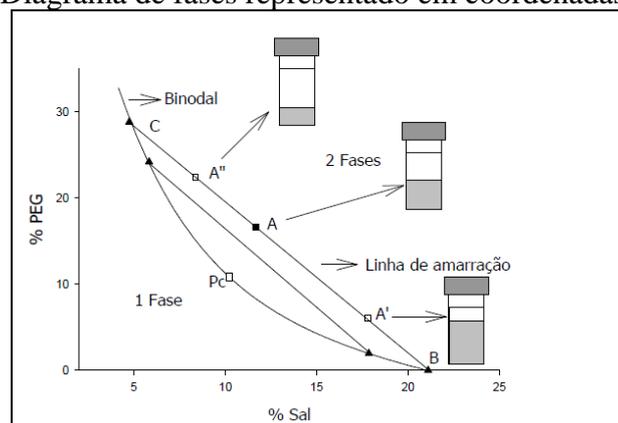
estrutura molecular das mesmas (ANNUNZIATA et al., 2002).

- **Citrato de Sódio:** O citrato de sódio é um sal de sódio, com fórmula química $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, produzido a partir do ácido cítrico por neutralização total com uma fonte de sódio de alta pureza. Tem natureza estabilizante ou emulsificante, favorece e mantém as características físicas das emulsões e suspensões. À temperatura ambiente se apresenta como um sólido branco e inodoro. Possui densidade de $1,76 \text{ g.cm}^{-3}$ e um valor de solubilidade, em $25 \text{ }^\circ\text{C}$, igual a 425 g.L^{-1} . É utilizado na indústria alimentícia, como sequestrante e anticoagulante de queijos, na indústria farmacêutica como coagulante de sangue, em soluções de glicose, em fotografias, entre outros (ROSSETTI, 2006).

2.2.3 Diagrama de Fases

O diagrama de equilíbrio ou diagrama de fases é uma representação gráfica dos dados de equilíbrio das fases, ferramenta essencial para aplicação de SAB's em estudos de partição de distintos analitos como metais, corantes, biomoléculas e surfactantes. Este representa graficamente as composições dos constituintes do sistema de cada uma das fases dos SAB's, podendo ser de forma triangular ou retangular (gráfico cartesiano), sob temperatura e pressão constantes. Em SAB's são comumente utilizados diagrama de fases em coordenadas retangulares, como demonstrado na Figura 3 (CARVALHO, 2017).

Figura 3 - Diagrama de fases representado em coordenadas retangulares.



Fonte: Carvalho (2017).

A curva que divide a região em duas fases é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio (curva B-Pc-C), a partir dela pode-se verificar em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo. Na região acima da curva binodal há formação de duas fases e abaixo dela a mistura é totalmente miscível. Os componentes

presentes em maior quantidade na fase inferior são representados no eixo das abscissas e os presentes em maior quantidade na fase superior são demonstrados nas ordenadas. A quantidade de água, terceiro componente, é calculada por diferença. A posição da binodal varia de acordo com a natureza química do sal, o tipo e a massa molar do polímero, a temperatura e o pH do meio. Os diagramas contêm também as linhas são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração (reta B-C), estas ligam pontos no diagrama e representam a composição da fase superior e da fase inferior, quando estas estão em equilíbrio termodinâmico. Nestes sistemas, a composição total da mistura dos componentes é representada pelo ponto de mistura (A). Qualquer ponto global que esteja em uma mesma linha de amarração, como por exemplo, os pontos A, A', A'', fornecerão fases que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.) e as propriedades extensivas diferentes (massa, volume, etc.). Ao longo de uma linha de amarração em direção à parte superior do diagrama, obtêm-se maiores volumes de fase superior e em direção à parte inferior do diagrama, obtêm-se maiores volumes de fase inferior (CARVALHO, 2017).

A partir do comprimento da linha de amarração (CLA) é possível obter um importante parâmetro termodinâmico, frequentemente utilizado para medir a diferença das propriedades intensivas entre as fases em equilíbrio e está diretamente relacionado ao coeficiente de partição (K_p) de determinado material. Este parâmetro é calculado a partir das diferenças nas concentrações dos componentes em cada fase, como demonstrado na Equação 1 (DA SILVA et al., 2006).

$$CLA = (C_{pol}^S - C_{pol}^I)^{0,5} + (C_{sal}^S - C_{sal}^I)^{0,5} \quad (1)$$

em que C_{pol}^S e C_{pol}^I são as concentrações de polímero (% (m/m)) e C_{sal}^S e C_{sal}^I são as concentrações do sal (% (m/m)) nas fases superior e inferior, respectivamente. Quanto maior o valor do CLA, maior é a diferença de composição entre as fases, elevando, conseqüentemente, a eficiência na extração e/ou partição do soluto de interesse. Porém, quanto menor o valor do CLA, menores são as quantias necessárias de polímero e sal para formação de um SAB, o que se torna vantajoso no ponto de vista econômico e de aplicação (CARVALHO, 2017).

Com a redução sucessiva do comprimento das linhas de amarração, é alcançado no diagrama de fases o ponto crítico (P_C). Neste ponto as duas fases apresentam teoricamente as

mesmas propriedades termodinâmicas intensivas, composição e volume, e podem fornecer coeficiente de partição igual a 1. Porém, próximo deste ponto, pequenas alterações na composição do sistema provocam mudanças extremas, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

Outra característica importante em um diagrama de equilíbrio, é a inclinação da linha de amarração (ILA). Esta permite inferir o efeito das propriedades físico-químicas, como temperatura e massa molar, na composição do sistema. Seu valor expressa a proporção de compostos a serem usados na formação de duas fases e pode ser calculado conforme demonstrado pela Equação 2 (CARVALHO, 2017).

$$ILA = \frac{C_{pol}^{FS} - C_{pol}^{FI}}{C_{sal}^{FS} - C_{sal}^{FI}} \quad (2)$$

Onde, C_{pol} e C_{sal} são as concentrações do polímero e sal, e os sobrescritos FS e FI representam a fase superior e fase inferior, respectivamente.

2.2.4 Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição (K_p) é um parâmetro termodinâmico que indica o sentido preferencial de partição do analito entre as fases do sistema. Este é definido como a razão da atividade do soluto da fase superior pela atividade do soluto na fase inferior. Porém, em estudos relacionados com partição, usualmente emprega-se o analito em pequenas concentrações e nesses casos considera-se que o soluto esteja infinitamente diluído. O coeficiente de atividade sob essa condição, empregado para corrigir o valor da concentração, tenderá a 1 e o valor da atividade será aproximado ao da concentração (DE BRITO, 2007).

A distribuição distinta da biopartícula entre as duas fases é resultante das interações entre o soluto e os demais componentes, como polímeros, água e/ou sais inorgânicos, presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio. O valor de K_p é influenciado por diversas propriedades físico-químicas do sistema e do polímero, depende das características da biomolécula como: tamanho, conformação, composição, presença de carga elétrica e hidrofobicidade. Além disto, outras propriedades também contribuem nesta distribuição, por exemplo, a natureza química dos componentes formadores dos SAB's, massa molar, concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam

interagir especificamente com sítios da proteína, pH e temperatura (SILVA, 2009)

1

2.3 Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB

2.3.1 Efeito da Temperatura

Segundo Maharjan et al. (2008), a temperatura é a propriedade mais estudada em sistemas poliméricos responsivos, sendo esta um importante fator em relação a partição dos biocompostos. Para sistemas de fases distintas e dependendo do polímero utilizado, o efeito da temperatura na partição do biocomposto modifica, como por exemplo, o particionamento de proteína no sistema PEG- poli (ácido acrílico), no qual se percebe a diminuição do coeficiente de partição e do rendimento de extração com o aumento da temperatura.

A percepção da influência da temperatura sobre a partição de biomoléculas ocorre de forma indireta e pode levar a mudança na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros, alterando a forma da curva binoidal no diagrama de fases. Além disso, é um importante fator em relação à solubilidade de um polímero. A alteração da temperatura possui maior influência em sistemas cuja composição se aproxima do ponto crítico, devido à instabilidade inerente nesta região. Com o aumento da temperatura, em SAB's PEG + sal há o aumento na inclinação das linhas de amarração, já com a diminuição desta, cria-se uma tendência de deslocamento da curva binoidal para regiões mais concentradas de PEG e sal (LUCAS et al., 2001).

2.3.2 Efeito do pH

O pH é uma propriedade que altera as cargas da superfície dos biocompostos e conseqüentemente o seu coeficiente de partição, como por exemplo, a desnaturação da proteína devido à redução do pH. Esta diminuição do pH desloca a curva de equilíbrio para a direita e aumenta as concentrações necessárias de polímero e sal para a formação de duas fases líquidas e diminui o coeficiente de partição (DA SILVA et al., 2006).

Os polímeros que respondem a variação de pH são nomeados polieletrólitos, ou seja, são macromoléculas que quando dissolvidas em meio aquoso ou solvente ionizante, se ionizam gerando íons. Estes experimentam grandes reajustes nas interações polímero-polímero e polímero-solvente, mesmo em pequenas mudanças de pH do meio. Em virtude da repulsão eletrostática entre as cargas de mesmo sinal presentes nas cadeias poliméricas, a

macromolécula se expande, mas se o solvente não permitir a ionização, a cadeia solúvel permanece em estado compacto, e estas moléculas não ionizadas se forem hidrofóbicas formam glóbulos e precipitam. Estes polímeros são divididos em poliácidos e polibases, podendo doar e aceitar prótons.

Os poliácidos possuem grupos ácidos nas suas cadeias poliméricas que são desprotonados quando o pH fica acima do pK_a , ou seja, em soluções básicas. Os hidrogênios ácidos gerados combinam com a hidroxila do meio, formando moléculas de água. A densidade de cargas do mesmo sinal dentro da rede polimérica é aumentada, assim como o aumento da concentração de cátions no hidrogel, dando origem à pressão osmótica e promovendo entrada de água no interior da rede polimérica. Como consequência, aumenta-se a interação entre polímero e solvente. Os grupos responsivos aceitam prótons em pH baixos e os libera em pH alto. Portanto, são transformados em polieletrólitos a pH alto com forças de repulsão eletrostática entre as cadeias moleculares dando impulso e governando a precipitação e solubilização destas cadeias moleculares.

Já as polibases, possuem em suas estruturas grupos amina em suas cadeias laterais que são protonados em valores de pH inferiores ao pK_a , e passam por um processo de precipitação em pH superiores devido à desprotonação dos grupos amino. Estes grupos ganham prótons sob condição ácida e os liberam sob condição básica (LUCAS et al., 2001).

2.3.3 Efeito da massa molar

A massa molar do polímero exerce influência sobre a partição, alterando o equilíbrio e o número de interações entre o polímero e o biocomposto. Normalmente, o aumento da cadeia polimérica, que enriquece uma das fases, causará a emigração do biocomposto para a outra fase, reduzindo o coeficiente de partição. Este aumento provoca alterações na entropia configuracional e na hidrofobicidade (quanto menor a massa molar do polímero menor o seu caráter hidrofóbico) da fase rica do polímero, diminuindo assim a contribuição entrópica para a minimização da energia de Gibbs. Porém, este efeito diminui com o aumento da cadeia polimérica. O efeito da alteração da massa molar de um polímero é dependente da massa molar do biocomposto a ser separado. Por exemplo, proteínas com grande massa molar são mais influenciadas por mudanças da massa molar do polímero do que as proteínas de baixa massa molar (ZHANG et al., 2014).

Quanto maior a massa molar do polímero formador do SAB menor será a concentração de sal, requerida para que ocorra a separação de fases. Este comportamento

é observado tanto para sistemas polímero-polímero-água quanto para sistemas polímero-sal-água. Através da reação de equilíbrio, esperava-se que a adição de PEG de maior massa molar resultasse no favorecimento da interação sal-PEG e conseqüentemente aumento da quantidade de sal a ser adicionada ao sistema para que ocorra a separação de fases.

Por outro lado, o aumento da cadeia do polietilenoglicol diminui o grau de liberdade da molécula, diminuindo a entropia configuracional e, conseqüentemente, a entropia de mistura do sistema. Simultaneamente, o aumento do tamanho da molécula do polímero ou a concentração da solução provocam o enovelamento da cadeia da macromolécula, aumentando a entropia conformacional. As ligações carbono-carbono no polímero passam da forma TRANS para a CIS (mais energética) aumentando a sua entropia. Este processo de enovelamento resulta na diminuição do número de sítios disponíveis às interações, o que contribui para que a cadeia do polímero sature com menor quantidade de sal (CAMPOS, 1997).

2.4 Aplicações de Sistemas Aquosos Bifásicos

Os sistemas aquosos bifásicos possuem diversas aplicações, sendo a principal delas a separação e purificação de diferentes biomoléculas, como as enzimas (PORTO et al., 2011), os aminoácidos (SALABAT et al., 2011), antibióticos como o ciprofloxacino 28 (MOKHTARANI et al., 2008) e antocianinas (WU et al., 2011), compostos de aroma como a vanilina (CLAUDIO et al., 2010), antioxidantes (REIS et al., 2012), alcalóides (PASSOS et al., 2013) e proteínas de soro lácteo e insulina suína (Alves et al., 2000).

Na Tabela 2, demonstra alguns sistemas mais adequados para separação e recuperação de certas biomoléculas com potencial de aplicação a nível industrial.

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- Hidoxipropil-amido (HPS)
Lisina, glicina	PEG- Dextrana

Fonte: Coimbra et al. (2003).

O maior uso dos Sistemas Aquosos Bifásicos tem sido na etapa de concentração e no processo de purificação de proteínas. Além disso, outros segmentos aplicam esta técnica de separação, como por exemplo, em tratamento de efluentes industriais, na indústria de papel e celulose, em compostos aromáticos de óleo cru. São também utilizados na remoção de íons metálicos e poluentes orgânicos do meio ambiente. Os processos utilizando SAB's em etapas de recuperação primária de produtos de interesse biotecnológico são também uma importante opção para novos bioprocessos associados à indústria farmacêutica (GRABER et al., 2000).

Devido à necessidade de se remover arsênio (As) do meio ambiente, Carvalho et al. (2017) estudou a utilização de Sistemas Aquosos Bifásicos na extração do ácido monometilarsônico (MMA). Foram obtidos dados de equilíbrio líquido-líquido para SAB compostos por óxido de polietileno (PEO 400) + K_2CO_3 + água, PEO 400 + Na_2CO_3 + água e PEO 400 + KSCN + água a 10, 25 e 40 °C. Para os sistemas PEO 400 + sais de carbonato + água o aumento da temperatura promoveu um aumento da região bifásica, demonstrando que o processo de separação de fases para estes dois sistemas é entropicamente dirigido, sendo este, um comportamento comum na formação de SAB.

Diferentemente dos SAB's compostos por polímero e sal, o sistema composto por KSCN apresentou o sal como componente majoritário do sistema e ambas as fases também enriquecidas neste componente. Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que foi possível atingir 100% de extração de MMA utilizando SAB, sendo o sistema formado por PEO 400 + Na_2SO_4 + H_2O em pH 1 o mais eficiente para a extração do metal.

Dentre os diferentes estudos recentes, Borges et al. (2018) obteve como objetivo de seu trabalho desenvolver uma metodologia eficiente para a extração de íons metálicos de cobre utilizando Sistemas Aquosos Bifásicos explorando o perfil da massa molecular adequada do polietilenoglicol (PEG) a partir de diferentes massas moleculares 400, 1000, 1500, 4000 e 8000 $g.mol^{-1}$ + Na_2SO_4 . Os resultados mostraram que o aumento da massa molecular até 4000 $g.mol^{-1}$ favoreceu a partição do íon metálico, além disso, com o uso de sistemas compostos por PEG 4000 (15% m/m) + Na_2SO_4 (12% m/m) + KI como agente extrator foi possível recuperar 92% de Cu(II).

Rabelo et al., (2004), estudou a separação da bromelina, enzima obtida a partir do fruto e caule do abacaxi, utilizando-se Sistemas Aquosos Bifásicos formados por óxido de polietileno (PEO) - óxido de polipropileno (PPO) - óxido de polietileno (PEO). Os resultados obtidos indicaram que houve, sob condições adequadas, uma purificação adequada da enzima diretamente a partir do seu meio de obtenção, mantendo-se boa atividade enzimática e a possibilidade de aplicação tecnológica.

Silva et al., (2017), estudou a influência da concentração de PEG sobre a partição de ácido propiônico. Neste trabalho utilizou-se o sistema PEG 1500/citrato de sódio com pH fixado em 7, as concentrações de PEG 1500 variaram entre 16,7; 21 e 25,2% m/m e a concentração de citrato ficou 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.

Michel et al., (2015), empregou o sistema aquoso bifásico composto por líquido iônico constituído por [C₄mim][Cl] e sal K₂HPO₄ para particionar as proteínas a-lactalbumina, β-lactoglobulina e lactoferrina existentes no soro do leite. Os valores de eficiência de extração obtidos foram acima de 87%, indicando que as proteínas migraram 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.

2.5 Métodos de Recuperação e Purificação do Ácido Propiônico

Um típico processo para a produção de um bioproduto por fermentação microbiana consiste no cultivo, fermentação, recuperação do produto, concentração e purificação. A recuperação do produto é a principal limitação em relação ao impacto econômico dos produtos provenientes da fermentação (SUWANNAKHAM, 2005).

Por isso, inúmeros métodos de separação e purificação de ácidos orgânicos têm sido estudados, como a extração por solvente, processos de separação com membranas (osmose reversa, ultrafiltração e eletrodialise), membranas líquidas surfactantes, destilação reativa, cromatografia, adsorção, entre outros. Porém, diversos fatores ainda limitam a aplicação dessas tecnologias em escala industrial, tais como elevados custos com equipamentos, recuperação de solventes, níveis de toxidez, impacto ao meio ambiente e elevado gasto energético (SILVA, 2009).

O Quadro 1 apresenta alguns métodos de separação e recuperação de ácidos carboxílicos obtidos por fermentação.

Quadro 1 - Métodos de separação-purificação dos ácidos carboxílicos do vinho de fermentação.

Método	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Precipitação	CaCO ₃ é adicionado no meio para neutralizar o ácido. A solução de carboxilato de cálcio é concentrada por evaporação, cristalizada e separada da água mãe.	Baixas impurezas no produto; baixo custo de investimento; alto rendimento.	Requer o uso de H ₂ SO ₄ para a liberação do ácido carboxílico, que gera CaSO ₄ , um resíduo sólido que é depositado em aterros.
Destilação	NH ₃ é usado para neutralizar ácido. Carboxilato de amônia então reage com álcool para formar éster, que é separado por destilação.	Produto de elevada pureza; o subproduto (NH ₄) ₂ SO ₄ pode ser usado como um fertilizante.	Requer a hidrólise de ésteres e destilação para separar o álcool a partir de ácido carboxílico. Elevado investimento e custos de energia associados com a destilação, requer economia de escala.
Extração	Uso de solventes orgânicos para extrair ácido carboxílico do caldo.	Baixo custo, alto rendimento, melhor para a produção de sal carboxilato.	A solução precisa ser acidificada para permitir extração eficiente do ácido carboxílico livre. Extratante precisa ser regenerado por destilação ou re-extração (<i>stripping</i>).
Adsorção	Usualmente usam-se resinas de troca iônica para adsorver íons carboxilatos do caldo.	Fácil operação	Baixa capacidade de adsorção, alto custo da resina, exige intensa energia para regeneração da resina, separação não é altamente seletiva.
Eletrodialíse	Corrente elétrica é aplicada para mover os íons carboxilato negativos através de membrana de troca aniônica para o ânodo no eletrodializador.	Carboxilato é concentrado na solução aquosa, não requer adição de ácido para ajustar o pH da solução	Pureza do produto é baixa e pode exigir purificação adicional; grande consumo de energia; membrana pode incrustar; difícil de realizar o <i>scale up</i> .

Fonte: Yang et al., (2007).

Dentre as metodologias citadas para separação e purificação de ácidos orgânicos obtidos por fermentação, como o ácido propiônico, o método tradicional é representado pela precipitação com hidróxido de cálcio. Porém, este método apresenta um grande consumo de reagente e gera uma significativa quantidade de resíduo sólido, o que corresponde a cerca de 65% do custo do produto final.

Em razão disso, a técnica mais estudada é a extração líquido-líquido reativa, onde se utiliza, em geral, uma amina como substrato (HESTEKIN et al., 2002).

Um exemplo de trabalho envolvendo esta técnica foi realizado por Hestekin (2002). Ele utilizou o princípio da recuperação por aminas terciárias através da reação com extração. A recuperação do ácido propiônico (presente na faixa de concentração de 0,05-0,4 kmol/m³ na fase aquosa) por extração reativa foi estudada usando tri-n-octil amina (TOA) em diferentes diluentes (n-heptano, éter de petróleo, acetato de etila e álcool oleílico) a 305 K. Verificou-se que solventes convencionais (n-heptano, éter de petróleo e álcool oleílico), exceto acetato de etila, não são agentes de separação adequados para o ácido propiônico. Por outro lado, o

diluyente TOA + fornece extrações em todas as faixas de concentração do ácido, sendo que o álcool TOA-oleílico o que fornece a maior extração.

A eficiência da extração líquido-líquido depende da escolha do solvente extrator. Além disso, esta técnica possui algumas desvantagens como o consumo de grande quantidade de reagentes, difícil recuperação de compostos oriundos desta fermentação e toxidez dos componentes da fase orgânica (PAYNE, SMITH, 1993).

Há também outro tipo de processo de separação frequentemente estudado, no qual utiliza-se membranas que agem como uma barreira seletiva. Como exemplo de estudos, o autor Habert, dedicou-se a separação de ácido propiônico utilizando difusão em um sistema híbrido multimembrana (MHS). O sistema de membrana é composto por duas membranas poliméricas hidrofílicas, fortemente básicas ou ácidas, separadas por uma membrana líquida a granel hidrofóbica. Pode-se concluir através deste trabalho, que a extração de ácidos carboxílicos com o uso do MHS é um processo estável, permitindo um desempenho prolongado (HABERT et al., 1997).

Há algum tempo vêm-se estudando técnicas mais modernas, e menos onerosas, para a recuperação do ácido propiônico. As técnicas mais usadas podem ser divididas em métodos físicos, químicos e físico-químicos. Dentre eles podemos destacar como métodos físicos: *spray-drying*, extrusão, cobertura por suspensão a ar, *spray cooling* e *spray chilling*, co-cristalização e extrusão centrífuga; métodos físico-químicos: coacervação (microencapsulação em géis), aprisionamento por lipossoma e complexação por inclusão e método químico: polimerização interfacial (COIMBRA, 2003).

2.6 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O delineamento de experimentos é uma ferramenta para melhoria de processo e um plano formal para a condução do experimento. São testes conduzidos de forma planejada, em que o resultado e a influência quantitativa ou qualitativa sobre uma variável resposta dependem de diversas variáveis controladas ou da combinação destas.

O planejamento de experimentos dependerá principalmente da forma com que este é estruturado e como será realizado e são empregados com a finalidade de realizar melhorias de produtos e processos, de forma que se reduza o número de testes da investigação experimental, bem como o uso de recursos materiais e financeiros (MONTGOMERY, 1991).

Há diversos planejamentos que podem ser executados e a escolha do planejamento adequado dependerá do número de variáveis independentes envolvidas e o objetivo de estudo.

Alguns exemplos de planejamentos, segundo Rodrigues e Iemma (2009), são: planejamento de Plackett e Burman; planejamento fatorial fracionário e completo; e delineamento composto central rotacional (DCCR).

O planejamento experimental com delineamento composto central rotacional (DCCR) visa otimizar o aproveitamento dos resultados experimentais diminuindo a quantidade de ensaios necessários para uma análise em um dado espaço amostral. Essa metodologia de alternância entre as variáveis permite abordar um espaço amostral mais amplo com menor quantidade de experimentos. O DCCR apresenta a varredura cruzada dos principais pontos de interesse do espaço amostral, captando pontos dos vértices (referenciados por níveis -1 e 1), pontos centrais (referenciados por nível 0) e pontos extremos fora do espaço amostral inicial, que permitem obter relações quadráticas para todas as variáveis estudadas. Ainda, a formatação da equação de ajuste quadrática das variáveis envolvidas fornece superfícies de resposta que constituem ferramenta útil na análise e interpretação dos resultados obtidos (SOUZA; AZERÊDO; SILVA, 2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

- **Reagentes**

Ácido cítrico

Ácido propiônico (comercial)

Água destilada

Citrato de Sódio

Hidróxido de Sódio

Polietilenoglicol 1500 g/mol

- **Equipamentos**

Agitador magnético com aquecimento – QUIMIS, modelo Q261

Balança analítica – MARTE, modelo BL3200H

Centrífuga – FANEM, modelo Excelsa II 206 BL

Incubadora *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D) – SOLAR, modelo SL223

Potenciômetro digital de bancada - TECNOPON, modelo Mpa-210

3.1 Método

O estudo da partição do ácido propiônico foi realizado usando-se o delineamento composto central rotacional (DCCR), com duas variáveis independentes para compor o sistema aquoso bifásico: concentração de polietilenoglicol (PEG) e concentração de citrato de sódio.

Nas Tabelas 3 e 4, são apresentados os intervalos estudados para as duas variáveis e a relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR, respectivamente.

Tabela 3 - Matriz do DCCR para 2 variáveis independentes em valores codificadas.

Tratamento	X1	X2
	[PEG 1500](%m/m)	[Citrato](%m/m)
1	-1,00	-1,00
2	1,00	-1,00
3	-1,00	1,00
4	1,00	1,00
5	-1,41	0,00
6	1,41	0,00
7	0,00	-1,41
8	0,00	1,41
9	0,00	0,00
10	0,00	0,00
11	0,00	0,00

Fonte: Do autor (2020).

Tabela 4 - Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água.

Variáveis		Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
PEG 1500(%m/m)	x ₁	16,7	18	21	24	25,2
Citrato(%m/m)	x ₂	11,4	12	13,5	15	15,6

Fonte: Do autor (2020).

3.2 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Os Sistemas Aquosos Bifásicos foram preparados utilizando soluções estoques de PEG 1500 + água destilada (60% m/m) e citrato de sódio + água destilada (30% m/m).

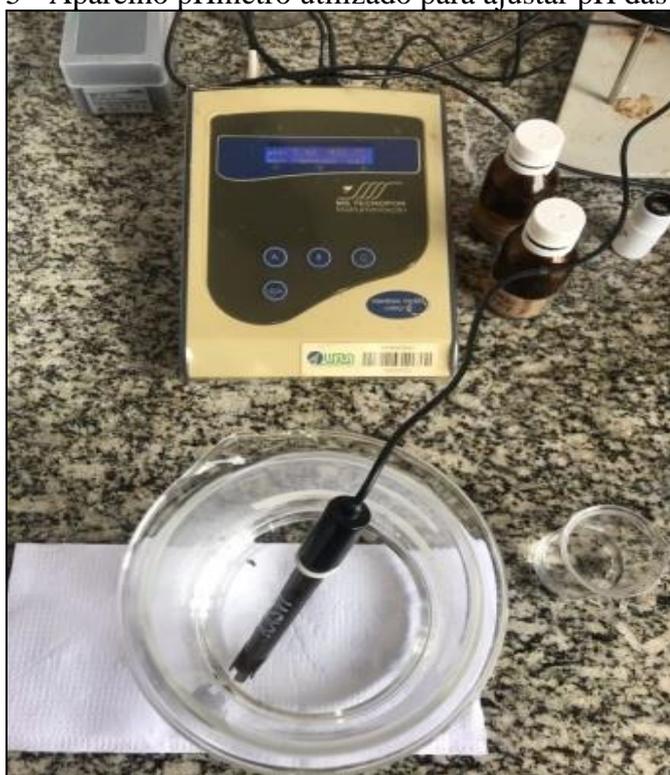
Figura 4 - Soluções estoques de PEG 1500 (60% m/m) e citrato de sódio (30% m/m).



Fonte: Do autor (2020).

Após a solubilização destas soluções, ajustou-se o pH de cada uma delas para 7,0. Este ajuste foi obtido com auxílio de um pHmêtro no qual, adicionou-se ácido cítrico concentrado 1M e hidróxido de sódio 1M para a redução ou aumento do pH de ambas soluções, respectivamente.

Figura 5 - Aparelho pHmêtro utilizado para ajustar pH das soluções.



Fonte: Do autor (2020).

Para a montagem de cada sistema foram utilizados cinco tubos de centrífuga com volume de 12 mL. Com o uso de pipeta automática, pesou-se, de acordo com concentração estabelecida pelo delineamento, a solução estoque de PEG (formador da fase topo), seguida da solução de citrato de sódio (formador da fase fundo) e água destilada para completar os 12 mL.

Após este procedimento, os tubos foram inseridos em um agitador durante 5 minutos e, em seguida para centrífuga, onde foram centrifugados a 2000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, os tubos foram levados à incubadora B.O.D, mantidos a 25 °C durante 24 horas.

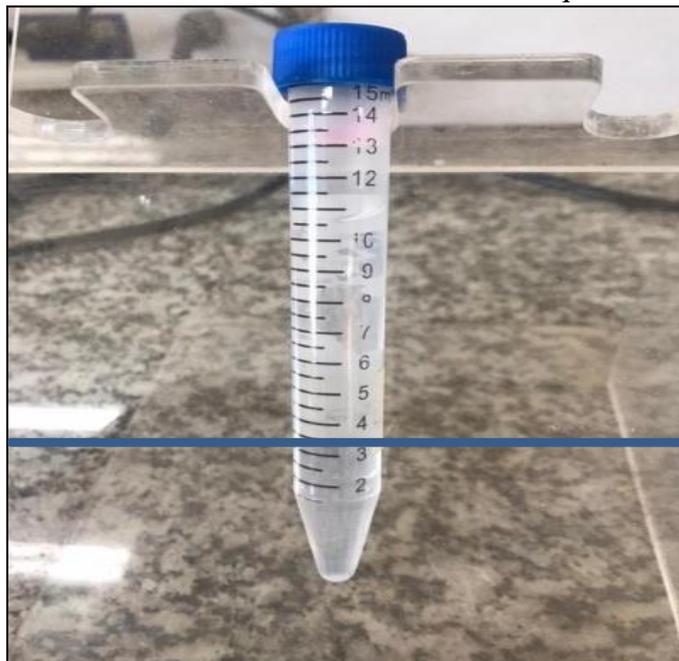
Figura 6 - Incubadora B.O.D.



Fonte: Do autor (2020).

Passado esse tempo, os tubos foram retirados da incubadora B.O.D, onde as fases conseguiram atingir o equilíbrio termodinâmico. Posteriormente, alíquotas das fases superiores e inferiores, assim como as fases brancas (amostras de controle) foram coletadas com auxílio de uma pipeta automática e armazenadas em microtubos. Os sobrenadantes foram descartados.

Figura 7 - Tubos retirados da B.O.D com as fases em equilíbrio termodinâmico.



Fonte: Do autor (2020).

A partir destes sistemas, foram formados outros sistemas de massa final de 10 g (5 g da fase topo e 5 g da fase fundo) em tubos de centrífuga de 15 mL. Após pesados, foram adicionados 100 μ L (0,0993 g) de ácido propiônico de grau analítico.

Em seguida, estes foram agitados em um agitador de tubos durante 5 minutos e centrifugados a 2000 rpm por 15 minutos. Terminada essa etapa, os tubos foram armazenados novamente por 24 horas em incubadora B.O.D a 25 °C .

Após 24 horas, os tubos foram retirados da incubadora B.O.D. Os volumes das fases topo e fundo foram medidos. Posteriormente, as fases foram coletadas com pipeta automática e colocadas em microtubos, para determinação de acidez total e da relação de fases.

Figura 8 - Amostras colocadas em microtubos.



Fonte: Do autor (2020).

Para cada triplicata foram calculados o desvio padrão (S.D) e os valores médios de coeficiente de partição. Os coeficientes obtidos experimentalmente foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), no qual foi possível visualizar o efeito dos fatores estudados na variável dependente. Os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica 8.0 (STATSOFT, 2008), considerando-se um nível de significância de 5%.

3.3 Determinação dos Coeficientes de Partição

Os coeficientes de partição foram calculados usando-se a Equação 3. Estes foram utilizados para quantificar o grau de partição alcançado no Sistema Aquoso Bifásico.

$$K_P = \frac{C_T}{C_F} \quad (3)$$

em que K_P é o coeficiente de partição do ácido propiônico, C_T e C_F são as concentrações de ácido total nas fases de topo e fundo em % m m⁻¹, respectivamente.

Determinação das relações de fases

As interações intermoleculares entre os componentes do sistema aquoso bifásico são os principais responsáveis pela formação das fases do sistema. Essas mesmas interações definem quais serão as propriedades físico-químicas presentes em cada fase, tal como a relação entre os volumes das fases.

A relação de fases é a razão dos volumes da fase topo (V_T) e da fase fundo (V_F) após o processo de purificação (NANDINI, RASTOGI, 2011).

$$R_f = \frac{V_T}{V_F} \quad (4)$$

3.4 Determinação do Rendimento de Purificação do Ácido Propiônico

Para selecionar o melhor sistema de purificação, calculou-se o rendimento de cada sistema. A equação 5 apresenta o cálculo da recuperação do ácido propiônico, que foi utilizada no desenvolvimento do trabalho.

$$Y (\%) = \frac{AT(\%)_{\text{fundo}} * V_{\text{fundo}}}{M_{\text{ácido propiônico}}} * 100 \quad (5)$$

sendo, $Y(\%)$ o rendimento de purificação do ácido propiônico do sistema, $AT(\%)_{\text{fundo}}$

é a acidez titulável na fase fundo em %m/v, V_{fundo} é o volume da fase fundo em mL e $M_{\text{ácido propiônico}}$ é a massa de ácido propiônico adicionada ao sistema em g.

3.5 Métodos Analíticos

3.5.1 pH

As determinações de pH foram realizadas com auxílio de um potenciômetro digital de bancada, calibrado periodicamente antes da realização das leituras com solução-tampão de pH 4,0 e 7,0, segundo a metodologia AOAC (2012).

3.5.2 Acidez titulável

As concentrações de ácido propiônico nas fases topo e fundo foram determinadas pela acidez titulável (AOAC, 2012). Inicialmente, em microtubos, pesou-se aproximadamente 1 g das fases brancas (amostra controle) e das fases contendo ácido propiônico. Posteriormente, adicionaram-se três gotas de Fenolftaleína 1% e 50 mL de água destilada para iniciar a titulação. As amostras foram tituladas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M.

A acidez titulável foi expressa em % (m v^{-1}), conforme a Equação 6:

$$AT(\%) = \frac{V * f * 0,74 * M * 10}{A} \quad (6)$$

sendo, AT (% m v^{-1} ácido propiônico) a acidez total, V (mL) o volume da solução de NaOH utilizado na titulação, A (g) a massa da amostra, f o fator de correção da solução de hidróxido de sódio (NaOH), 0,74 o fator de conversão do ácido propiônico e M ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a molaridade da solução de NaOH utilizada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia descrita anteriormente foi empregada com o objetivo de estudar a partição do ácido propiônico em um Sistema Aquoso Bifásico do tipo Peg1500/citrato. A partir dos ensaios realizados, obtiveram-se os valores de acidez titulável das fases topo e fundo calculadas para cada sistema PEG1500/citrato de sódio, diminuindo o valor gasto de hidróxido de sódio da amostra de controle (branco). A partir destes foi possível determinar os coeficientes de partição (K_p), o coeficiente de partição médio (K_p médio), rendimento e desvio padrão. Além disso, a partir da medição dos volumes das fases topo e fundo, após atingir o equilíbrio termodinâmico, obteve-se a relação de fases (R_f). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água.

Ensaio	PEG 1500 (%m/m)	Citrato (%m/m)	K_p médio	Desvio Padrão (K_p médio)	R_f	Rendimento
1	-1,00 (18,0)	-1,00 (12,0)	0,62	0,14	1,16	56,27
2	1,00 (24,0)	-1,00 (12,0)	0,47	0,09	1,13	58,26
3	-1,00 (18,0)	1,00 (15,0)	0,36	0,05	1,08	43,08
4	1,00 (24,0)	1,00 (15,0)	0,30	0,01	1,16	65,39
5	-1,41 (16,7)	0,00 (13,5)	0,43	0,05	1,13	63,00
6	1,41 (25,2)	0,00 (13,5)	0,28	0,03	1,07	67,17
7	0,00 (21,0)	-1,41 (11,4)	0,45	0,01	1,11	62,54
8	0,00 (21,0)	1,41 (15,6)	0,38	0,01	1,06	68,16
9	0,00 (21,0)	0,00 (13,5)	0,39	0,03	1,13	62,54
10	0,00 (21,0)	0,00 (13,5)	0,37	0,03	1,06	67,19
11	0,00 (21,0)	0,00 (13,5)	0,42	0,03	1,06	66,70

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

K_p – coeficiente de partição médio do ácido propiônico, R_f - relação de fases (2020).

4.1 Coeficiente de Partição Médio

No sistema PEG1500/citrato de sódio, todos os valores dos coeficientes médios de partição do ácido propiônico (K_p) foram inferiores a 1 e variaram entre 0,28 a 0,62. Este resultado demonstra que o mesmo tem preferência pela fase inferior rica em citrato de sódio. Comportamento similar foi observado por Ngome (2019), no qual os valores dos coeficientes de partição do ácido propiônico puro (K_{AP}), no sistema PEG1500/citrato, variaram de 0,32 a 0,78.

O maior valor do coeficiente de partição de 0,62, referente ao Ensaio 1, corresponde

ao sistema com 18% PEG e 12% de citrato de sódio (menores valores de concentração utilizados de ambos os reagentes), e o menor valor do coeficiente de partição foi 0,28, referente ao Ensaio 6, correspondente ao sistema com 25,2% PEG e 13,5% de citrato de sódio.

No trabalho de Martins (2008), sobre partição de betalaína em SAB's, também houve uma redução no coeficiente de partição com o aumento da concentração do polímero. Este comportamento pode ser atribuído a entropia conformacional como consequência da redução na densidade numérica da fase, pois quanto maior a massa do polímero menor será o número de moléculas de água por unidade de volume e consequentemente menor número de sítios configuracionais. Em função disto, há uma maior dificuldade dos biocompostos formarem novas interações com o PEG ocasionando redução destes na fase superior.

Os ensaios que possuem os menores valores de K_p , ou seja, resultarem em uma maior concentração e recuperação de ácido propiônico na fase inferior são considerados os tratamentos mais interessantes. Portanto, pelos resultados obtidos, os Ensaios 4 e 6 são os que apresentaram as melhores condições.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por Ngome (2013), que utilizou os mesmos componentes para formação de um SAB. No estudo mencionado o maior valor do coeficiente de partição (Ensaio 1) correspondeu ao sistema com 18% PEG e 12% de citrato de sódio, e os menores valores do coeficiente de partição corresponderam aos Ensaios 4 e 6, o mesmo ocorreu neste trabalho.

A partir dos dados experimentais, apresentados na Tabela 5, foram realizadas as análises de regressão múltipla através do programa estatístico *Statistica*, considerando significativos os parâmetros com $p < 0,05$ (demonstrados em negrito). Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da regressão para coeficiente de partição do ácido propiônico.

	Regressão	Erro Padrão	t(5)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	0,391	0,037	10,686	0,000	0,297	0,486
1 PEG1500 (%m/m)(L)	-0,052	0,022	-2,305	0,069	-0,110	0,006
PEG1500 (%m/m)(Q)	-0,005	0,027	-0,172	0,871	-0,073	0,064
2CITRATO (%m/m)(L)	-0,066	0,022	-2,930	0,033	-0,124	-0,008
CITRATO (%m/m)(Q)	0,025	0,027	0,917	0,401	-0,044	0,093
1L by 2L	0,021	0,032	0,646	0,547	-0,061	0,102

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Na Tabela 6, são apresentados os coeficientes de regressão para o coeficiente de partição do ácido propiônico (K_p). A partir destas análises verificou-se que o termo linear da concentração do citrato de sódio exerceu efeito estatisticamente significativo negativo em nível de 95% de confiança, resultado semelhante ao trabalho de Ngome (2019). Isso significa que um aumento da concentração de citrato de sódio de 12% para 15% proporciona uma diminuição da resposta (K_p), ou seja, aumenta a concentração de ácido propiônico na fase inferior, comportamento interessante para uma possível purificação de ácido propiônico.

Da Silva (2009) discutiu este diferente comportamento dos sais em termos do modelo fundamentado numa interação entre o polímero e os diferentes cátions. Baseado nesse modelo, quando soluções aquosas de PEG e sais são misturadas, o cátion e os grupos etilênicos do polímero interagem via os pares eletrônicos livres do átomo de oxigênio liberando algumas moléculas de água que antes os solvavam em um processo governado pelo aumento da entropia.

Com o incremento da concentração do eletrólito, a interação cátion-polímero continua até que ocorra a saturação dos sítios da cadeia polimérica. Neste ponto, os íons só poderão interagir com moléculas de água, reduzindo assim o grau de liberdade das mesmas e consequentemente diminuindo a entropia do sistema. Assim, mesmo que o bissoluto apresente interações entálpicas específicas com o polímero promovendo sua partição para a fase superior, o coeficiente de partição irá diminuir com o aumento da concentração do sal, uma vez que estes competirão com o biocomposto pela ligação dos sítios de reticulares do polímero, bem como pelas moléculas de água daquela fase, tendendo o biocomposto então a buscar possibilidades de ligação na fase inferior onde a densidade numérica é maior.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise de variância dos resultados para coeficiente de partição do ácido propiônico (K_p) para o sistema PEG 1500/citrato de sódio. ($F_{tab, 5\%, 5,5} = 5,05$)

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	P
Regressão	0,06	5	0,0123	3,07	0,12
Desvios da Regressão	0,02	5	0,004		
Total SS	0,08	10			

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Para análise do ajuste do modelo, são avaliados o coeficiente de determinação (R^2), que foi igual a 0,75. Analisando os dados da Tabela 7, observou-se que o valor de F regressão, ou seja, F calculado foi igual a 3,07 menor que o F tabelado (5,05), a 5% de significância, isso

significa que o ajuste do modelo para K_p aos dados experimentais não foi significativo. Por isso, a superfície de resposta não pode ser gerada.

4.2 Relação de Fases

Na Tabela 5, também são apresentados os resultados das relações de fases (R_f). Os valores variaram de 1,06 a 1,16, ou seja, nestes sistemas, o volume de fase superior sempre foi maior que o da fase inferior.

A partir destes dados experimentais, foram realizadas as análises de regressão múltipla para a variável R_f através do programa estatístico *Statistica*, considerando significativos os parâmetros com $p < 0,05$, como demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da análise estatística para a relação de fases (R_f) no sistema PEG 1500/citrato de sódio.

	Regressão	Erro Padrão	t(5)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	1,085	0,024	44,954	0,000	1,023	1,147
1 PEG1500 (%m/m)(L)	-0,005	0,015	-0,321	0,761	-0,043	0,033
PEG1500 (%m/m)(Q)	0,016	0,018	0,912	0,403	-0,029	0,061
2 CITRATO (%m/m)(L)	-0,014	0,015	-0,960	0,381	-0,052	0,023
CITRATO (%m/m)(Q)	0,011	0,018	0,617	0,564	-0,034	0,056
1L by 2L	0,029	0,021	1,428	0,213	-0,024	0,084

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

Dentro da faixa estudada, nem a concentração de PEG 1500, nem a concentração do citrato de sódio, exerceram efeitos estatisticamente significativos em nível de 95% de confiança. Isso era esperado, pois dentre os ensaios realizados os valores das relações de fases variaram muito pouco.

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,44. Quanto mais próximo o valor de R^2 for da unidade, melhor os modelos empíricos se ajustam aos dados reais. Por outro lado, quanto menor o valor deste, menor a relevância das variáveis independentes na explicação do comportamento das variações (Lee et al., 2006). Portanto, com o resultado obtido, o ajuste do modelo aos dados experimentais não poderia representar adequadamente a relação real entre os fatores escolhidos.

4.3 Rendimento de Purificação do Ácido Propiônico

Os resultados encontrados para o rendimento de purificação no sistema PEG1500/citrato de sódio são apresentados na Tabela 5, que demonstram quais ensaios obtiveram maior recuperação do ácido propiônico. Os valores variaram entre 68,16% e 43,08%. O maior valor de rendimento corresponde ao sistema com 21% PEG e 15,6% de citrato de sódio, e o menor valor corresponde ao sistema com 25,2% PEG e 13,5% de citrato de sódio, referentes aos Ensaios 8 e 3, respectivamente. O ensaio no qual se utiliza maior concentração de sal é referente ao maior valor de rendimento. Os resultados apresentados neste estudo corroboram com os obtidos por outros autores como Kestekin (2002), que estudaram a partição do ácido propiônico em SAB do tipo PEG-sal e observaram que a eficiência de extração foi diretamente proporcional à concentração do sal, ou seja, a utilização de maior concentração de sal resultou na melhor extração.

Além disso, é possível observar que os Ensaios que possuem os menores valores de coeficiente de partição médio, correspondem aos de maiores valores de rendimento (65,39 a 68,16%), o que era de se esperar. Valores semelhantes foram obtidos por Khayati (2013), seus resultados indicaram rendimento experimental de extração do ácido propiônico de 69,78%.

Baseado nos dados da Tabela 5, análises estatísticas através do programa *Statistica* foram realizadas, considerando significativos os parâmetros com $p < 0,05$. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados da análise estatística de efeitos sobre o rendimento de extração de ácido propiônico no sistema PEG 1500/citrato de sódio.

	Regressão	Erro Padrão	t(5)	p	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	66,966	4,268	15,689	0,000	55,994	77,938
1 PEG1500 (%m/v)(L)	3,783	2,618	1,445	0,208	-2,946	10,512
PEG1500 (%m/v)(Q)	-3,323	3,124	-1,064	0,336	-11,353	4,706
2 CITRATO (%m/v)(L)	0,232	2,618	0,088	0,933	-6,496	6,962
CITRATO (%m/v)(Q)	-3,192	3,124	-1,022	0,354	-11,222	4,838
1L by 2L	5,079	3,697	1,374	0,227	-4,423	14,582

Fonte: Dados da pesquisa (2020).

A partir destas análises verificou-se que tanto a concentração do citrato de sódio quanto do PEG 1500, ambos não exerceram efeito estatisticamente significativo negativo em

nível de 95% de confiança. Resultados semelhantes foram obtidos por Khayati (2013), para extração de ácido propiônico em SAB do tipo PEG-sal. O projeto foi aplicado para avaliar os efeitos de quatro variáveis independentes (concentração PEG 4000, concentração de sulfato de amônio, temperatura e concentração de ácido propiônico), no qual os resultados indicaram que a temperatura e a concentração de ácido propiônico foram os principais fatores que contribuíram para a extração do ácido propiônico, enquanto a concentração de PEG 4000, todos os termos de interação, e todos os termos quadráticos não tiveram significância.

O coeficiente de determinação (R^2) foi de apenas 53%, demonstrando que o ajuste da regressão não foi satisfatório.

5 CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se constatar que é possível concentrar o ácido propiônico usando sistemas aquosos bifásicos tipo PEG/citrato de sódio, tendo esse uma maior afinidade pela fase inferior, no caso, fase rica em citrato de sódio.

O menor valor obtido para coeficiente de partição é referente ao tratamento 6, no qual o sistema é constituído por 25,2% PEG 1500 e 13,5% de citrato de sódio, situação mais interessante para o processo da purificação.

Ao analisar o rendimento, o melhor resultado obtido foi no Ensaio 8, correspondente ao sistema com 21% PEG e 15,6% de citrato de sódio. O ensaio no qual se utiliza maior concentração de sal é referente ao maior valor de rendimento.

A partir das análises estatísticas realizadas, os modelos das regressões polinomiais não se ajustaram bem aos dados experimentais a 5% de significância.

A única variável que exerceu efeito estatisticamente significativo foi a concentração do citrato de sódio e sobre o K_p . Esta possuiu efeito negativo sobre o coeficiente de partição, sendo, portanto, preferíveis sistemas com maior concentração de citrato de sódio. Por outro lado, para a relação de fases e para o rendimento de purificação nenhuma variável exerceu efeito estatisticamente significativo.

Para se escolher o melhor tratamento, é necessário avaliar os resultados tanto do rendimento, quanto do coeficiente de partição. De acordo com os resultados apresentados, os melhores tratamentos analisando-se simultaneamente o rendimento da extração e o coeficiente de partição do ácido propiônico foram os Ensaios 4 e 6, no qual os sistemas são constituídos por 24% PEG 1500, 15% de citrato de sódio e por 25,2% PEG 1500, 13,5% de citrato de sódio, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. First Edition. Stockolm: Almquist e Wiksells, 1960. 231 p.
- ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell and Macromolecules**. 3rd ed. New York: John Wiley, 1986.
- ALVES, J.G.L.F.; CHUMPITAZ, L.D.; DA SILVA, L.H.; FRANCO, T.T.; MEIRELLES, A.J. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography B**, v. 743, p.235-239, 2000.
- ALVES, J. G. L. F.; Brenneisen, Jochen; Ninni, Luciana; Meirelles, Antonio J. A.; Maurer, Gerd. Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol) and Sodium Citrate: Experimental Results and Modeling. **Journal of Chemical and Engineering Data**. v.53, p.1587 - 1594, 2008.
- ANNUNZIATA, O. et al. Effect of polyethylene glycol on the liquid–liquid phase transition in aqueous protein solutions. **Rev. Biophysics**. 2002, 99 (22), 14165-14170.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. **J. Assoc. Off. Agric. Chemsts** 19th. Ed, 1–95, 2012.
- ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**. 1238, p. 1-10, 2012.
- BARBOSA, L. C. A. **Introdução à química orgânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. 299 p.
- BORGES, B. M. et al., Uma estratégia para a recuperação de metais utilizando sistemas aquosos bifásicos. **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq**, n. 19, 2018.
- CALDERÓN, L. A. L.. **Estudo de Otimização das Condições da Fermentação para Produção de ácido Propanóico por Propionibacterium acidipropionici utilizando Xarope de Cana-de-Açúcar**. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas - SP, 2012.
- CAMPOS, G. Padronização de Metodologia Para Determinação de Ácido Propiônico Em Pães De Forma. **Rev. Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Vol 17; no. 2; Campinas May/Aug. 1997.
- CARVALHO, R. A. **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**. 66f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2017.
- CLÁUDIO, A. F. M. et al., Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p. 39-47, 2010.

COÊLHO, D. G. **Modelagem e otimização do processo de síntese do ácido propanóico via fermentação do glicerol**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas - SP, 2011.

COIMBRA, J. S. R. et al., Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido. **Rev. Cadernos didáticos**. 95. Viçosa: UFV, 2003. 43 p.il.

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

DA SILVA, M. C. H. et al., **Sistema Aquoso Bifásico**: Uma alternativa eficiente para extração de íons. *Química Nova*. p. 1332-1339, 2006.

DE BRITO, G. M. Termodinâmica de partição do ânion $[Co(NO_2)_6]^{3-}$ em sistemas aquosos bifásicos. 2007. 91 f. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Magister Scientiae. UFV, Viçosa, 2007.

GRABER, T. A. Liquid-liquid equilibrium of the poly(ethylene glycol) + nitrate + water system at 298.15K. **Journal Chemical Engineering Data**, v. 45, p. 182-184, 2000.

HABERT, A. C. et al., **Escola Piloto em Engenharia Química** - Processos de Separação com Membranas, COPPE/UFRJ. 1997.

HESTEKIN, J. et al., Direct capture of products from biotransformations. **Rev. Report from Vision**. 2002, 1-13.

IHS Chemical. Propionic acid. Dezembro, 2016. Disponível em: <https://ihsmarkit.com/products/propionic-acid-chemical-economics-handbook.html>>. Acessado em 10 de fevereiro de 2020.

JAY, J. M. Fermentation and fermented dairy products. Modern food microbiology. 6° ed. Gaithersburg, USA: An Aspen Publication, Aspen Publishers, 2000. 635 p.

JESUS, T. D. S. B. D. **Separação de ácido propanóico por perstração, obtido por via fermentativa, em processo contínuo**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Campinas - SP, 2016.

JUNQUEIRA, C. M. **Partição da Lipase de Geotrichum Candidum em Sistemas Aquosos Bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Química – Físico-Química), UFA. p. 77, 2014.

KHAYATI, G. Optimization of Propionic Acid Extraction by Aqueous Two-Phase System Using Response Surface Methodology. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Guilan University, Rasht, Iran. 2013, 1-12.

Lee, W. C., Yusof, S., Hamid, N. S. A., and Baharin, B. S. (2006). Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology (RSM), *J. Food Eng.*, 75, 473–479.

LLADOSA, E. Liquid+liquid equilibria of polymer-salt aqueous two-phase systems for laccase partitioning: UCON 50-HB-5100 with potassium citrate and (sodium or potassium) formate at 23°C. **J. Chem. Thermodyn.**, 55, 166-71, 2012.

LUCAS, E. F. et al., **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: e-papers, 2001. 366 ISBN 85-87922-25-4.

MAHARJAN, P. et al., Novel chromatographic separation - The potential of smart polymers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 232-242, 2008. ISSN 14668564 (ISSN).

MARTINS, J. P. et al., Liquid-Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase 50 System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. **J. Chem. Eng. Data** 53, 238-41, 2008.

MEIER, M. M. **Filmes de Acetato de Celulose/Poli(caprolactona triol)**: Diagrama de Fases, Propriedades Térmicas, Mecânicas e Controle da Permeação de um Fármaco modelo. 2004. 122 (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

MOKHTARANI, B. et al., Partitioning of ciprofloxacin in ATPS of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 241-247, 2008.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. New York: John Wiley & Sons, 1991. 700 p.

NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Liquid-Liquid extraction of lipase using aqueous twophase system. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 295-303, 2011.

NGOME, M. T. **Produção de Ácido Propiônico em Soro Lácteo por Cultura Mista de Propionibacterium freudenreichii PS-1 e Lactobacillus Helveticus**. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2013.

NGOME, M. T. **Aproveitamento de Subprodutos da Indústria de Alimentos para Produção de Ácido Propiônico por Fermentação e Purificação Usando Sistemas Aquosos Bifásicos**. Dissertação de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras - MG, 2019.

OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre, e citrato de sódio sob diferentes temperaturas**. 2006. 72 f. Tese (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

PASSOS, H. et al., The impact of sel-aggregation on the extraction of biomolecules in ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Journal Separation Purification Technology**, v.

108, p. 174-180, 2013.

PAYNE, M. J.; SMITH, B.R. Toxicity of organic extraction reagents to anaerobic bacteria. **Journal Biotechnology and Bioengineering**. 25, 1251-1265, 1983.

PORTO, C. S. et al., Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Journal Biochemical Engineering**, v. 53, p. 165-171, 2011.

RABELO, A. P. B. et al., Bromelain partitioning in two-phase aqueous system containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal Chromatography**, p. 61-68, 2004.

RAJA, S. et al., Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7–16, 2011.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª ed. Campinas, SP. Editora Cárita, 2009.

ROSSETTI, Home Page:
<<http://www.rossetti.eti.br/dicuser/detalhe.asp?vini=3&vfim=3&offset=150&vcodigo=971>>.
Acesso em: 14/04/2020, 2006.

SALABAT, A. et al., of L-methionine in aqueous two-phase system containing poly(propylene glycol) and sodium phosphate salts. **Journal Chemical Thermodynamic**, v. 43, p. 1525-1529, 2011.

SILVA, C. A. S. et al., Partitioning of glycomacropetide in aqueous two-phase systems. **Rev. Process Biochemistry**, v.44, p. 1213-1216, 2009.

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. Lavras – MG, 2017.

SILVA, L. H. M. **Sistemas aquosos bifásicos: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES PARA PARTIÇÃO/PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS**. 2006. 29 v. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SNYDER, C. H. **The extraordinary chemistry of ordinary things**. 2ª ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1995. p. 242-245, 574-575.

SOUZA, L. D. P.; AZERÊDO, G. A. de; SILVA, F. A. Comportamento do concreto sob altas temperaturas via planejamento experimental fatorial com configuração estrela. **Rev. Ambiente Construído**, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 327/344, jan./mar. 2018.

SUWANNAKHAM, S. et al., Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor. **Rev. Biotechnol Bioeng**. Aug 5;91(3):325-37. 2005.

WU, X. et al., Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea roxb.*). **Journal Food Chemistry**, v. 129, p. 443-453, 2011.

YANG, S. T. et al., **Bioprocessing for Value-Added from Renewable Resources**. Reading: Elsevier B.V. Chapter.16: Extractive Fermentation for the Production of Carboxylic Acids, p.421-446, 2007.

YANKOV, D. et al., **Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri- n -octylamine dissolved in decanol and dodecane**. v. 21, p. 63–71, 2004.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning**. New York: Marcel Decker, 1995. 696 p.

ZHANG, W. et al., Phase equilibrium and chloramphenicol partitioning in aqueous two-phase system composed of 1-hydroxylhexyl-3-methylimidazolium chloride–salt. **J. Mol. Liq.**, 193, 226-31, 2014.