

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**APLICAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
FORMADOS POR ALCOÓIS E SAIS DE FOSFATO DE
POTÁSSIO NA EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

Autor: Samuel Bruno dos Santos

Orientadores: Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

Prof^a. Dr^a. Cleide Mara Faria Soares

ARACAJU, SE - BRASIL

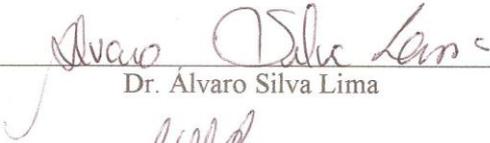
FEVEREIRO DE 2012

APLICAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR ALCOÓIS E
SAIS DE FOSFATO DE POTÁSSIO NA EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

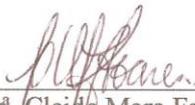
Samuel Bruno dos Santos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS

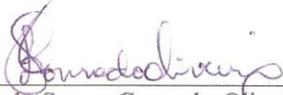
Aprovada por:



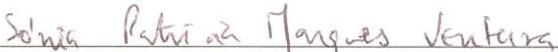
Dr. Alvaro Silva Lima



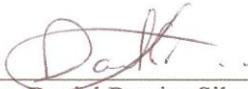
Dr.ª Cleide Mara Faria Soares



Dr.ª Líbia de Sousa Conrado Oliveira



Dr.ª Sônia Patrícia Marques Ventura



Dr. Daniel Pereira Silva

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2012

S237a Santos, Samuel Bruno dos

Aplicação de sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis sais de fosfato de potássio na extração de biomoléculas. / Samuel Bruno dos Santos; Orientadores: Álvaro Silva Lima, Cleide Mara Faria Soares. – Aracaju, 2012.

89p. : il

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). – Universidade Tiradentes, 2012

1. Engenharia de processo. 2. Biomoléculas. 3. Sistema aquoso bifásico. 4. Cafeína. 5. Aminoácidos. 6. Tetraciclina. I. Lima, Álvaro Silva. (orient.) II. Soares, Cleide Mara Farias. (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 66.02

Esquecendo-me das coisas que para trás ficam e avançando para as que estão diante de mim,
prossigo em direção do Alvo.
Filipenses 3,13

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele nada podemos fazer, além de ser o principal motivador dos meus sonhos;

Aos meus pais, Pondé Batista dos Santos e Anita Garibalde Bruno dos Santos, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e sempre me serviram de referência para buscar os sonhos;

Aos meus irmãos, Sandro, Sávio, Sinara, Samir que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as situações;

Aos meus sobrinhos, Mateus, Bruno, Gabriel, Sávio, Sabrina, Pollyane, Isabelle e Pedro Henrique, pela privação de tempo com vocês;

À minha namorada, Talita que chegou em minha vida nessa final de mestrado, mas sempre me incentivando e me apoiando nesse sonho;

À meus orientadores e amigos, Álvaro Silva Lima e Cleide Mara Faria Soares, que sempre foram uma grande fonte de conhecimento inacabável e que puseram a minha disposição todos os ensinamentos e me fizeram gostar cada vez mais de ser um pesquisador;

Aos professores e funcionários da Universidade Tiradentes e do Instituto de Tecnologia e Pesquisa, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

À meus amigos do ITP (Igor, Roneval, Carla, Camila, Andressa, Acenini, Mateus, Vanessa, Alysson, Murillo, Nayara, Ranyere, Naiana, Hofsky), por ter enfrentado junto comigo todas as alegrias, tristezas, facilidades e dificuldades desse grande desafio;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo;

À meus amigos, Alysson, Wagner, Danilo, Neemias, Marta, Andresa, por terem paciência e me incentivaram todo tempo nessa jornada;

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

APLICAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR ALCOÓIS E DAIS DE FOSFATO DE POTÁSSIO NA EXTRAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Samuel Bruno dos Santos

A produção de moléculas de interesse para a indústria biotecnológica, como as de alimentos, farmacêutica e biocombustível, depende estritamente das técnicas de extração e do grau de pureza das biomoléculas. Devido à complexidade desses biocompostos, as técnicas de extração e purificação são invariavelmente mais refinadas, o que se reflete nos custos do processo e conseqüentemente no valor do produto final. Portanto, é muito importante o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida, de fácil capacidade de recuperação da biomolécula, baixo custo e eficiente para a extração das biomoléculas. Dentre as técnicas utilizadas, pode-se destacar o sistema aquoso bifásico que se baseia na partição da biomolécula para uma fase e os componentes contaminantes para a fase oposta. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de partição de biomoléculas como aminoácidos (L-tirosina e L-triptofano), antimicrobiano (tetraciclina) e alcalóide (cafeína) em sistemas aquosos bifásicos formados por componentes de baixo custo como alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4 - solução tampão). O processo de extração foi otimizado pela variação do tipo e concentração dos componentes dos sistemas, da temperatura e da adição de diferentes eletrólitos. A depender dos constituintes dos sistemas as biomoléculas poderiam migrar para a fase de topo ($K > 1,0$) ou fase de fundo ($K < 1,0$). No processo de otimização das biomoléculas privilegiou-se a partição para a fase rica em álcool (fase de topo). Neste sentido os melhores valores para o coeficiente de partição foram para L-tirosina ($K_{tir} = 3,01$ usando 2-propanol – 40% (p/p), K_2HPO_4 – 20% (p/p), NaCl 2,5% (p/p) a 303,15 K); L-triptofano ($K_{trp} = 2,73$ usando 1-propanol – 60% (p/p), K_2HPO_4 – 20% (p/p), NaCl 2,5% (p/p) a 303,15 K); tetraciclina ($K_{tet} = 2,98$ usando 2-propanol – 60% (p/p), K_3PO_4 – 20% (p/p), NaCl 5% (p/p) a 308,15 K) e cafeína ($K_{caf} = 3,81$ usando 2-propanol – 60% (p/p), K_3PO_4 – 20% (p/p), NaCl 5,0% (p/p) a 303,15 K). Também foi otimizada a partição da tetraciclina para a fase rica em sal ($K_{tet} = 0,28$ usando etanol – 60% (p/p), tampão fosfato – 17,5% (p/p), a 308,15 K) e da cafeína para a fase rica em sal ($K_{caf} = 0,12$ usando metanol – 60% (p/p), tampão fosfato – 17,5% (p/p) a 308,15 K). O efeito dos eletrólitos no sistema de partição de cafeína seguiu a série de Hofmeister e nestes sistemas apresentaram maiores valores de partição quando se adicionou ao sistema Na_2SO_4 e KCl (K_{caf} igual a 3,55 e 3,45, respectivamente).

Palavras-chave: Biomoléculas, sistema aquoso bifásico, cafeína, aminoácidos, tetraciclina.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

TWO-PHASE AQUEOUS SYSTEMS FORMED BY ALCOHOLS AND POTASSIUM PHOSPHATE SALTS IN APPLICATION EXTRACTION BIOMOLECULES

Samuel Bruno dos Santos

The production of molecules that are of interest the biotechnological industries, such as the food, companies' pharmacy and bio-fuel, strictly depend on the extraction techniques employed and the degree of purity of the biomolecules. Due to the complexity of these bio composites, the extraction and purification techniques are invariably more refined. This has which reflect ion in the costs of the process and consequently in the price of the final product. Therefore, for the extraction of the biomolecules, is the development of a simple, quick, low-cost, efficient and easily recovery methodology of utmost importance. Among the techniques employed, one could point out the two-phase aqueous system is one of the used process is based on the partitioning of the biomolecule to one phase and the contaminating components to the opposite phase. The objective of this work was to evaluate the splitting process of several types biomolecules such as, two amino acids (L-tyrosine and L-tryptophan), one antibiotic (tetracycline) and one alkaloid (caffeine) in two-phase aqueous system formed by low-cost components like alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) and potassium phosphate salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4 – buffer solution). The extraction process was optimized by the variation of the components types and concentrations of the systems, the temperature and aslo the addition of different electrolytes. Depending on the constituents of the systems, the biomolecules could migrate to the top phase ($K > 1,0$) or bottom phase ($K < 1,0$), In the process of optimization of the biomolecules, the partition for the phase rich in alcohol (top phase) was focused on. In this sense the best values for the splitting coefficient were for L-tyrosine ($K_{tyr} = 3.01$ using 2-propanol - 40%, K_2HPO_4 - 20%, NaCl 2.5% to 303.15 K), L-tryptophan ($K_{trp} = 2.73$ using 1-propanol - 60%, K_2HPO_4 - 20% NaCl, 2.5% to 303.15 K) tetracycline ($K_{tet} = 2.74$ using 2-propanol - 60%, K_3PO_4 - 20%, NaCl 5% to 308.15 K) and caffeine ($K_{caf} = 3.81$ using 2-propanol - 60%, K_3PO_4 - 20%, NaCl 5.0% to 303.15 K). The Splitting of the tetracycline was also optimized for the phase rich in salt ($K_{tet} = 0.28$ using ethanol - 60% phosphate buffer - 17.5%, to 308.15 K) and caffeine salt-rich phase ($K_{caf} = 0.12$ using methanol - 60 %, phosphate buffer - 17.5%, to 308.15 K). The effect of the electrolytes in the caffeine splitting system followed the Hofmeister series and presented greater values of partitioning when Na_2SO_4 and KCl (K_{caf} equal to 3.55 and 3.45, respectively) was added to the system.

Keywords: Biomolecules, aqueous two-phase system, caffeine, amino acid, tetracycline.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS	XII
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVO	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 BIOMOLÉCULAS.....	17
3.1.1 Aminoácidos.....	17
3.1.2 Antimicrobiano	19
Tetraciclina	21
3.1.3 Alcalóide	21
Cafeína	22
3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	23
3.2.1 Sistemas Aquosos Bifásicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. MATERIAIS	31
4.2. DIAGRAMA DE FASES	31
4.3-EXTRAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS EM SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO	33
4.4-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS.....	34
4.5-DETERMINAÇÃO DAS FUNÇÕES TERMODINÂMICAS.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 INFLUENCIA DOS CONSTITUINTES DO SAB NAS DETERMINAÇÕES DAS BIOMOLÉCULAS	35
5.2- DIAGRAMA DE FASES	36
5.3.1-Aminoácidos (<i>L</i> -tirosina e <i>L</i> -triptofano).....	47
5.3.2-Antimicrobiano (tetraciclina)	53
5.3.3-Alcalóide (cafeína)	59
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	71
ANEXO A.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura molecular de cafeína.....	18
Figura 3.2: Estrutura molecular do L-triptofano.....	19
Figura 3.3: Estrutura molecular do L-tirosina.....	21
Figura 3.4: Estrutura molecular da tetraciclina.....	22
Figura 3.5: Esquema representativo de um diagrama de fases.....	27
Figura 5.1: Espectro de absorção dos constituintes do sistema e da solução de biomoléculas.....	36
Figura 5.2: Representação do Diagrama de fases para diferentes alcoóis e sais inorgânicos.....	38
Figura 5.3: Representação do Diagrama de fases para diferentes sais inorgânicos.....	39
Figura 5.4: Diagrama de fases para os sistemas álcool + K_3PO_4 + água a 298.15 K. Onde (○) dados experimentais; (✱) TL. (a) Metanol, (b) etanol, (c) 1-propanol e (d) 2-propanol.....	44
Figura 5.5: Diagrama de fases para os sistemas álcool + K_2HPO_4 + água a 298.15 K. Onde (○) dados experimentais; (✱) TL. (a) Metanol, (b) etanol, (c) 1-propanol e (d) 2-propanol.....	45
Figura 5.6: Diagrama de fases para os sistemas álcool + K_2HPO_4/KH_2PO_4 + água a 298.15 K. Onde (○) dados experimentais; (✱) TL. (a) Metanol, (b) etanol, (c) 1-propanol e (d) 2-propanol.....	46
Figura 5.7: Influência do tipo de álcool (1 = metanol, 2 = etanol e 3 = 1-propanol) e sal inorgânico (▲ - K_3PO_4 , ■ - K_2HPO_4 e ◆ - K_2HPO_4/KH_2PO_4 tampão) sobre o coeficiente de partição dos aminoácidos usando 50% (p/p) de álcool e 15% (p/p) de sal a 298,15K. O símbolo aberto representa 2-propanol. Onde (a) L-tirosina e (b) L-triptofano.....	48
Figura 5.8: Representação do coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) dos aminoácidos em função da variação da concentração do sal (10-20%, p/p) com seu respectivo álcool (50%, p/p) a 298.15 K. [(a) L-tirosina, (b) L-triptofano].....	49
Figura 5.9: Representação do coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) dos aminoácidos em função variação da concentração do álcool (40-60%, p/p) com seu respectivo sal (20%, p/p) a 298.15 K. [(a) L-tirosina, (b) L-triptofano].....	50
Figura 5.10: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) dos aminoácidos. [(a) L-tirosina, (b) L-triptofano].....	51
Figura 5.11: Efeito da variação de concentração de NaCl sobre o coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) dos aminoácidos. [(a) L-tirosina, (b) L-triptofano].....	52

Figura 5.12: Influência do tipo de álcool (1 = metanol, 2 = etanol e 3 = 1-propanol) e sal inorgânico (▲ - K_3PO_4 , ■ - K_2HPO_4 e ♦ K_2HPO_4/KH_2PO_4 tampão) sobre o coeficiente de partição da tetraciclina usando 50% (p/p) de álcool e 15% (p/p) de fosfato de potássio em 298,15K. O símbolo aberto representa 2-propanol.....	54
Figura 5.13: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da tetraciclina em função variação da concentração do sal (10-20 p/p%) com 2-propanol (50 p/p%) a 298.15 K.....	55
Figura 5.14: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) de tetraciclina em função variação da concentração do álcool (40-60%, p/p) com (20%, p/p) para K_3PO_4	56
Figura 5.15: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da tetraciclina para sistema o 2-propanol (60%, p/p) e K_3PO_4 (20%, p/p).....	56
Figura 5.16: Efeito da concentração de NaCl sobre o coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da tetraciclina para sistema 2-propanol (60%, p/p) e K_3PO_4 (20, p/p).....	57
Figura 5.17: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da tetraciclina em função variação da concentração da solução tampão (10-20%, p/p) para o sistema etanol (50%, p/p) a 298.15 K.....	58
Figura 5.18: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) de tetraciclina em função variação da concentração do etanol (40-60%, p/p) com (17,5%, p/p) para solução tampão 298.15 K.....	58
Figura 5.19: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da tetraciclina para o sistema etanol (60%, p/p) e solução tampão (17,5%, p/p).....	59
Figura 5.20: Influência do tipo de álcool (1 = metanol, 2 = etanol e 3 = 1-propanol) e sal inorgânico (▲ - K_3PO_4 , ■ - K_2HPO_4 e- ♦ K_2HPO_4/KH_2PO_4 tampão) sobre o coeficiente de partição da cafeína usando 50% (p/p) de álcool e 15%(p/p) de fosfato de potássio em 298,15K. O símbolo aberto representa 2-propanol.....	60
Figura 5.21: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da cafeína em função da variação da concentração do K_3PO_4 (10 – 20%, p/p) no sistema 2-propanol (50%, p/p)/ K_3PO_4 a 298.15 K.....	62
Figure 5.22: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) de cafeína em função da variação da concentração de 2-propanol (40-60%, p/p)/ K_3PO_4 (20%, p/p) a 298.15 K.....	63
Figura 5.23: Efeito da temperatura no coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da cafeína no sistema 2-propanol (60%, p/p)/ K_3PO_4 (20%, p/p).....	63

Figura 5.24: Influência da adição de eletrólitos no coeficiente de partição de cafeína (10 mg/L) em sistema aquoso bifásico formado por 2-propanol (60%, p/p) e K_3PO_4 (20%, p/p) à temperatura de 303,15 K: (a) ânions e (b) cátions.....	65
Figura 5.25: Efeito da concentração de NaCl sobre o coeficiente de partição (♦) e eficiência na extração (□) da cafeína para sistema o 2-propanol (60%, p/p) e K_3PO_4 (20%, p/p).....	66
Figura 5.26: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da cafeína em função da variação da concentração da solução tampão(10–20%, p/p)/ metanol (50%, p/p)/ a 298.15 K.....	67
Figura 5.27: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) de cafeína em função da variação da concentração de metanol (40-60%, p/p)/ solução tampão (17,5%, p/p) a 298.15 K.....	68
Figura 5.28: Efeito da temperatura no coeficiente de partição e eficiência de extração da cafeína usando o sistema metanol (60%, p/p)/ Solução tampão (17,5%, p/p).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Sistemas Aquosos bifásicos típicos.....	25
Tabela 3.2: Exemplos de biomoléculas extraídas utilizando diferentes composições de SABs.....	26
Tabela 5.1: Os valores de pH das fases de topo (T) e fundo (B) para os sistemas de álcool + água + sal inorgânico, a 298 K e à pressão atmosférica utilizados na extração de biomoléculas.....	41
Tabela 5.2: Parâmetros de Correlação da Equação (4.1) e seus respectivos desvios padrões usados para descrever a curva bimodal para o sistema ternário alcoólico.....	42
Tabela 5.3: Composições experimentais das fases em peso para TLS e seus respectivos comprimentos de linha e suas respectivas composições topo e fundo.....	43
Tabela 5.4: Parâmetros termodinâmicos de particionamento dos aminoácidos.....	52
Tabela 5.5: Coeficiente de partição de L-triptofano em diferentes sistemas aquosos bifásico.....	53
Tabela 5.6: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da tetraciclina no sistema 2-propanol/ K_3PO_4	56
Tabela 5.7: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da tetraciclina no sistema etanol/solução tampão.....	59
Tabela 5.8: Efeito do tipo de álcool e do sal de fosfato de potássio na partição de cafeína usando sistemas álcool e sais de potássio 50% (p/p) e 15% (p/p), respectivamente a 298,15 K.....	61
Tabela 5.9: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da cafeína no sistema 2-propanol/ K_3PO_4	64
Tabela 5.10: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da cafeína no sistema metanol/solução tampão.....	69
Tabela A1: Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por metanol + sal de fosfato de potássio + água a 298,15 K.....	83
Tabela A2: Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por etanol + sal de fosfato de potássio + água a 298,15 K.....	84
Tabela A3: Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por 1-propanol + sal de fosfato de potássio + água a 298,15 K.....	85

Tabela A4: Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por 1-propanol + K_2HPO_4/KH_2PO_4 + água a 298,15 K.....	86
Tabela A5: Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por 2-propanol (1) + sal de fosfato de potássio (2) + água (3) a 298,15 K.....	87

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A utilização de moléculas obtidas de origem vegetal, animal e microbiana em vários tipos de indústrias têm evoluído com o passar dos anos, principalmente devido ao surgimento de diversas técnicas de extração. Este interesse crescente é fortalecido pela alta demanda das indústrias: farmacêutica (interessada em novos antimicrobianos puros), alimentícia (interessada na obtenção de produtos probióticos e nutracêuticos) por produtos com alto grau de pureza, além da indústria de biocombustível (interessada na obtenção de óleos vegetais, enzimas e bio-óleo) que podem apresentar diferentes graus de pureza. Desta forma, torna-se necessário escolher métodos de extração que não danifiquem as biomoléculas, as quais são extremamente sensíveis as temperaturas elevadas de extração, presença de elementos químicos dentre outras.

A extração e purificação de biocompostos utilizada na indústria consistem em processos formados por sistemas tradicionais com a utilização de solventes orgânicos, a quente ou a frio (CHUNG *et al.*, 2010), agentes quelantes e precipitantes (ANDREO e JORGE, 2006), técnicas cromatográficas (WANG, 2011) e de forma menos tradicional a aplicação de fluídos supercríticos (PARK *et al.*, 2012), ultrassom (JUN, 2009) e radiação micro-ondas (CHAN *et al.*, 2011). Essas técnicas consomem quantidades elevadas de solventes ou são procedimentos dispendiosos e pode apresentar condições que sejam danosas às biomoléculas.

Uma técnica que desponta para a extração de biomoléculas são os sistemas aquosos bifásicos, que podem ser formados utilizando uma série muito grande de compostos como polímeros (polietileno glicol, dextrana e maltodextrina), sais orgânicos (fosfato de potássio, citrato de sódio), líquidos iônicos e alcoóis. Estes sistemas apresentam como maiores vantagens à ampliação de escala, simplicidade tecnológica e alta concentração de água (70 a 95%) que oferecem um ótimo meio para biomoléculas sensíveis, além da baixa tensão interfacial que facilita a migração das biomoléculas entre as fases e ainda minimiza o risco de comprometimento da estrutura de células e proteínas (HASMANN *et al.*, 2008). Em comparação com outros métodos de purificação, o alto custo dos polímeros levou a aplicação de sistemas baseado em sais,

neste trabalho foca-se na utilização de alcoóis e sais, ambos de baixo custo e de certa forma abundante na região do país em que o trabalho foi desenvolvido.

Para a aplicação do sistema aquoso bifásico, é necessário o conhecimento prévio dos diagramas de fase dos sistemas em estudo, por este motivo as curvas binodais para todos os sistemas utilizados e as linhas de amarração que prevêm a composição das fases de topo e fundo para alguns pontos de mistura foram realizadas. Cabe ressaltar a importância deste procedimento para o entendimento dos efeitos associados durante a partição de biomoléculas, além do ajuste matemático inserido.

A literatura tem apresentado alguns trabalhos de partição em sistemas alcoóis e sais (OOI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010), porém a otimização das condições do processo de partição das biomoléculas não foi ainda inteiramente estudada. Este trabalho aplica a variação dos tipos e concentrações dos alcoóis e sais de fosfato de potássio, da temperatura e da adição dos eletrólitos, tornando o trabalho inovador. As moléculas estudadas foram escolhidas como compostos modelos, os aminoácidos para entendimento da partição de peptídeos e proteínas; alcalóides; pois o trabalho pode futuramente ser estendido a processos de elucidação e comprovação de *dopping*, e a tetraciclina para a tentativa de aplicação destes processos em extração de antibióticos.

Por todos estes motivos o trabalho foi estruturado, desenvolvido e está apresentado nos capítulos subsequentes.

Capítulo 2

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo de extração de diversas biomoléculas como aminoácidos (L-tirosina e L-triptofano), alcalóide (cafeína) e antibiótico (tetraciclina) utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais inorgânicos (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4 - solução tampão).

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Construir curvas binodais para os sistemas alcoóis + sais de fosfato de potássio;
- Ajustar o modelo matemático proposto por Merchuck e colaboradores às curvas binodais formada por sistemas alcoóis+sais de fosfato de potássio;
- Otimizar o processo de extração de aminoácidos (tirosina e triptofano), alcaloide (cafeína) e antimicrobiano(tetraciclina) nestes sistemas.

Capítulo 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico será apresentado o estado da arte referente à extração de biomoléculas, utilizando os sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis e sais de fosfato de potássio, sendo apresentadas as propriedades sobre as biomoléculas usadas.

3.1 Biomoléculas

O termo biomoléculas possui uma definição ampla e abrangente, pois elas compõem organismos vivos como vegetais, animais e microrganismos, podendo ser utilizados no metabolismo, na digestão, na proteção, na locomoção e outros. As biomoléculas podem ser classificadas como de origem endógena ou de origem exógena (GREISLER, 2003).

A aplicação de biomoléculas em diversas atividades industriais tem evoluído com o passar dos anos, principalmente devido ao surgimento de diversas técnicas de extração e purificação. Este interesse crescente é fortalecido pela alta demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza (ZUÑIGA *et al.*, 2003). Dentre as biomoléculas podem-se citar os aminoácidos, antimicrobianos, alcalóides, entre outras.

3.1.1 Aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades monoméricas formadoras dos peptídeos e proteínas. A molécula é composta por uma porção carboxila ligada a porção amina por um carbono alfa, ao qual estão ligados diferentes radicais, propiciando assim a diferenciação destes compostos (NELSON e COX, 2011). Basicamente existem 22 aminoácidos que se ligam por meio de ligações peptídicas, e destes, 8 são chamados de "essenciais" pois não são sintetizados pelos humanos (histidina, iso-leucina, leucina, lisina, metionina, treonina, L-triptofano), e portanto devem fazer parte da dieta alimentar (LEE *et al.*, 2003). Além deste importante papel na nutrição humana, os aminoácidos são utilizados na produção de plásticos biodegradáveis, drogas e

catalisadores quirais, realçadores de sabor, adoçantes com baixas calorias, além da sua aplicação na síntese de fármacos e cosméticos (PENTEADO, 2003).

Esses monômeros apresentam solubilidade em água (JI e FENG, 2008), mas essa propriedade é reduzida em solventes orgânicos e influenciada fortemente pelo valor do pH e da força iônica da solução aquosa, apresentam ainda um elevado ponto de fusão (ASENJO e ANDREWS, 2011).

L-Triptofano

O L-triptofano (Figura 3.1) é um aminoácido aromático essencial, tanto para homens como animais, pois não pode ser produzido no organismo, tendo que ser obtido na alimentação diária. Este aminoácido é encontrado em menor concentração nas proteínas dietéticas: 1% nas proteínas de origem animal e 1,4% nas proteínas de origem vegetal (ROSSI e TIRAPAGUI, 2004), tendo como dosagem de ingestão recomendada 100 mg/kg de massa corporal por dia (MARKLOVÁ *et al.*, 2000). O isolamento do L-triptofano foi primeiramente relatado por Frederick Hopkins em 1901, por meio da hidrólise da caseína. A partir de 600 gramas de caseína bruta obtém-se 4-8 g de triptofano (GOIHL, 2006).

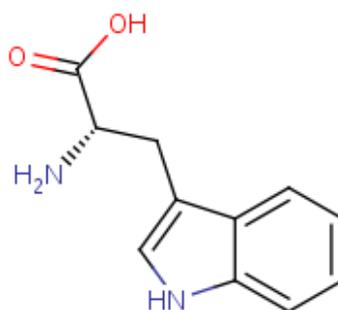


Figura 3.1. Estrutura molecular do L-triptofano.

Além de ser precursor da serotonina, o L-triptofano apresenta outras funções como: contribuição no crescimento normal e síntese proteica, influência no sono, no comportamento e na fadiga. Apresenta-se como precursor da vitamina B₃ e é um dos aminoácidos que estimula a secreção de insulina e hormônio do crescimento (ROSSI e TIRAPAGUI, 2004). Os distúrbios de má absorção de frutose e intolerância à lactose

provocam absorção inadequada do L-triptofano no intestino, ocasionando a redução da concentração de triptofano no sangue. No sistema nervoso central atua na produção de serotonina desempenhando uma atividade antidepressiva (GOIHL, 2006).

L-Tirosina

A L-tirosina (Figura 3.2) é um aminoácido aromático não essencial, produzido a partir da fenilalanina. Este aminoácido pode ser encontrado na carne, trigo, aveia e frutos do mar, e apresenta um importante papel no metabolismo humano, pois é precursor de importantes neurotransmissores como adrenalina, noradrenalina e dopamina. Outra função é a aceleração no sistema nervoso agindo como regulador do humor, na comunicação entre neurônios e supressor de apetite. Cabe também destacar a atividade antitumoral, a ação na redução da gordura corporal e auxílio na produção de melanina (BRETTI *et al.*, 2011). A L-tirosina também é precursora dos hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) que são produzidos pela tireóide (CHATCHAWALSAIN, 2005).

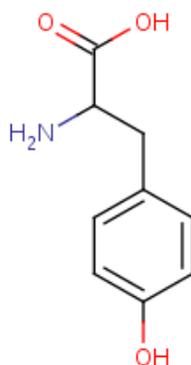


Figura 3.2. Estrutura molecular da L-tirosina.

3.1.2 Antimicrobiano

Um composto denominado como agente antimicrobiano é aquele capaz de matar ou inibir o crescimento de microrganismos. Estes podem ser antibacterianos quando especificamente atuam em bactérias, ou antifúngicas com atuação em fungos. Nos

Estados Unidos foram produzidos cerca de 25 mil toneladas de antimicrobianos no ano de 2004 (WANNMACHER e KUCHENBECKER, 2004).

Os compostos antibacterianos são classificados quanto à estrutura química e quanto à origem, os quais podem ser naturais, semi-sintéticos e sintéticos. Com os avanços da química medicinal, a maioria dos antibacterianos são modificações semi-sintéticas de diversos compostos naturais. Estes incluem, por exemplo, os antibacterianos beta-lactâmicos, que incluem as penicilinas, as cefalosporinas, e os carbapenêmicos. As sulfonamidas, as quinolonas, e a oxazolidinonas são produzidas apenas por síntese química. Outro sistema de classificação é baseado na atividade biológica; nesta classificação antibacteriana, os compostos são divididos em dois grandes grupos de acordo com seus efeitos biológicos sobre os microrganismos: agentes bactericidas que matam as bactérias e agentes bacteriostáticos que desaceleraram ou interrompem o crescimento bacteriano (VON NUSSBAUM, 2006).

A produção destes compostos é realizada por processos biológicos ou por meio de síntese química. A produção dos antimicrobianos por via fermentativa utiliza como agentes biológicos bactérias ou fungos. Uma vez produzidos, estes compostos devem ser purificados, e neste sentido são utilizadas diversas técnicas como a precipitação, filtração, sistema aquoso bifásico (WANG *et al.*, 2010) e cromatografia líquida (FOUNTORA e BRANDELLI, 2008).

A maioria dos antibióticos tem como alvo as funções bacterianas ou seus processos de crescimento, agindo na parede celular das bactérias (tais como penicilinas e cefalosporinas), ou a membrana celular, ou interferir com as enzimas bacterianas essenciais (como as quinolonas e as sulfonamidas) têm atividade bactericida, ainda existem alguns que atuam na síntese de proteínas-alvo (como os aminoglicosídeos, macrolídeos) e já as tetraciclina possuem efeito bacteriostáticos. O grau de ação destes fármacos pode ser classificado quanto ao grau de ação, podendo ser antibiótico com estreito espectro atuando em bactérias específicas ou Gram-negativas ou Gram-positivas, enquanto os antibióticos de amplo espectro afetar uma larga gama de bactérias tanto Gram-negativas como Gram-positivas. Dentre essa gama de fármacos disponíveis para diversos tratamentos, foi alvo desse estudo a tetraciclina (BORA *et al.*, 2005).

Tetraciclina

A tetraciclina (Figura 3.3) é um poliketídeo antibiótico de amplo espectro produzido pelo gênero *Streptomyces* e *Actinobacteria*, indicado no combate a infecções bacterianas. Este agente antibacteriano possui amplo espectro de atuação, age como inibidor da síntese de proteínas, ligando-se à subunidade 30S dos ribossomos dos microrganismos, prevenindo a introdução de novos aminoácidos na cadeia peptídica nascente das bactérias. Essa ação é geralmente inibitória e reversível após a retirada da droga (PALMER *et al.*, 2010).

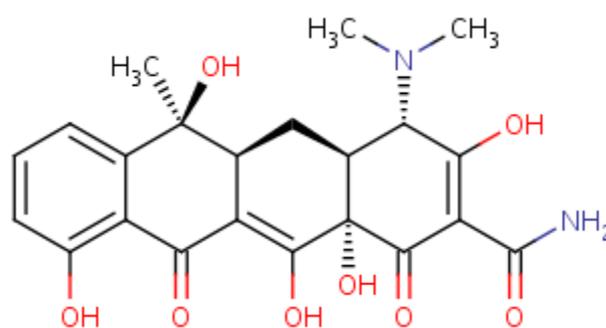


Figura 3.3. Estrutura molecular do antibiótico.

Estudos recentes demonstraram que a tetraciclina sofre mudanças estruturais no ambiente, e que os produtos dessa transformação são mais estáveis. Tais transformações são extremamente importantes, pois vários microrganismos desenvolvem resistências a antimicrobianos, mas são sensíveis aos produtos da modificação da tetraciclina, como a epitetraciclina (ETC), a anidrotetraciclina (ATC) e a epianidrotetraciclina (EATC) (AZEVEDO *et al.*, 2009).

3.1.3 Alcalóide

Os alcalóides são compostos cíclicos contendo nitrogênio em um estado negativo de oxidação, gerados a partir do metabolismo secundário de organismos vivos. Estes compostos apresentam importante atividade biológica e grande distribuição no meio ambiente (GRYCOVA *et al.*, 2007). Os alcalóides são produzidos por uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, animais e principalmente por

plantas, por meio de extrações aquosas e/ou alcoólicas (AZNAR e MADURO, 2008), fluido supercrítico (TELLO *et al.*, 2011) e cromatografia (RODRIGUES *et al.*, 2007). Eles geralmente têm efeitos farmacológicos e são usados como medicamentos, como estimulantes físicos. Atuando como, anti-agregante plaquetário, estimulantes, psicotrópicos, antibacteriano, antifúngico e ação anestésica, a cafeína é um exemplo de alcalóide de grande atuação na indústria de alimentos e medicamentos (SILVA *et al.*, 2007).

Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina ou 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona, $C_8H_{10}N_4O_2$), é um alcalóide do grupo das xantinas (Figura 3.4). Foi primeiramente isolada do café em 1820 (SALVA e LIMA, 2007).

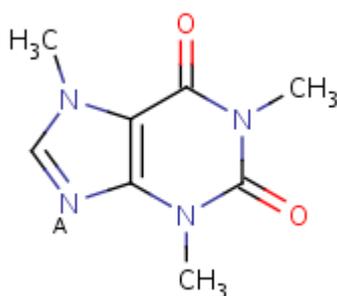


Figura 3.4. Estrutura molecular de cafeína.

Este alcalóide é bem conhecido à devido sua ocorrência em diversos alimentos (JUN, 2009; TELLO *et al.*, 2011) sendo encontrada em diversos tipos de plantas, tais como folhas de mate (*Ilex paraguariensis*), sementes de guaraná (*Paullinia cupana*), sementes de amêndoas de kola (*Cola nitida*, *Cola acuminata*), grãos de café (*Coffea canephora*, *Coffea arabica*) e grãos de cacau (*Theobroma cacao*) (GONZALES-NUNEZ e CANIZARES-MACIAS, 2011, TELLO *et al.*, 2011, HEARD *et al.*, 2006, PERVA-UZUNALIC *et al.*, 2006)

O consumo global de cafeína foi estimado em 2004 como sendo 120.000 toneladas por ano tornando-se a substância psicoativa mais consumida no mundo (FISONE *et al.*, 2004). Diariamente, a cafeína é consumida em bebidas, tais como café, chá, refrigerantes, energéticos, chocolate, balas e doces. Esta biomolécula apresenta-se

como um dos elementos encontrados em preparações medicamentosas sem prescrição como os remédios para resfriados, pílulas para emagrecimento, diuréticos e outros estimulantes (SINGH e SAHU, 2006). O efeito benéfico da cafeína, como o aumento do estado de alerta, da energia e da habilidade de concentração, ocorre em doses baixas e moderadas (50 – 300 mg). O consumo moderado leva muito raramente a riscos para saúde, porém doses elevadas de cafeína induzem a efeitos negativos, tais como ansiedade, insônia, e taquicardia, que são vistos, principalmente, em indivíduos sensíveis á cafeína (NEHLIG, 1999).

3.2 Extração e Purificação de Biomoléculas

Para a aplicação de biomoléculas faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de extração e, dependendo da aplicação, um procedimento de purificação adequado e rigoroso deve ser desenvolvido.

Na extração de biocompostos podem ser empregadas diferentes técnicas, dentre elas e com a maior frequência, é a extração com solventes orgânicos a frio ou a quente. O tipo de solvente utilizado depende da polaridade das biomoléculas, entretanto o processo é limitado devido à capacidade dos solventes em isolar a biomolécula alvo (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1997). Outro método de extração é a inclusão de quelantes que surgiu pela dificuldade de determinação de micronutrientes disponíveis, sendo estes utilizados com objetivo de extrair maiores quantidades de biomoléculas (ANDREO e JORGE, 2006). Entretanto devemos considerar os efeitos tóxicos de resíduos em ambos os processos, justificando assim a importância da busca de novas técnicas de extração que minimizem a produção de resíduos ao meio ambiente, como a aplicação de fluido supercrítico nas extrações. Essa técnica utiliza um fluido submetido à pressão e temperatura acima de seu ponto crítico modificando as propriedades, como a densidade do fluido supercrítico sendo similar a dos líquidos e sua viscosidade com valores próximos aos determinados para os gases. O estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual o líquido e o gás são indistinguíveis entre si, apresentando assim características tanto de um gás como de um líquido (HERRERO, CIFUENTES e IBANEZ, 2006).

O dióxido de carbono (CO₂), o fluido mais utilizado devido à sua baixa temperatura (31,3°C) e pressão crítica (72,9 atm), entretanto, o CO₂ supercrítico (pela sua baixa polaridade) possui um menor efeito nas extrações de moléculas de alta polaridade, podendo ser solucionado com a adição de co-solventes como metanol e etanol nos processos (RAVENTÓS, DUARTE e ALARCÓN, 2002).

O processo de separação e purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de um biocomposto. A escolha do processo de separação e purificação de algumas substâncias bioativas deve ser feita levando em consideração um alto grau de purificação. Além disso, o processo deve ser simples e barato, evitando sucessivas etapas. Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma biomolécula. Em comparação às técnicas citadas anteriormente, a partição em sistema aquoso bifásico é uma alternativa bastante eficiente para a separação e purificação de biomoléculas. As vantagens do sistema líquido-líquido oferecidas por este tipo de sistema são: ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, fácil aplicação em grande escala, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das biomoléculas (SELVAKUMAR *et al.*, 2010).

3.2.1 Sistemas Aquosos Bifásicos

Os sistemas aquosos bifásicos são conhecidos desde o final do século XIX, quando Beijerinck percebeu a separação espontânea em duas fases líquidas límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel. Posteriormente, pesquisadores como Ostwald e Hertel, e Dobry e Boyer-Kawenoki estudaram sobre esses sistemas, porém, foi apenas com os trabalhos de Albertsson, em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação desta técnica para a partição/purificação de biocompostos (ZAFARANI-MOATTAR e NASIRI, 2010).

Inicialmente os sistemas aquosos bifásicos são formados pela mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal, resultando em duas fases imiscíveis (GARZA-MADRID *et al.*, 2010). A Tabela 3.1 classifica as composições dos SABs em dois grupos (polímero/polímero e polímero/sal), os quais são aplicados a diferentes biomoléculas a serem extraídas e/ou purificadas.

Tabela 3.1: Sistemas Aquosos bifásicos típicos

Polímero	Polímero
Polietileno Glicol	Dextrana(Dx) Ficoll Hidroxiopropil-amino (HPS) Polivinil álcool (PVA) Polivinil pirrolidona (PVP) Maltodextrina (MD) Maltodextrina
Polipropileno glicol	Polietileno Glicol (PEG)
Polímero	Sal
PEG-copolímeros	(NH ₄) ₂ SO ₄ NH ₂ CO ₂ NH ₄ Na ₂ HPO ₄ K ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ Na ₂ SO ₃ FeSO ₄

Fonte: MACHADO,1999

Os SABs formados por PEG + dextrana ou PEG + sais são amplamente utilizados devido à disponibilidade destes no mercado, por não serem tóxicos e apresentarem alta seletividade. Os SABs ainda possuem potencial de reuso dos reagentes utilizados e de forma geral mantém a integridade das biomoléculas em condições otimizadas (FERREIRA *et al.*, 2011). Por outro lado, apresentam algumas limitações como à desnaturação de biomoléculas, como enzimas e proteínas, em altas concentrações de sais (SILVA e MEIRELLES, 2000). A literatura relata que os SABs formados por PEG + dextrana possuem elevado custo, tornando inviável a sua aplicação em escala industrial para além da turvação dos sistemas que causa problemas de foro analítico (COIMBRA, 2003).

Os SABs têm sido usados na purificação e na bioconversão extrativa de biomoléculas (MADURO *et al.*, 2005). Esta técnica de separação vem sendo aplicada em outros segmentos como no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (WAZIRI *et al.*, 2003). São também utilizados na remoção de íons metálicos (HANSON *et al.*, 1992), compostos aromáticos de óleo (MAZZERA *et al.*,1999) e poluentes orgânicos do meio ambiente (ROGERS *et al.*, 1998).

Diversos pesquisadores têm utilizado este tipo de sistema para a purificação de diversas biomoléculas, como albumina (YAN-MIN *et al.*, 2010), triptofano (PEREIRA *et al.*, 2010), aminoácidos (DOMINGUEZ-PEREZ *et al.*, 2010), antibióticos (WANG *et al.*, 2010) e alcalóides (TELLO *et al.*, 2011). Além de analisar a partição de biomoléculas, o estudo da efetividade da adição do sal é determinado principalmente pela natureza do componente e segue a seguinte ordem de eficácia: para ânions $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^-$ e para cátions $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ (RAWDKUEN *et al.*, 2010).

Wang *et al.*, (2010) estudaram a influência de diferentes sais na purificação de antibióticos, utilizando sistema com sulfato de amônia, observando a elevação do rendimento de 30,03% para 87,7%. Salabat *et al.*, (2007) também verificou a influência de diferentes sais na partição, recuperação e fator de purificação dos aminoácidos usando polietilenoglicol, e observou que dentre os sais testados (sulfato de magnésio, sulfato de amônio, sulfato de sódio) o sulfato de amônio apresentou os melhores resultados na partição dos aminoácidos.

Na aplicação industrial o principal sal utilizado é o fosfato devido ao seu baixo custo e o elevado poder iônico dos sais de potássio, favorecendo um alto coeficiente de partição de biomoléculas, porém altas concentrações de sal podem ocasionar problemas na biomolécula e alteração do pH do SAB (YAN-MIN *et al.*, 2010). Algumas biomoléculas extraídas pelos SABs são descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Exemplos de biomoléculas extraídas utilizando diferentes composições de SABs.

Componente 1	Componente 2	Biomolécula	Referência
Líquido Iônico	Aminoácidos	Cafeína	Dominguez-Perez <i>et al.</i> , 2009
Co-polímeros	Fosfato de Potássio	Insulina	Haraguchi <i>et al.</i> , 2003
Triton X-100	Sulfato de sódio	Proteína	XIE <i>et al.</i> , 2005
Líquido Iônico	Hidróxido de Potássio	Triptofano	Wang <i>et al.</i> , 2010
Líquido Iônico	Fosfato de Potássio	Lipase	Ventura <i>et al.</i> , 2011
Álcool	Citrato de Sódio	Lipase	Ooi, <i>et al.</i> , 2009

Nos SABs relatados na literatura são apresentados diferentes modelos termodinâmicos desenvolvidos para a modelagem e otimização do processo de extração.

Dentre estes, o modelo da equação virial baseada no conhecimento da pressão osmótica de um solvente, podemos citar: NRTL (*non random two liquid*) e Wilson. Ambos modelos são frequentemente utilizados para correlação e predição do equilíbrio de SAB constituído por polímero e sal (ZAFARANI-MOATTAR e NASIRI, 2010). A representação gráfica dos dados termodinâmicos do SAB é geralmente feita por meio de diagramas com 2 componentes (Figura 3.5). A concentração de um dos componentes é representada no eixo horizontal, e o teor do outro componente, no eixo vertical. A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por diferença.

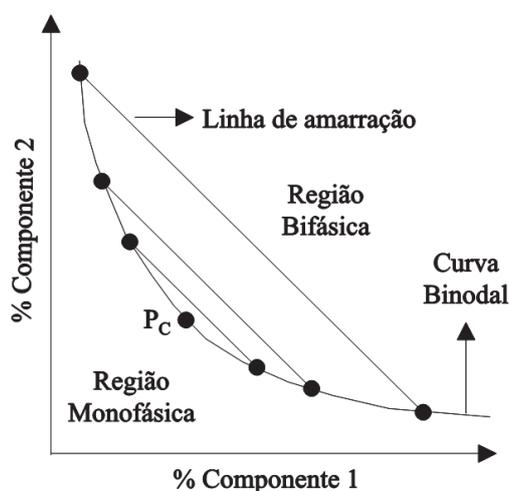


Figura 3.5: Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio.
Fonte: SILVA E LOH, 2006

Utilizando estes diagramas podemos obter em quais composições globais o sistema é monofásico ou bifásico, sendo estas duas regiões demarcadas por uma linha denominada curva binodal. Também são representadas as linhas de amarração ou *tie-lines*, que são retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer ponto sobre essa mesma linha fornecerá fases de topo e fundo com a mesma concentração de equilíbrio, porém com diferentes relações de volumes entre as fases (SILVA e LOH, 2006).

As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração e composição. O equilíbrio das duas fases dos SAB não altera a propriedade termodinâmica em dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases.

No SABs as fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio para a condição de equilíbrio

entre as fases (CARVALHO, 2004). A outra particularidade dos diagramas de fases é o ponto crítico (P_c), onde as propriedades físico-químicas das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986).

O comprimento da linha de amarração (usualmente referido como TLL) é um importante parâmetro termodinâmico, geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição. De acordo com Malpiedi *et al.* (2009), o aumento da TLL ocasiona uma diminuição do volume livre na fase de fundo do sistema, promovendo a partição da biomolécula para a fase de topo. Segundo Silva *et al.* (2006), o comprimento da linha de amarração pode ser calculado por meio da equação 3.1.

$$TLL = [(\Delta C_1)^2 + (\Delta C_2)^2]^{0,5} \quad (3.1)$$

onde: ΔC_1 e ΔC_2 são as diferenças de concentração do componente 1 e 2 entre as fases, respectivamente.

A distribuição desigual da biomolécula entre as duas fases é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a biomolécula e as outras espécies (polímeros, água e/ou sais inorgânicos) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (LUECHAU *et al.*, 2010). A distribuição de biomoléculas entre as fases aquosas dos SAB é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição, K , definido como:

$$K = \frac{C_T}{C_F} \quad (3.2)$$

onde: C_T e C_F são, respectivamente, as concentrações da proteína nas diferentes fases (T= topo ou F= fundo).

Além disto, propriedades importantes das fases também contribuem nesta distribuição, como a natureza química dos componentes formadores do SAB, a massa molar e concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com a biomolécula, pH, temperatura e a adição de sais inorgânicos (CHAIWUT *et al.*, 2010).

Entretanto, os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos ainda não são entendidos por completo. Para numerosos investigadores a partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos pode ser descrita com base na repulsão

entrópica ($\log K_S$), interações eletrostáticas ($\log K_{el}$) e hidrofóbicas ($\log K_{hy}$), e a força motriz eletroquímica proveniente do sal do sistema, onde o total da partição (K_{tot}) é dada por (JOHANSSON *et al.*, 2008):

$$\log K_{tot} = \log K_S + \log K_{el} + \log K_{hy} + \log K_{salt} \quad (3.3)$$

A adição de novos sais e a variação do pH e temperatura têm sido alternativas que podem influenciar a partição das biomoléculas. A adição de sais como por exemplo o NaCl, pode aumentar a diferença de hidrofobicidade entre as fases devido a diminuição da quantidade de água à superfície.

A exposição das partes hidrofóbicas das superfícies das biomoléculas promoverá interações entre fase hidrofóbica do polímero, aumentando assim o coeficiente de partição (ROSA *et al.*, 2010). E ainda a característica hidrofóbica da biomolécula também pode correlacionar o aumento da migração para a fase de topo (CHAIWUT *et al.*, 2010).

As concentrações de sal e álcool produzem um efeito sobre a solubilidade do composto alvo na fase rica em álcool e na fase rica em sal, alterando a composição do solvente de ambas as fases. O efeito *salting-out* dos sais pode levar à exclusão de pequenas moléculas de álcool miscíveis em água. A substância com alta hidrofobicidade é mais fácil de ser excluída da fase rica em sal para a fase rica em álcool. O efeito do *salting-out*, é a força motriz para a formação do SAB e a partição desigual do alvo. Portanto, a biomolécula alvo pode particionar-se para a fase rica em álcool, na sua forma catiônica hidrofílica (WANG *et al.*, 2010).

Ooi *et al.* (2009), descreveram que com adição de NaCl cria-se um potencial eletrostático que particiona fortemente a biomolécula para a fase de topo e melhora a sua recuperação. Em oposição, estudos realizados por Yang *et al.* (2010) mostraram que o aumento da concentração do NaCl em sistema aquoso bifásico, composto por 27% de PEG 1000 e 13% de NaH_2PO_4 , não foram significantes na partição de esterase.

Muitos pesquisadores investigam a correlação do pH em sistemas aquosos bifásicos. A concentração hidrogeniônica afeta a transferência dos aminoácidos, porque estes contêm uma elevada variedade de grupos ácidos e básicos com diferentes pK_a , resultando em cargas elétricas que são funções dos valores de pH. Esta densidade de carga elétrica na superfície dos aminoácidos pode modificar sua conformação, bem como processos de associação ou dissociação entre as macromoléculas presentes no

sistema podem ocorrer. Todos estes processos que ocorrem com o aminoácidos modificam sua interação com os componentes do sistema bifásico, alterando seu comportamento de partição. O pH também pode modificar a composição das fases dos SAB, seja a posição da linha binodal ou o comprimento das TLL (SILVA e LOH, 2006).

Também tem sido observado por outros autores o aumento do coeficiente de partição com o aumento do pH para algumas biomoléculas, como por exemplo: antibióticos (WANG *et al.*, 2010), cafeína (WILLIAMS *et al.*, 2010) e triptofano (TOME *et al.*, 2009). Para Saravanan *et al.* (2008) o pH pode afetar o coeficiente de partição, pela alteração da carga do soluto ou outras espécies presentes no sistema.

O efeito da temperatura no SAB varia de acordo com o tipo dos componentes. Sistemas PEG e dextrana quando submetidos a temperaturas elevadas necessitam de uma maior concentração dos polímeros para que haja a separação das fases, por este motivo este tipo de sistema normalmente é submetido a temperaturas inferiores a ambiente. Enquanto que para o sistema PEG / sal o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração do PEG na fase de topo, e conseqüentemente, ocorre a redução da concentração do polímero na fase de fundo (PESSOA-JUNIOR, 2005). De acordo com Coimbra *et al.* (2003), sistemas cuja composição se aproxima do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido a instabilidade inerente à região do ponto crítico.

A influência da temperatura nos sistemas aquosos bifásicos tem relação direta com o tipo de biomolécula que será empregada. Segundo Lima (2002), enzimas quando submetidas a temperatura elevadas nos sistemas aquosos bifásicos podem sofrer deterioração das suas estruturas secundárias e terciárias, levando a desnaturação. Neste caso as ligações covalentes são quebradas e eventualmente toda a estrutura é destruída, seguindo-se da agregação das mesmas. Para Saravanan *et al.* (2008) o efeito da temperatura é um fator muito importante na partição de aminoácido, todavia a sua influência também está relacionada com a composição do sistema, podendo ser constituído por polímero (GREVE e KULA, 1991), líquido iônico (DOMINGUEZ-PEREZ *et al.*, 2010) e álcool (OOI *et al.* (2009). Sob este enfoque ainda não foram relatados estudos avaliando a influência temperatura destes sistemas para tirosina, triptofano, tetraciclina e cafeína.

Capítulo 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais utilizados, bem como as metodologias empregadas para o desenvolvimento do trabalho. Estes estudos experimentais foram realizados nos Laboratórios de Pesquisa em Alimentos do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), situado no campus Aracaju-Farolândia da Universidade Tiradentes.

4.1. Materiais

O metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4), fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A cafeína (pureza nominal de 98,5 %) foi obtida da Sigma-Aldrich, Tirosina (> 99,5%) e o Triptofano (> 99,0%) foram fornecidos pela Fluka e a Tetraciclina (95-100%) foi obtida junto a DEG Farmaceutica (São Paulo-SP, Brasil). Todos os produtos químicos citados anteriormente foram de grau analítico. Água destilada e deionizada foi utilizada em todo o experimento.

4.2. Diagrama de Fases

Os diagramas de fases dos sistemas ternários foram formados usando soluções aquosas de alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) a 80% (p/p) e de sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4) a 40% (p/p). Estes sistemas foram construídos a 298,15 K e à pressão atmosférica, pela aplicação do método da turvação e método turbidimético (ALBERTSSON, 1986). A solução de tampão fosfato (pH 7,0) foi formada pela relação entre os sais de fosfato de potássio KH_2PO_4/K_2HPO_4 equivalente a 1,087. Deste modo para o diagrama de fases na solução alcoólica foi adicionado, sob agitação constante, gota a gota à solução aquosa do sal de fosfato de potássio até ocorrer a turvação (solução bifásica), em seguida foi adicionada

gotas de água até o desaparecimento da turvação (solução monofásica), procedimento que foi repetido continuamente. Assim a composição do sistema ternário foi determinada pela quantificação mássica de todo os componentes com uma precisão de $\pm 10^{-4}$ g.

As linhas de amarração (*tie lines* – TL) foram determinadas utilizando o método gravimétrico originalmente aplicado por Merchuck *et al.* (1998). Em um tubo de centrifuga com rosca para vedação (para evitar a volatilização do álcool), foram adicionados os componentes formadores do sistema de modo que o ponto de mistura estivesse localizado na região bifásica do diagrama de fases. A mistura foi preparada por agitação vigorosa, e em seguida deixada em repouso por no mínimo 18 h a 298,15 K e pressão atmosférica para atingir o equilíbrio. Após esta etapa, as fases de topo e fundo foram separadas, recuperadas e pesadas. Cada TL foi determinada pela aplicação da regra da alavanca para a relação entre a composição de massa na fase de topo e a composição global do sistema. Para esta proposição a curva experimental da solubilidade foi correlacionada usando a equação (4.1):

$$Y = A \exp[(BX^{0,5}) - (CX^3)] \quad (4.1)$$

onde Y e X são, respectivamente, as porcentagens em peso de álcool e sal, e A, B e C são constantes obtidas por regressão.

A determinação da composição da TL foi realizada resolvendo o seguinte sistema de quatro equações (4.2) a (4.5) para valores desconhecidos de Y_T , Y_B , X_T , X_B .

$$Y_T = A \exp[(BX_T^{0,5}) - (CX_T^3)] \quad (4.2)$$

$$Y_B = A \exp[(BX_B^{0,5}) - (CX_B^3)] \quad (4.3)$$

$$Y_T = (Y_M/\alpha) - ((1 - \alpha)/\alpha)Y_B \quad (4.4)$$

$$X_T = (X_M/\alpha) - ((1 - \alpha)/\alpha)X_B \quad (4.5)$$

onde os subscritos M, T e B, respectivamente, denotam a mistura, a fase de topo e a fase de fundo. O valor de α é a razão entre a massa da fase de topo e a massa total da mistura.

Para o cálculo do comprimento da linha de amarração (*tie lines lengths* - TLL) foi utilizada a equação (4.6):

$$TLL = \sqrt{(X_T - X_B)^2 - (Y_T - Y_B)^2} \quad (4.6)$$

Para todos os casos estudados a fase de topo é a fase rica em álcool e a fase de fundo aquela rica em sais de potássio.

4.3-Extração das Biomoléculas em Sistema Aquoso bifásico

A partição das biomoléculas (tirosina, triptofano, cafeína e tetraciclina) foi preparada em tubos de centrifuga de 15 mL providos de tampas de vedação para prevenir a vaporização dos alcoóis. Quantidades adequadas dos componentes dos sistemas álcoois e sais de fosfato de potássio para perfazer uma solução de concentração de 40-60 % (p/p) e 10 - 20% (p/p), respectivamente, foram pesadas e sobre elas foram adicionadas uma soução aquosa das biomoléculas - tirosina, triptofano, cafeína e tetraciclina, de forma a se ter uma concentração total de biomolécula de 10 mg/L para uma masssa total do sistema de 14,0 g. Depois de uma homogenização completa por agitação vigorosa, cada sistema foi centrifugado a 3000 x g por 10 min, para induzir a separação das fases, e em seguida deixado em repouso por no mínimo 18 h para atingir o equilíbrio.

Após este tratamento, ambas as fases tornaram-se claras e transparentes e a interface bem definida. As fases foram cuidadosamente separadas com auxílio de uma pipeta para a fase de topo e uma seringa com uma agulha longa para a fase de fundo, e em seguida foram determinados os volumes de cada fase. As temperaturas avaliadas foram entre 278.15 K a 308.15 K.

O coeficiente de partição (K) foi definido como a relação entre as concentrações das biomoléculas na fase de topo e fundo. A fim de avaliar o processo de extração, a razão volumar (R_v) e a eficiência da extração das biomoléculas (E -%) foram calculados de acordo com Souza *et al.* (2010), e apresentados nas equações (4.7) a (4.9).

$$K = \frac{C_T}{C_F} \quad (4.7)$$

$$R_v = \frac{V_T}{V_F} \quad (4.8)$$

$$E = 100 \times \left(\frac{K \times R_v}{1 + K \times R_v} \right) \quad (4.9)$$

onde: C é a concentração das biomoléculas, V é o volume, E a eficiencia de extração e T e F correspondem as fases de topo e fundo, respectivamente.

A otimização da partição das biomoléculas foi iniciada com o estudo do efeito dos tipos de álcoois e sais de fosfato de potássio empregado, nesta fase elegeu-se a combinação de parâmetros que propiciava a migração da molécula ou para a fase rica em álcool ($K > 1,0$) ou para a fase rica sem sal de fosfato de potássio ($K < 1,0$). Em seguida variou-se as concentrações do sal de fosfato de potássio escolhido (10 a 20 %, p/p), do álcool elegido (40 a 60 %, p/p), da temperatura de extração entre 278,15 a 303,15 K, da adição de eletrólitos com variação dos cátions (BaCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 , LiCl , NaCl e KCl) e dos ânions (NaSCN , NaI , NaBr , NaNO_3 , NaCl , Na_2HPO_4 , Na_2SO_4 e NaF) na concentração de 0,1 % (p/p) e em seguida estudou-se a concentração de eletrólitos, usando NaCl (0,5 a 5,0 %, p/p).

4.4-Determinação da Concentração das Biomoléculas

A determinação das concentrações das biomoléculas nas fases do sistema estudados foi realizada por meio de espectroscopia UV-Vis, utilizando o aparelho Varian Cary-50 Espectrofotômetro UV-visível Bio, em comprimentos de onda definidos por meio da máxima absorção (L-tirosina - 270 nm, L-triptofano – 280 nm, tetraciclina – 275 nm e cafeína - 275 nm). Curvas de calibração, para cada biocomposto, foram previamente determinadas. Na verificação da interferência dos sais inorgânicos e dos alcoóis foi utilizado o método analítico da verificação de sobreposição de picos de absorção máxima no espectro de varredura na região do UV-Vis.

4.5-Determinação das Funções Termodinâmicas

As variações da energia livre de Gibbs (ΔG_m°), da entalpia (ΔH_m°) e da entropia (ΔS_m°) associadas ao coeficiente de partição das biomoléculas foram determinadas por meio da equação de Vant' Hoff em diferentes temperaturas (278,15 a 308,15 K), de acordo com as equações (4.10) e (4.11):

$$\ln K = -\frac{\Delta H_m^\circ}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_m^\circ}{R} \quad (4.10)$$

$$\Delta G_m^\circ = \Delta H_m^\circ - T\Delta S_m^\circ \quad (4.11)$$

onde T é a temperatura (Kelvin) e R é a constante dos gases ideais.

Capítulo 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento da dissertação. Primeiramente foi abordada a influência dos constituintes dos sistemas aquosos bifásicos nas determinações analíticas das biomoléculas, de forma a validar os métodos analíticos de quantificação das biomoléculas. Na sequência os diagramas de fases para todos os sistemas são apresentados, inclusive com os parâmetros de ajuste do modelo matemático para a curva binodal, bem como algumas linhas de amarração para cada sistema. Uma vez determinadas as regiões bifásicas, foram realizados experimentos para otimizar as melhores condições para a extração das biomoléculas (L-tirosina, L-triptofano, tetraciclina e cafeína).

5.1 Influência dos constituintes do SAB nas determinações das biomoléculas

Para avaliar a influência dos constituintes do sistema aquoso bifásico na determinação de biomoléculas, foi realizada uma varredura no espectro UV-visível para as soluções aquosas dos alcoóis e sais de fosfato de potássio a 40% (p/p), bem como de solução aquosa das biomoléculas (40 mg/L), como mostra a Figura 5.1. Observou-se primeiramente que os comprimentos de onda que garantem a máxima absorção foram 270 nm para a L-tirosina, 280 nm para o L-triptofano, 275 e 355 nm para a tetraciclina e 275 nm para a cafeína. Os valores encontrados na literatura para o comprimento de onda de máxima absorção de L-tirosina foi 270 nm (ZAIA *et al.*, 1998), para o L-triptofano foi de 287 nm (TOMÉ *et al.*, 2010), para a tetraciclina foi 269 e 356 nanômetros (MEDINA *et al.*, 2000) e para a cafeína o comprimento de onda foi 274,7 nm (BELAY *et al.*, 2007). Para a tetraciclina a ocorrência de dois picos de absorção é decorrente da complexidade da estrutura molecular da biomolécula, comumente o comprimento de onda utilizado é 356nm, como descrito por Medina *et al.* (2000). Os valores encontrados para as demais biomoléculas estão de acordo com a literatura.

Para todos os casos não foi observada nenhuma interferência dos componentes do sistema na quantificação da concentração das biomoléculas, sendo que o valor da absorbância encontrado para a biomolécula é maior que 90% do valor encontrado para os constituintes do sistema.

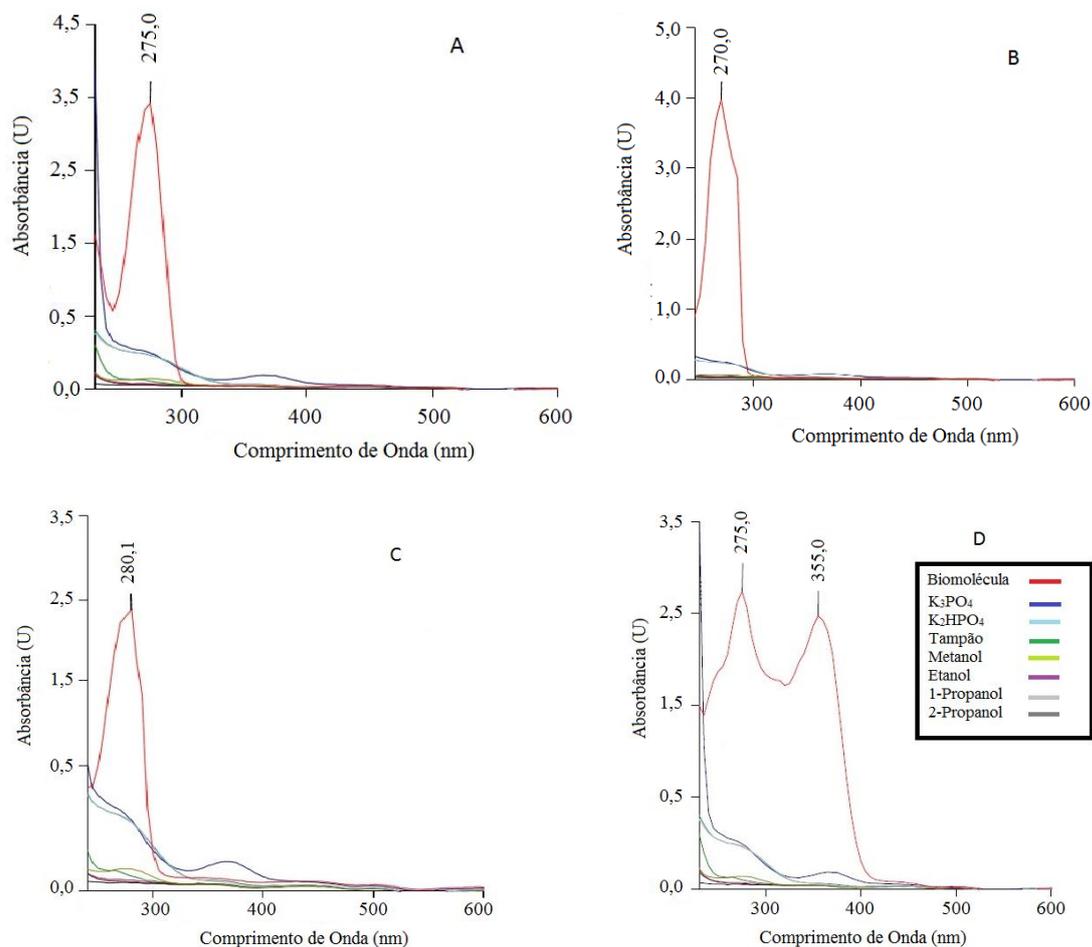


Figura 5.1: Espectro de absorção dos constituintes do sistema e da solução de biomoléculas (40 mg/L) (A-cafeína, B-Tirosina, C-Triptofano e D-Tetraciclina).

5.2- Diagrama de Fases

A capacidade de formação de sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 , e tampão fosfato K_2HPO_4/KH_2PO_4) foram analisados no presente estudo. Os diagramas de fase foram determinados a 298,15 K a pressão atmosférica. Os dados de

fração mássica para todos os sistemas investigados são apresentados nas Tabelas A1 a A5 do Anexo A. Os diagramas de fases, apresentados nas Figuras 5.2 e 5.3, podem ser avaliados por diferentes critérios, observando o efeito do álcool enquanto é mantido o tipo do sal de fosfato de potássio, ou averiguando a influência do sal inorgânico na formação das fases para cada álcool. A discussão foi realizada utilizando unidades de molalidade para evitar discrepâncias no comportamento do diagrama de fases, os quais são um resultado direto das diferenças das massas moleculares dos constituintes.

De acordo com a Figura 5.2, é possível concluir que os alcoóis com cadeia alquílica mais longa têm, em geral, maior habilidade para formar SAB. A facilidade de formação de fases segue a tendência 1-propanol (97,2 °C) > 2-propanol (82,3 °C) > etanol (78,3 °C) > metanol (64,6 °C). O que está de acordo com a diminuição do ponto de ebulição do álcool (expresso entre parênteses).

É bem conhecido que a solubilidade de um álcool alifático em água depende do comprimento da cadeia alquílica, e decresce com o aumento do número de átomos de carbono (VENTURA *et al.*, 2012). Geralmente, os solventes com maior hidrofobicidade têm uma menor capacidade para serem dissolvidos em água, assim, podem ser facilmente excluído para a fase oposta (rica em álcool). Portanto, alcoóis com uma baixa afinidade pela água são facilmente separados do meio aquoso pela adição de sais inorgânicos (efeito do *salting-out*), ou seja, quanto maior a cadeia alquílica maior a hidrofobicidade e conseqüentemente, maior a facilidade de formação de sistemas aquosos bifásicos. Para os sistemas constituídos por K_2HPO_4 e K_3PO_4 , o álcool com uma cadeia alquílica ramificada como o 2-propanol, é menos efetivo na formação de sistemas líquido-líquido, quando comparado com o isômero 1-propanol. Estes resultados estão de acordo com a literatura (WANG *et al.*, 2010; GREVE e KULA, 1991) onde se mostra que essa tendência pode ser explicada pela maior hidrofobicidade do 1-propanol, a qual é confirmada pelo maior coeficiente de partição octanol-água que é da ordem de 1,78 quando comparado com o valor deste parâmetro para o 2-propanol que é 1,12 (OLIFERENKO *et al.*, 2004).

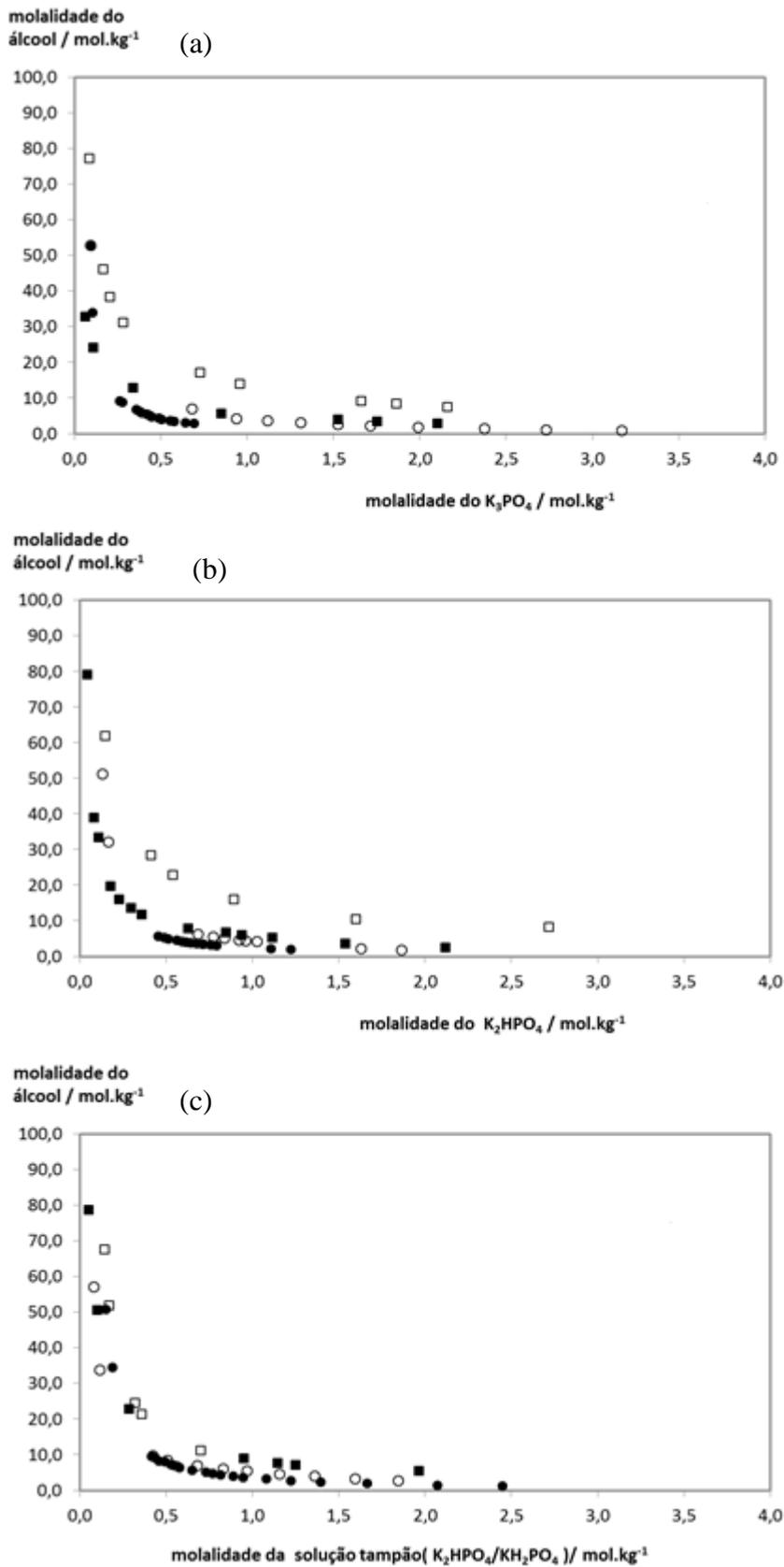


Figura 5.2: Representação do diagrama de fases para os sistemas formados por diferentes alcoóis: metanol - □, etanol - ■, 1-propanol - ● e 2-propanol - ○ e diferentes sais inorgânicos: K_3PO_4 (a), K_2HPO_4 (b) e KH_2PO_4/K_2HPO_4 (c).

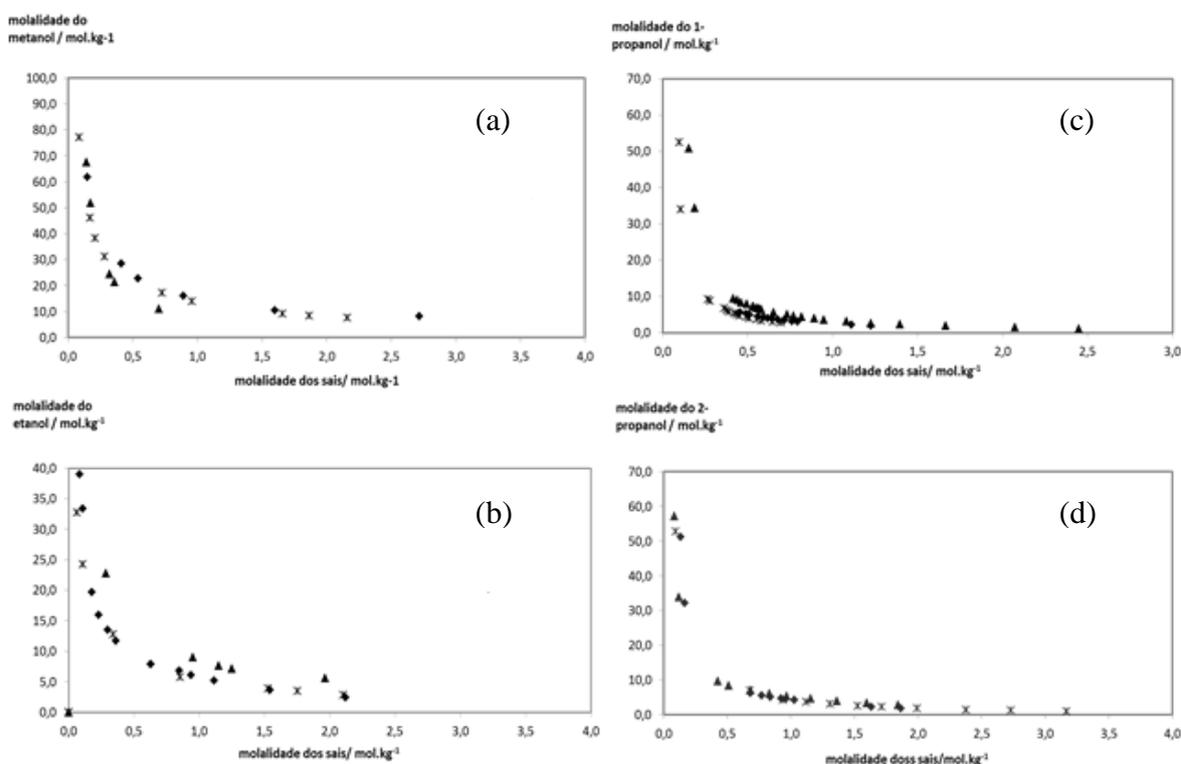
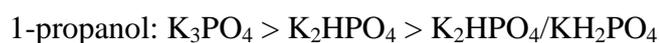


Figura 5.3: Representação do diagrama de fases para os sistemas formados por diferentes sais inorgânicos: K_3PO_4 (x), K_2HPO_4 (♦) e KH_2PO_4/K_2HPO_4 (▲) e diferentes alcoóis: metanol (a), etanol (b), 1-propanol (c) e 2-propanol (d).

Segundo Wang *et al.* (2010) também deve ser pontuado que, de forma geral, a separação de fases é governada pela competição das interações álcool-água e sal-água, as quais ainda não são suficientes para explicar o comportamento da formação das fases. Provavelmente a capacidade dos alcoóis utilizados promoverem a formação de fases está correlacionada com a atuação das interações entre as moléculas dos alcoóis, e com seu ponto de ebulição. As forças que estabilizam as interações entre as moléculas dos alcoóis também são cruciais no comportamento de formação das fases. A diferença de temperatura (15 °C) no ponto de ebulição dos isômeros 1-propanol e 2-propanol reflete no aumento da capacidade do 1-propanol estabilizar as forças de van der Waals, e assim facilita a exclusão deste álcool da fase rica em sal para a fase rica em álcool (WANG *et al.*, 2010). Este mesmo argumento pode ser utilizado para explicar a pequena diferença na capacidade de formação dos sistemas aquosos bifásico para etanol e 2-propanol correlacionada com a pequena diferença dos pontos de ebulição destes componentes (4,0 °C), caracterizando sistemas com similar interações ente as moléculas do álcool.

A influência dos três sais de fosfato de potássio na formação do sistema aquoso bifásico pode ser avaliada pelos diagramas de fase (Figura 5.3). O decréscimo na capacidade dos sais de fosfato de potássio em promover a separação de fases segue a seguinte ordem:



A capacidade dos sais inorgânicos em promover a separação de fases já foi investigada como parte de diferentes sistemas ternários (VENTURA *et al.*, 2011; VENTURA *et al.*, 2012). Em geral, o efeito desses sais inorgânicos segue a série de Hofmeister $K_3PO_4 > K_2HPO_4 > K_2HPO_4/KH_2PO_4$ (VENTURA *et al.*, 2011). No entanto, esta tendência só foi verificada para sistemas compostos por 1-propanol, nos demais sistemas a posição do tampão fosfato variou, contudo é possível confirmar a alta capacidade de separação de fase do K_3PO_4 . Este comportamento é corroborado com dados da literatura e está relacionada com a idéia de que ânions com forte habilidade de induzir efeito *salting-out* como PO_4^{3-} e HPO_4^{2-} , exibem uma forte capacidade para criar um complexo de hidratação com a água excluindo o álcool para a outra fase, e desta forma, favorecendo a formação de SAB (HE *et al.*, 2005). Também de acordo com a literatura, os sais utilizados na solução tampão (K_2HPO_4/KH_2PO_4) têm uma menor capacidade para a formação de SAB, devido à presença de KH_2PO_4 que tem habilidade de induzir o efeito de *salting-in*.

O KH_2PO_4 não é capaz, por si só, de promover a formação SAB com alcoóis, no entanto, neste trabalho, o comportamento "normal" da solução tampão fosfato foi detectado apenas para o sistema contendo 1-propanol. Na tentativa de explicar este comportamento, o pH de ambas as fases, topo e fundo de cada sistema, foi medido (Tabela 5.1). Observou-se que o valor de pH foi influenciado pelo sal e que a adição de alguns destes alcoóis em soluções aquosas do tampão fosfato de potássio é responsável pela destruição da condição de tampão, haja vista que o valor de pH esperado pela fase foi significativamente diferente. A condição tampão foi perdida na maioria dos sistemas,

com a exceção do sistema constituído por 1-propanol. Assim, para os sistemas ternários compostos por K_2HPO_4/KH_2PO_4 e os alcoóis metanol, etanol e 2-propanol, o efeito não é governado pela força iónica do tampão fosfato e respectivas interações, mas é induzido pela presença de dois tipos diferentes de sais inorgânicos, K_2HPO_4 e KH_2PO_4 como espécies iónicas individuais, as quais migram diferentemente entre as fases do sistema.

Tabela 5.1: Os valores de pH das fases de topo (T) e fundo (B) para os sistemas de álcool +água + sal inorgânico, a 298 K e à pressão atmosférica utilizados na extração de biomoléculas.

Sistema ternario		pH (T)	pH (B)
K_3PO_4	metanol	12,79	13,20
	etanol	12,80	13,22
	1-propanol	12,38	12,69
	2-propanol	12,61	12,83
K_2HPO_4	metanol	10,34	9,76
	etanol	9,78	9,52
	1-propanol	9,69	9,01
	2-propanol	9,85	9,15
K_2HPO_4/KH_2PO_4	metanol	8,68	8,99
	etanol	7,70	8,01
	1-propanol	7,88	7,64
	2-propanol	8,08	7,31

Os SAB formados por alcoóis e solução tampão fosfato de potássio não foram encontrados na literatura, por esta razão uma comparação entre os resultados encontrados neste trabalho e os da literatura não foi possível de ser realizada. Evidentemente, a utilização destes sistemas ternários para fins de extração deve ser cuidadosamente analisada, principalmente quando o valor de pH não seja próximo da neutralidade e em sistemas formados por metanol, etanol ou 2-propanol.

As curvas binodais experimentais descritas anteriormente foram correlacionados utilizando o ajuste matemático originalmente descrito por Merchuck *et al.* (1998), por meio da aplicação da equação (4.1). Os parâmetros da regressão A, B e C, os respectivos desvios padrões (σ), e os coeficientes de correlação (r^2), estão apresentados na Tabela 5.2. Também foram determinadas as linhas de amarração (*tie lines* – TL) e os

respectivos comprimentos das linhas de amarração (*tie lines lengths* – TLLs), cujos valores estão apresentados na Tabela 5.3, juntamente com as composições do sal inorgânico e de álcool no ponto de mistura (M) e nas fases de topo (T) e fundo (B).

Tabela 5.2: Parâmetros de correlação da equação (4.1) e seus respectivos desvios padrões usados para descrever a curva bimodal para o sistema ternário alcoólico.

Sistema ternário		Parâmetros de Regressão			r^2
Álcool	Sal Inorgânico	$A \pm \sigma$	$B \pm \sigma$	$C \pm \sigma$	
metanol	K ₃ PO ₄	105,6 ± 2,0	-0,304 ± 0,010	2,3x10 ⁻¹⁴ ± 2,1x10 ⁻⁶	0,9981
	K ₂ HPO ₄	109,3 ± 3,2	-0,315 ± 0,014	6,2x10 ⁻¹⁴ ± 3,2x10 ⁻⁶	0,9967
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	162,2 ± 5,8	-0,592 ± 0,023	1,5x10 ⁻¹⁵ ± 6,0x10 ⁻⁵	0,9988
etanol	K ₃ PO ₄	91,0 ± 2,5	-0,359 ± 0,016	2,1x10 ⁻⁶ ± 3,5x10 ⁻⁶	0,9985
	K ₂ HPO ₄	112,4 ± 4,8	-0,462 ± 0,027	1,2x10 ⁻¹³ ± 2,1x10 ⁻⁵	0,9923
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	108,8 ± 1,9	-0,362 ± 0,011	8,8x10 ⁻¹⁴ ± 5,6x10 ⁻⁶	0,9990
1-propanol	K ₃ PO ₄	219,5 ± 10,0	-0,774 ± 0,027	4,3x10 ⁻¹³ ± 4,6x10 ⁻⁵	0,9958
	K ₂ HPO ₄	135,4 ± 10,2	-0,620 ± 0,027	1,5x10 ⁻¹⁵ ± 9,7x10 ⁻⁶	0,9973
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	218,8 ± 6,5	-0,708 ± 0,013	2,4x10 ⁻¹³ ± 7,3x10 ⁻⁶	0,9960
2-propanol	K ₃ PO ₄	146,7 ± 2,9	-0,466 ± 0,010	7,7x10 ⁻⁶ ± 1,9x10 ⁻⁶	0,9986
	K ₂ HPO ₄	170,7 ± 4,3	-0,554 ± 0,013	8,4x10 ⁻⁶ ± 6,7x10 ⁻⁶	0,9988
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	128,1 ± 4,9	-0,470 ± 0,021	1,9x10 ⁻¹³ ± 1,2x10 ⁻⁵	0,9939

As Figuras 5.4 a 5.6 apresentam as curvas binodais e linhas de amarração para os sistemas ternários utilizados neste trabalho. As informações das linhas de amarração são cruciais para o processo de extração de qualquer composto usando os sistemas propostos. Usualmente, as concentrações dos alcoóis e sais usados para formar os sistemas bifásicos aumentam, assim o comprimento da linha de amarração aumenta e a composição das fases de topo e fundo ficam cada vez mais diferentes (NEVES *et al.*, 2009; SALABAT, 2001). Nos resultados apresentados para o sistema metanol + K₂HPO₄ + água, a composição total do sistema não tem um efeito significativo sobre a inclinação da TL, o que implica que as TL são quase paralelas uma à outra. Em outros casos, por exemplo, para o sistema ternário 2-propanol + K₃PO₄ + água, os resultados indicam que para TLL curtas, as TL foram aproximadamente paralelas, enquanto que para TLL longas, a inclinação da linha de amarração começou a variar. Estes desvios

nas inclinações das TL estão de acordo com a literatura (PEREIRA *et al.*, 2010) e foram relacionados com o fato de que, nos TLL longos, a fase rica em sal é cada vez mais livres do álcool.

Tabela 5.3: Composições experimentais das fases em peso para TLS e seus respectivos comprimentos de linha (TLLs) e suas respectivas composições topo (T) e fundo (B) fase de álcool (Y) e fase do sal (X), a 298.15 K.

Sistema ternário		100 × Composição da Fração mássica%, (p/p)						TLL
Álcool	Sal Inorgânico	Y_M	X_M	Y_T	X_T	Y_B	X_B	
metanol	K_3PO_4	34,92	20,07	46,44	7,32	14,53	42,65	47,61
		41,95	26,08	66,47	2,32	10,83	56,23	77,47
	K_2HPO_4	38,33	19,13	55,65	4,59	15,60	38,20	52,28
		44,81	24,83	70,92	1,89	10,59	54,89	80,31
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	39,95	19,95	51,93	3,70	1,04	72,77	85,79
		30,65	15,27	39,39	5,71	2,99	45,52	53,94
		24,94	14,95	30,38	8,00	3,42	42,49	43,77
etanol	K_3PO_4	29,92	14,95	42,52	4,49	12,17	29,70	39,45
		34,81	20,52	60,74	1,27	8,10	40,35	65,56
	K_2HPO_4	29,65	20,44	53,30	2,22	9,62	35,87	55,14
		24,84	14,87	33,48	6,86	9,15	29,43	33,19
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	35,01	19,84	59,34	1,91	5,73	41,40	66,58
		39,92	19,97	57,73	3,06	8,43	49,88	67,98
		45,02	19,94	66,09	1,90	8,07	51,58	76,39
1-propanol	K_3PO_4	49,81	14,98	83,95	1,54	2,47	33,61	87,57
		30,03	14,97	72,09	2,07	5,61	22,46	69,54
	K_2HPO_4	19,99	14,99	55,56	2,06	9,10	18,95	49,43
		21,04	19,04	65,36	1,38	6,09	25,00	63,80
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	20,05	20,03	52,94	4,02	5,49	27,12	52,77
		25,04	20,41	58,13	3,51	4,25	31,03	60,50
		30,52	19,72	63,01	3,29	8,92	30,64	60,61
2-propanol	K_3PO_4	34,27	20,72	71,38	2,39	7,10	34,14	71,69
		24,91	20,14	53,99	4,60	10,71	27,72	49,07
	K_2HPO_4	29,87	14,95	50,74	4,79	9,49	24,86	45,87
		49,91	15,04	77,55	2,03	3,94	36,68	81,36
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	34,89	24,94	48,53	4,26	2,21	74,51	84,15
		25,06	14,98	41,18	5,82	15,13	20,62	29,96

Além disso, o aumento das concentrações de sal ou álcool também promove o aumento na divergência de fase (WANG *et al.*, 2010). Assim, a partição de moléculas comuns em SAB depende da TLL considerada, o que reflete na hidrofiliicidade/hidrofobicidade das fases. Uma vez que a preferência de soluto para uma fase em relação ao outro é aumentado pelo incremento na diferença de polaridade das fases polaridades (geralmente descrito pela TLL), a preferência de fase entre um dado precursor e o produto, em uma determinada reação, pode ser ajustada simplesmente por meio do controle da composição do sistema aquoso bifásico (WILLAUER *et al.*, 2002).

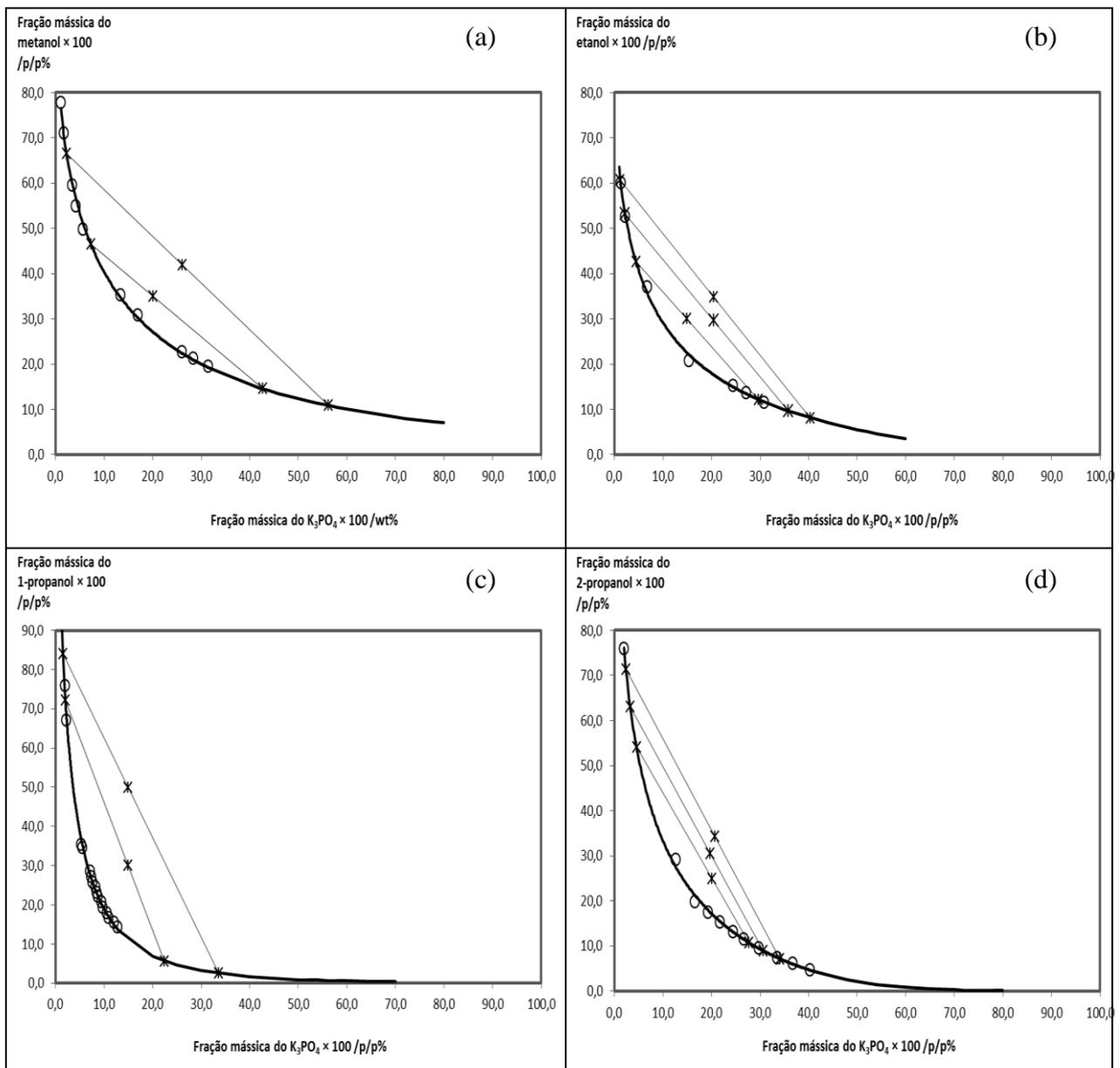


Figura 5.4: Diagrama de fase para álcool + K_3PO_4 + água em sistema ternário a 298.15 K. Onde (○) fase experimental; (*) TL.(a) Metanol, (b) etanol, (c) 1-propanol e (d) 2-propanol.

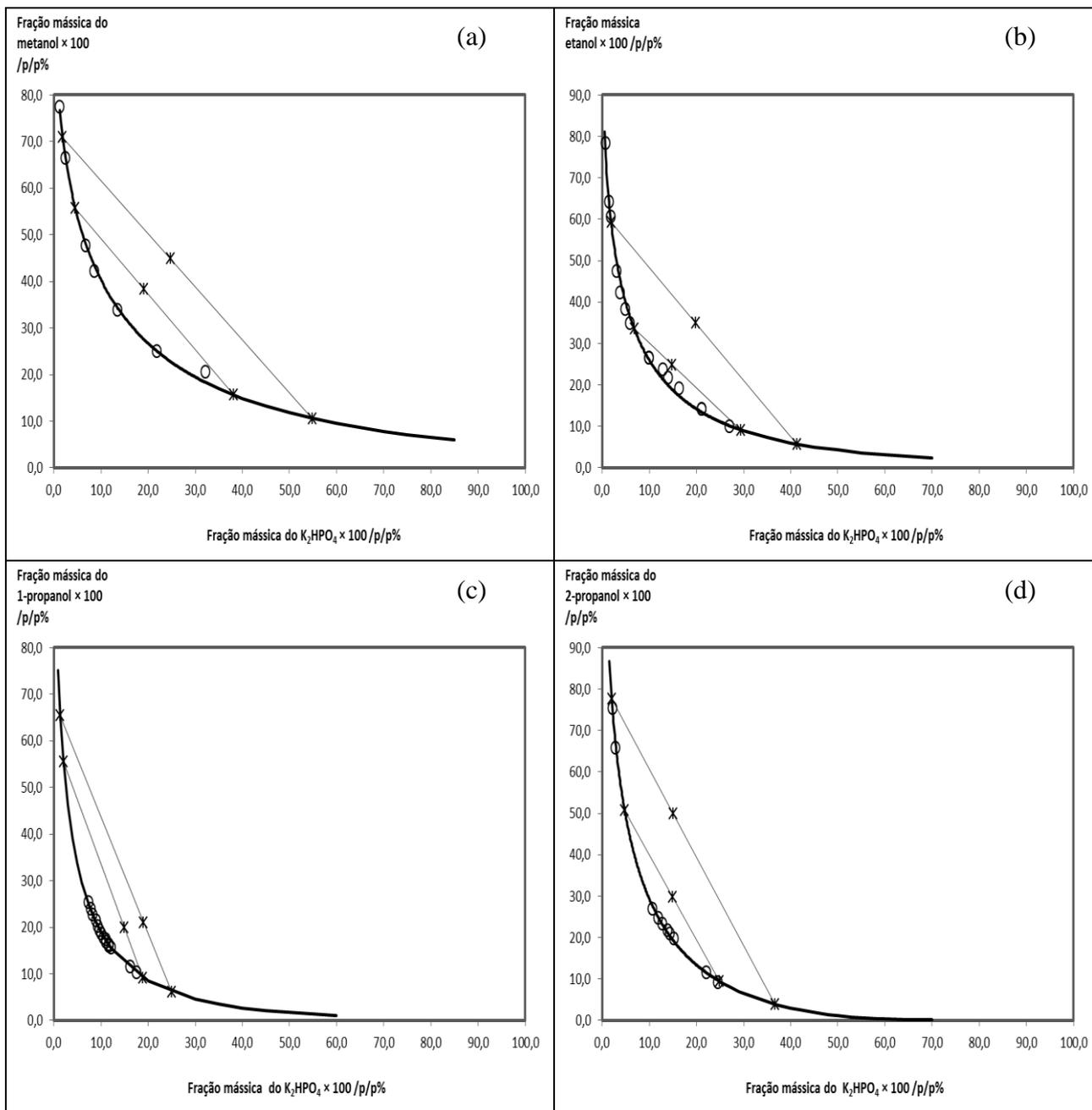


Figura 5.5: Diagrama de fase para álcool + K_2HPO_4 + água em sistema ternário a 298.15 K. Onde (O) fase experimental; (*) TL.(a) Metanol, (b) etanol, (c) 1-propanol e (d) 2-porpanol.

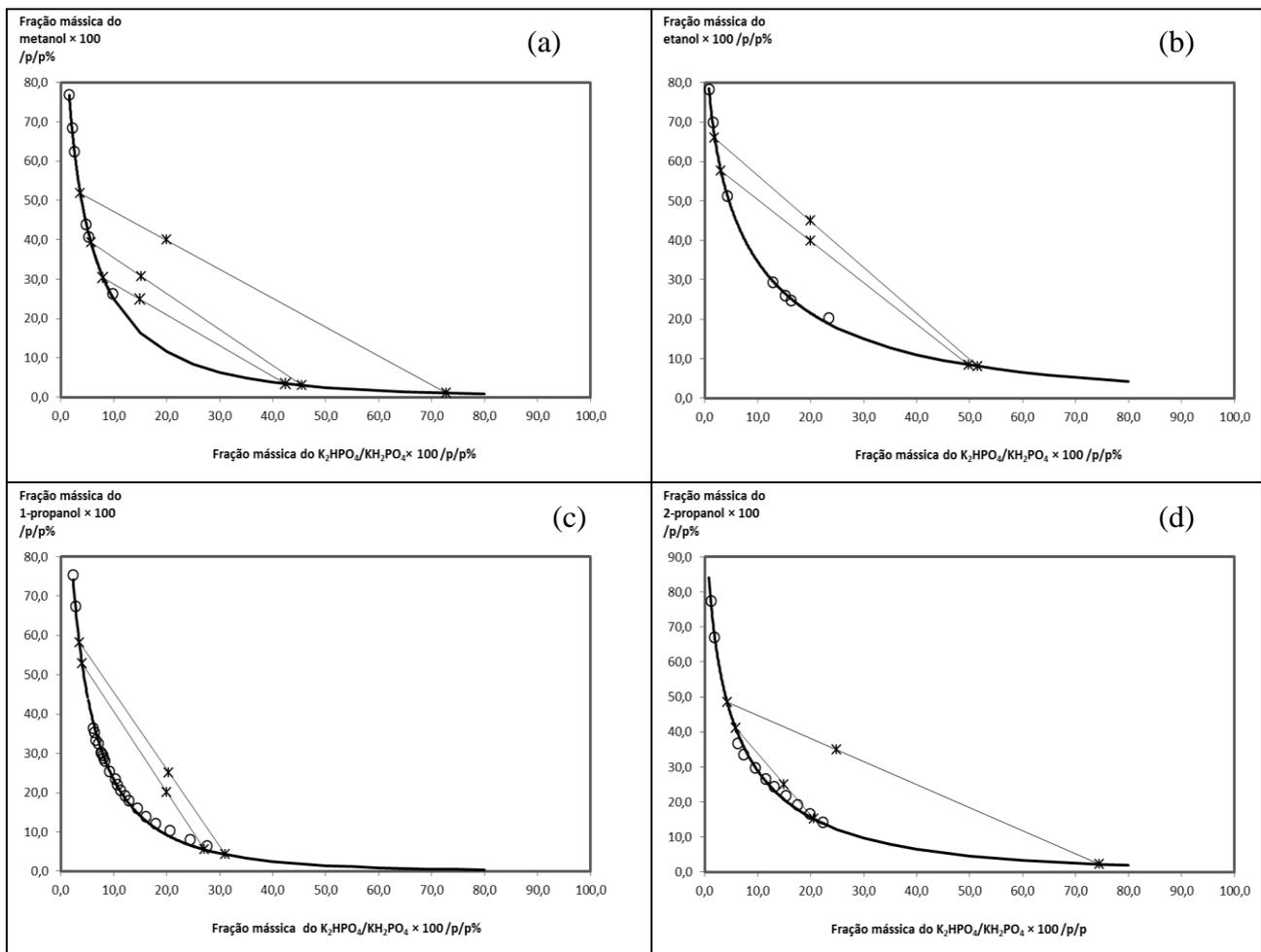


Figura 5.6: Diagrama de fase para álcool + K₂HPO₄/ KH₂PO₄ + água em sistema ternário a 298.15 K. Onde (○) fase experimental; (*) TL.(a) Metanol, (b) etanol, (c) 1-propanol e (d) 2-porpanol.

5.3-Partição das Biomoléculas

Os sistemas aquosos bifásicos, cujos diagramas de fase e linhas de amarração foram construídos e apresentados no item 5.2, foram utilizados para otimizar o processo de partição de diferentes biomoléculas como os aminoácidos (L-tirosina e L-triptofano), o antimicrobiano (tetraciclina) e o alcalóide (caféina). Os resultados para esta averiguação são apresentados nos ítems abaixo.

Em todos os processos de otimização da partição a escolha do tipo do álcool e do sal ocorreu utilizando como ponto de mistura a composição de álcool e sal de fosfato de potássio de 50% (p/p) e 15% (p/p) respectivamente, a temperatura de 298,15 K. Os experimentos foram realizados em triplicata e os desvios padrões para os valores dos

coeficientes de partição e eficiência de extração encontrada para todos os sistemas foram inferiores a 10%.

5.3.1-Aminoácidos (*L*-tirosina e *L*-triptofano)

O processo de otimização da partição dos aminoácidos foram realizados utilizando os sistemas, cujos diagramas de fase foram construídos neste trabalho. Os resultados da partição dos aminoácidos nos sistemas formados com os diferentes alcoóis e sais de potássio estão apresentados na Figura 5.7.

Os processos de partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos formados por compostos orgânicos e sais inorgânicos são regidos pela hidrofobicidade do composto orgânico, especificamente pelo comprimento da cadeia alquílica (número de átomos de carbono) e pelo efeito do *salting-out* promovido pela adição dos sais inorgânicos (FREIRE *et al.*, 2010). Os resultados da partição dos aminoácidos mostram que o aumento da cadeia alquílica do álcool possibilita o aumento do coeficiente de partição. Outra possibilidade de explicação para este efeito é a interação dos aminoácidos com os álcoois formadores de sistemas, segundo Wang *et al.* (2010) o aumento da constante dielétrica do álcool possibilita a maior facilidade de formação de ligações de hidrogênio, e conseqüentemente maior interação entre as moléculas do álcool. Deste modo a ordem decrescente para os valores desta constante é:

metanol (33,1) < etanol (24,3) < 1-propanol (20,52) < 2-propanol (19,70).

Comparando os coeficientes de partição dos aminoácidos entre si para cada álcool, pode-se notar que os valores dos coeficientes de partição para a *L*-tirosina são maiores que os do *L*-triptofano. Essa diferença é decorrente do número de pontes de hidrogênio que podem ser estabelecidas com os alcoóis, que no caso da tirosina ocorrem 4 possibilidades de formação de pontos de hidrogênio, enquanto que no triptofano são apenas 3.

Para as extrações da *L*-tirosina a composição do sistema com maior coeficiente de partição ($K_{tir} = 2,66$) foi 2-propanol e K_2HPO_4 , para o *L*-triptofano a composição do sistema com maior $K_{trp} = 1,26$ ocorreu para 1-propanol e K_2HPO_4 . Estes sistemas foram os escolhidos para continuar no processo de orimização da partição dos aminoácidos.

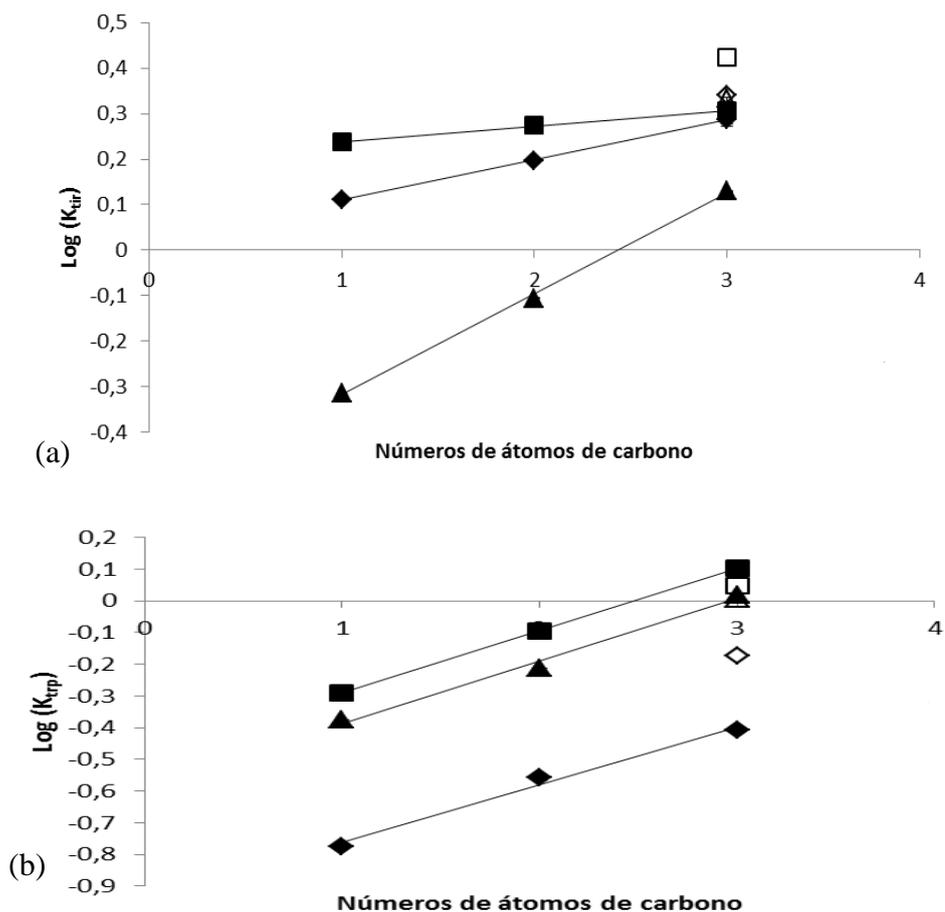


Figura 5.7: Influência do tipo de álcool (1=metanol, 2=etanol e 3 =1-propanol) e fosfato de potássio (▲ - K₃PO₄, ■ - K₂HPO₄ e ◆ - K₂HPO₄/KH₂PO₄ tampão) sobre o coeficiente de partição dos aminoácidos usando 50%, (p/p) de álcool e 15% (p/p) o de fosfato de potássio em 298,15K. O símbolo aberto representa 2-propanol. [(a) L-tirosina e (b) L-triptofano].

Após essa determinação, foi mantida a concentração constante do álcool (50%, p/p), para cada aminoácido e variamos a concentração do K₂HPO₄ de 10,0 a 20,0% (p/p) e os resultados são demonstrados na Figura 5.8.

Com o aumento da concentração do sal aumentou a exclusão das moléculas de água para a fase de topo, devido ao efeito *salting-out*, e conseqüentemente os aminoácidos foram arrastados pela migração da água para a fase de topo. Os coeficientes de partição atingiram valores de K_{tir}=2,78 e K_{trp}=1,92. Também foi observado que os valores de eficiência de extração foram elevados de 73,78% para 86,84% e de 69,70% para 76,85%, para L-tirosina e L-triptofano respectivamente (Figura 3), Freire *et al.* (2011) verificou que para sistemas utilizando líquido iônico

([C4mim][CF₃SO₃] - 40%, p/p) e carboidratos (25%, p/p) a eficiência de extração não excediam 50%.

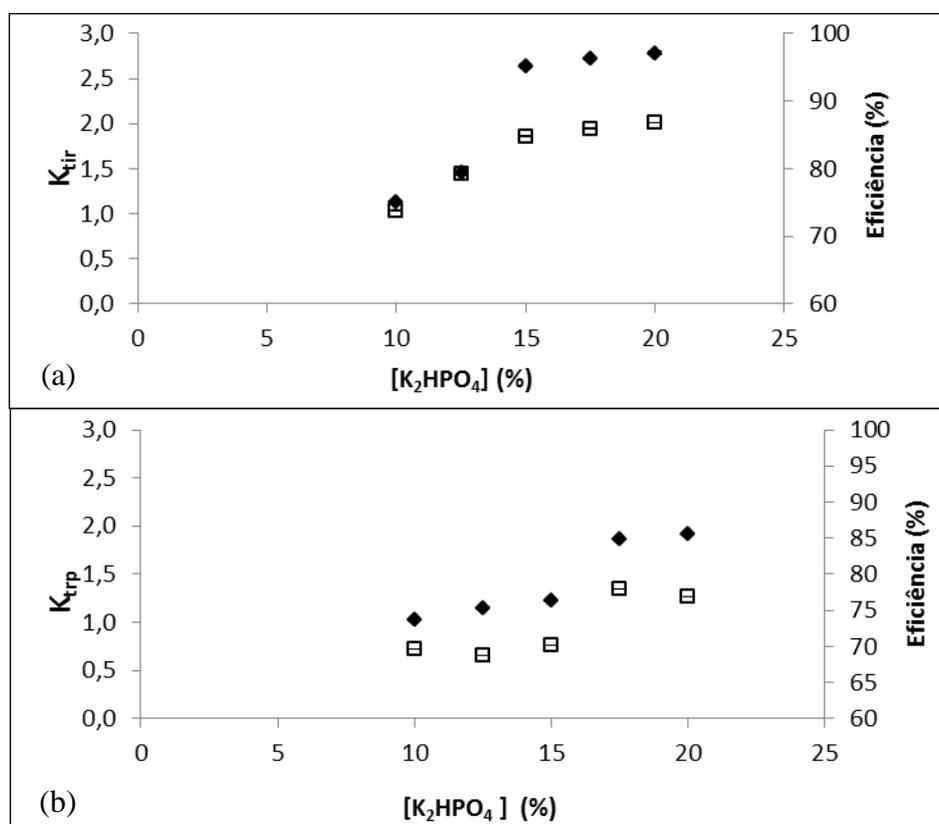


Figura 5.8: O coeficiente de partição (\blacklozenge) e eficiência de extração (\square) dos aminoácidos em função variação da concentração do sal (10-20%, p/p) com seu respectivo álcool (50%, p/p) a 298.15 K. [(a)- L-tirosina, (b) L-triptofano]

A análise da influência da variação da concentração do álcool (40, 45, 50, 55 e 60%, p/p) sobre o coeficiente de partição de aminoácidos foi estudada no sistema 2-propanol/ K_2HPO_4 (20% p/p) para a L-tirosina e no sistema 1-propanol/ K_2HPO_4 (20%, p/p) para o L-triptofano (Figura 5.9).

Observou-se efeitos antagônicos na partição dos aminoácidos, com o aumento da concentração do álcool promoveu uma diminuição do coeficiente de partição da L-tirosina e das eficiências de extração, enquanto que para o L-triptofano ocorre um sutil aumento do coeficiente de partição e da eficiência de extração. Com o aumento da concentração do álcool no sistema ocorre uma desidratação da fase de fundo, favorecendo a migração do L-triptofano para a fase de topo.

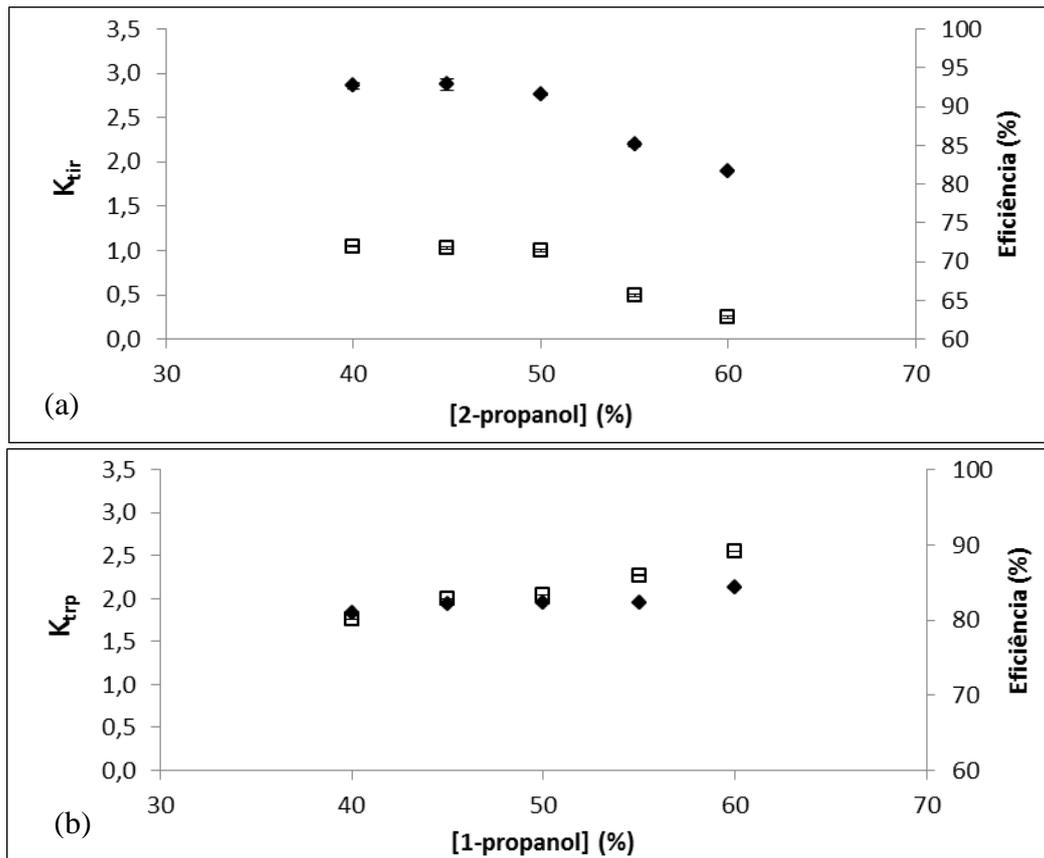


Figura 5.9: O coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) dos aminoácidos em função variação da concentração do álcool (40-60%, p/p) com seu respectivo sal (20%, p/p) a 298.15 K. [(a) L-tirosina, (b) L-triptofano]

A Figura 5.10 indica os resultados do estudo do efeito da temperatura (278,15-303,15 K) sobre a extração dos aminoácidos, foram realizados em sistema 60% (p/p) de 1-propanol e 20% (p/p) de K_2HPO_4 para L-triptofano e 40% (p/p) de 2-propanol e 20% (p/p) de K_2HPO_4 para L-tirosina.

Os resultados indicam que o aumento do coeficiente de partição aumentou com a temperatura, chegando a $K_{tir}=3,01$ para a L-tirosina e a $K_{trp}=2,73$ para L-triptofano ambos a 303,15 K, levando a concluir que a temperatura é um parâmetro importante a ser manipulado. No entanto, a elevação da temperatura não pode ser demasiada para permitir a desnaturação do aminoácido, por isto neste trabalho a maior temperatura foi de 305,15 K.

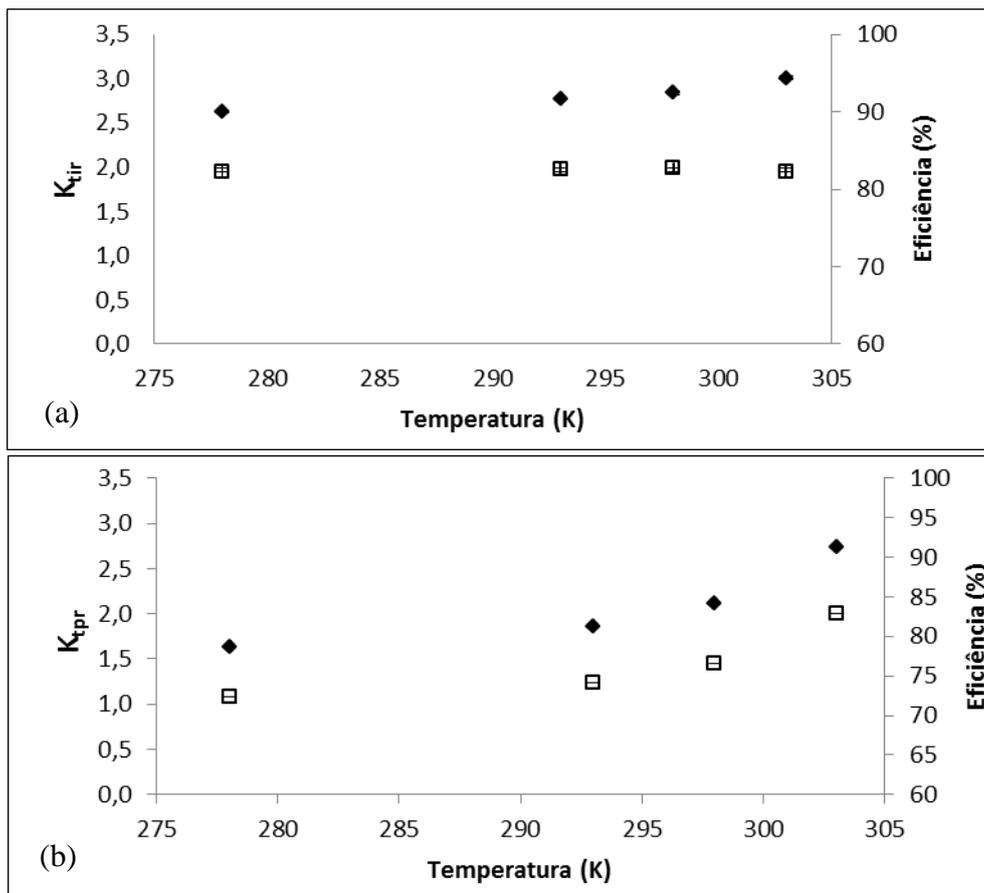


Figura 5.10: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) dos aminoácidos em função da variação de temperatura. [(a) L-tirosina, (b) L-triptofano].

A fim de calcular os parâmetros termodinâmicos de transferência dos aminoácidos, tais como a variação da energia de Gibbs (ΔG°_m), a entalpia (ΔH°_m), e a entropia padrão molar de transferência (ΔS°_m), a abordagem utilizada baseou-se na equação de van't Hoff, os valores dos parâmetros termodinâmicos são apresentados na Tabela 5.4. Pereira *et al.* (2010) averiguando o efeito da temperatura na partição de triptofano em sistemas PEG-sal reportaram que este efeito é crucial na determinação dos coeficientes de partição e dos parâmetros termodinâmicos.

Tabela 5.4: Parâmetros termodinâmicos de particionamento dos aminoácidos usando 2-propanol para a tirosina (40%, p/p) e K_2HPO_4 (20%, p/p) e 1-propanol para o L-triptofano (60%, p/p) e K_2HPO_4 (20%, p/p).

	ΔH (KJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
L-tirosina	3,40	20,21	-2,72
L-triptofano	6,54	28,87	-2,21

A presença de valores máximos dos coeficientes de partição como uma função da temperatura sugere que a partição dos aminoácidos é impulsionada por efeitos opostos que resultam da dependência da temperatura, das contribuições energéticas e entrópicas. O sistema aquoso bifásico é um processo espontâneo ($\Delta G_m^\circ < 0$), favorecendo a partição dos aminoácidos para a fase de topo, além disso, é endotérmico ($\Delta H_m^\circ > 0$) regido por mudanças entrópicas devido à $T \times \Delta S_m^\circ$ é maior do que ΔH_m° . Pei *et al.* (2012), em sistemas formados por K_2HPO_4 e $[C_4mim]Br$ a pH 9.3 para leucina observaram também que o processo de extração era espontâneo, endotérmico e controlado pela entropia do sistema.

Baseados nos resultados do efeito da temperatura nos SAB para os aminoácidos utilizaram-se os sistemas 60% (p/p) de 1-propanol e 20% (p/p) de K_2HPO_4 para L-triptofano a 303 K e 40% (p/p) de 2-propanol e 20% (p/p) de K_2HPO_4 para L-tirosina a 303 K, com o intuito de averiguar a influência da adição de cloreto de sódio (0 a 5%, p/p) na partição e recuperação das biomoléculas (Figura 5.11).

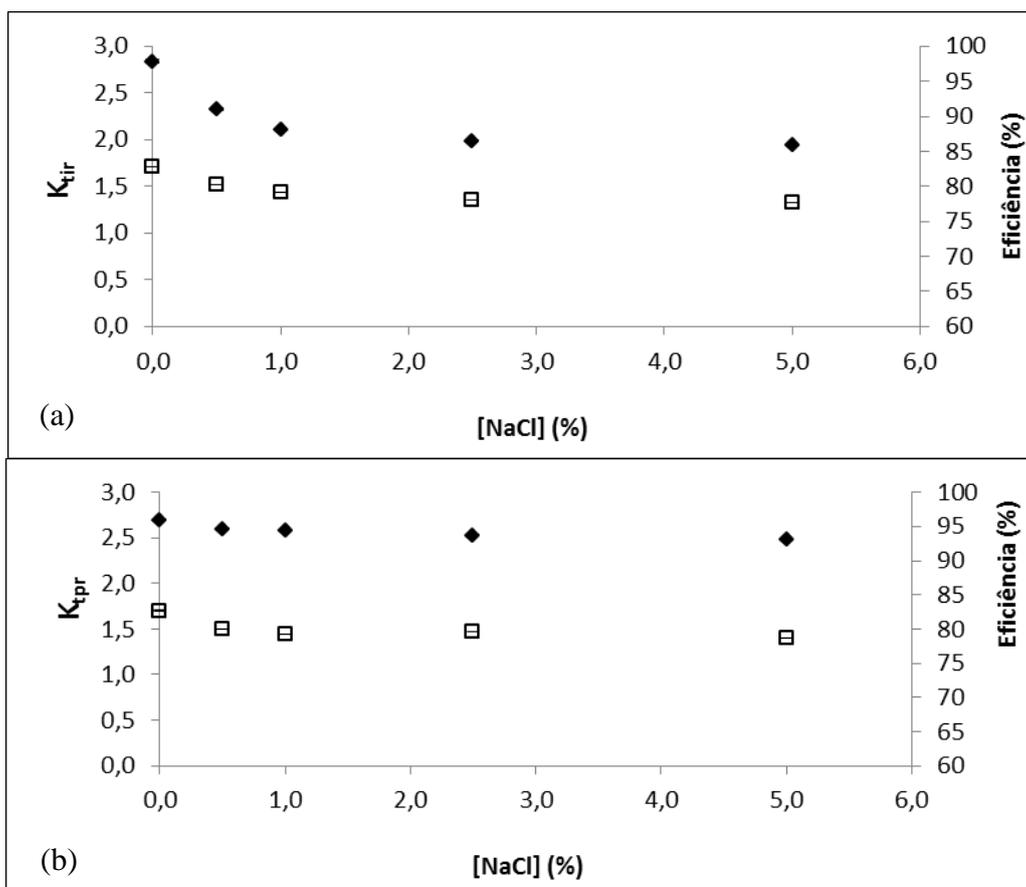


Figura 5.11: Efeito da concentração de NaCl sobre o coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) dos aminoácidos. [(a) L-tirosina, (b) L-triptofano].

Foi observado que apenas a L-tirosina apresenta uma pequena redução no coeficiente de partição à medida que aumenta a concentração de cloreto de sódio, enquanto que para o L-triptofano a influência é negligenciada. As eficiências de extração permaneceram praticamente as mesmas para estes sistemas (Figura 5,11). Ocorrendo um efeito antagônico descrito por Ferreira *et al.*,(2011), elevando a concentração de NaCl como aditivo ao sistema ocorreu uma elevação do coeficiente de partição da adenosina em sistemas formados por PEG(8000) + Na₂SO₄.

Alguns trabalhos da literatura reportam valores de coeficiente de partição utilizando diferentes sistemas. A Tabela 5.5 apresenta esses valores. Observa-se que a constituição do sistema é de fundamental importância na separação, isto porque os valores do coeficiente de partição são bastante variados.

Tabela 5.5. Coeficiente de partição de L-triptofano em diferentes sistemas aquosos bifásico.

Sistema	K	Referencia
[C ₄ mim][CF ₃ SO ₃] (40%, p/p) + carboidratos (25%, p/p)	1,50 – 2,68	Freire <i>et al.</i> , 2011
PEG-600 (40%, p/p) + Na ₂ SO ₄ (5%, p/p)	14,93	Pereira <i>et al.</i> , 2010
PEG-600 (40%, p/p) + Na ₂ SO ₄ (5%, p/p) + [C ₄ mim]Cl (5%, p/p)	21,84	Pereira <i>et al.</i> , 2010
[P ₄₄₄₁][MeSO ₄] + (23%, p/p) + K ₃ PO ₄ (11%, p/p)	9,0	Louros <i>et al.</i> , 2010
[P ₄₄₄₁][MeSO ₄] - tributi-metil-fosfônio metilsulfato		

5.3.2-Antimicrobiano (tetraciclina)

Dando sequencia aos estudos, o particionamento da tetraciclina em SAB álcool/sal também foi estudado e os resultados aparecem na Figura 5.12. Estes sistemas foram selecionados com base em tipos de álcool (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e tipos de sais de fosfato de potássio (K₃PO₄, K₂HPO₄, solução tampão K₂HPO₄/ KH₂PO₄).

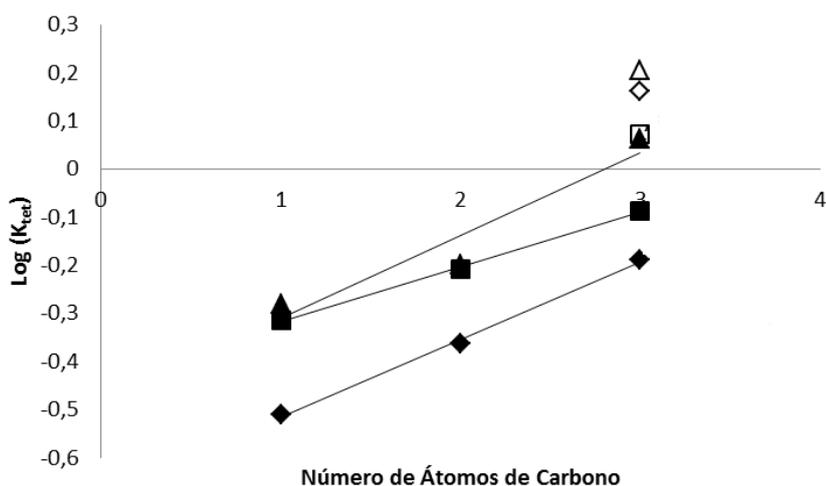


Figura 5.12: Influência do tipo de álcool (1 = metanol, 2 = etanol e 3 = 1-propanol) e sal inorgânico (▲ - K_3PO_4 , ■ - K_2HPO_4 e ◆ K_2HPO_4/KH_2PO_4 tampão) sobre o coeficiente de partição da tetraciclina usando 50% (p/p) de álcool e 15% (p/p) fosfato de potássio em 298,15K. O símbolo aberto representa 2-propanol.

A tetraciclina foi particionada preponderantemente para a fase de fundo (rica em sais de potássio) demonstrando a hidrofiliidade da estrutura, o que é confirmado pelo valor do coeficiente octanol-água ($K_{ow} = -1,05$) para espécies de tetraciclina segundo Herbert e Dorsey (1995). Somente os sistemas formados pelo 2-propanol para todos os sais de fosfato de potássio e pelo 1-propanol com K_3PO_4 apresentam uma tímida tendência de partição da tetraciclina para a fase de topo. Como no caso dos aminoácidos com o aumento da cadeia alquílica do álcool e a força do sal baseado na série de Hofmeister aumenta o coeficiente de partição da tetraciclina.

Para as extrações da tetraciclina nos sistemas propostos foram ponderado dois tipos de otimização: o primeiro ocorreu com o particionamento do antimicrobiano para a fase de topo, na qual sua recuperação é facilitada pela volatilização do álcool. O caminho para a fase de topo foi formado pelo 2-propanol e K_3PO_4 , devido ao maior coeficiente de partição ($K_{tet} = 1,64$) para o ponto de mistura formado com 50% de álcool e 15% de sal em peso.

Após a determinação do coeficiente de partição da tetraciclina no sistema álcool/sal (50/15%, p/p), foi mantido a concentração do álcool (50%) constante tanto para o sistema 2-propanol/ K_3PO_4 e variou-se a concentração do K_3PO_4 de 10 a 20% em peso (Figura 5.13). Com o aumento da quantidade do fosfato de potássio ocorreu o aumento da exclusão das moléculas para a fase de topo, devido ao efeito *salting-out*. O

aumento da concentração do sal (20%, p/p) ocasionou a elevação do coeficiente de partição da tetraciclina, com valor de $K_{tet} = 2,41$ e eficiência de 84,81%.

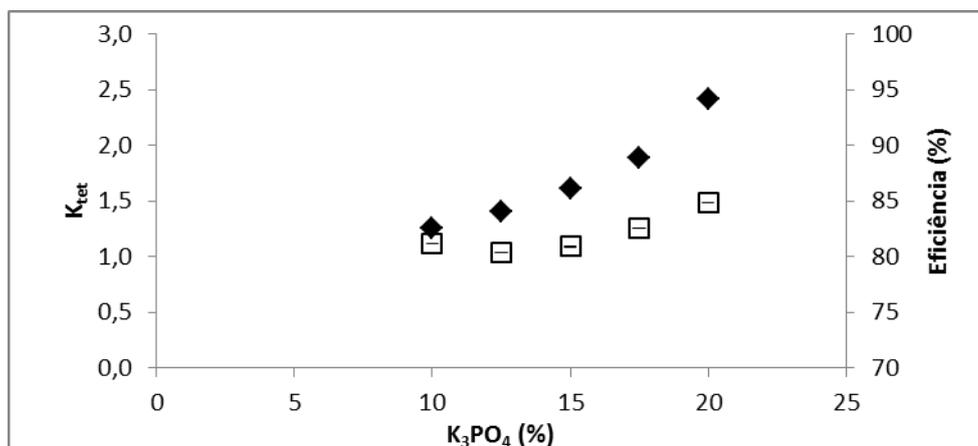


Figura 5.13: O coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da tetraciclina em função variação da concentração do sal (10-20%, p/p) com 2-propanol (50%, p/p) a 298.15 K.

De acordo com Han *et al.* (2010) a concentração de fosfato dibásico de potássio favorece o aumento do coeficiente de partição do clorofenicol em sistemas formados com [C₄mim]Cl, confirmando o efeito *salting-out*, já a eficiência de extração atinge 98,5%, ao passo que neste trabalho o valor máximo de extração foi de 85%. Entretanto Mokhtarani *et al.* (2007) observaram que o aumento da concentração de sal no sistema aquoso bifásico formado por PEG + Na₂SO₄ + água, aumenta a força iônica do sistema e consequentemente o antibiótico ciprofloxacina tem tendência a particionar-se para fase de fundo rica em sal, com o coeficiente de partição de 3,2 diminuindo para 1,5.

No processo de otimização foi analisado a influência da variação de concentração do álcool (40, 45, 50, 55 e 60% em peso) sobre o coeficiente de partição e eficiência de extração. O maior coeficiente de partição obtido foi $K_{tet} = 2,64$ com a concentração de 20% (p/p) de K₃PO₄, como mostra a Figura 5.14. Esta migração é facilitada pela solubilidade da tetraciclina nos constituintes das fases. Segundo Wang *et al.* (2010) a solubilidade da tetraciclina em álcool é maior do que em água, favorecendo o particionamento do antimicrobiano para a fase de topo, logo com o aumento da concentração do álcool maior a migração da biomolécula para esta fase.

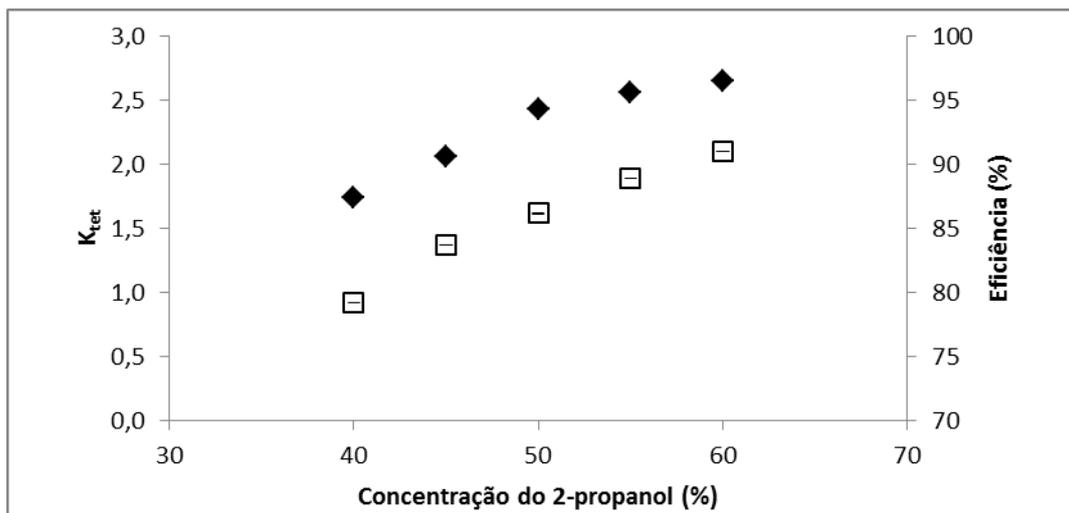


Figura 5.14: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) de tetraciclina em função variação da concentração do álcool (40-60%, p/p) com (20%, p/p) para K_3PO_4 .

Na análise do efeito da variação de temperatura (278,15-308,15 K) sobre a extração da tetraciclina com o sistema (60% em peso de 2-propanol e 20% em peso de K_3PO_4) foram realizados os experimentos onde os resultados são demonstrados na Figura 5.15. O coeficiente de partição aumentou com a temperatura, de $K_{tet} = 2,27$ para $K_{tet} = 2,74$ em 308,15K para o sistema.

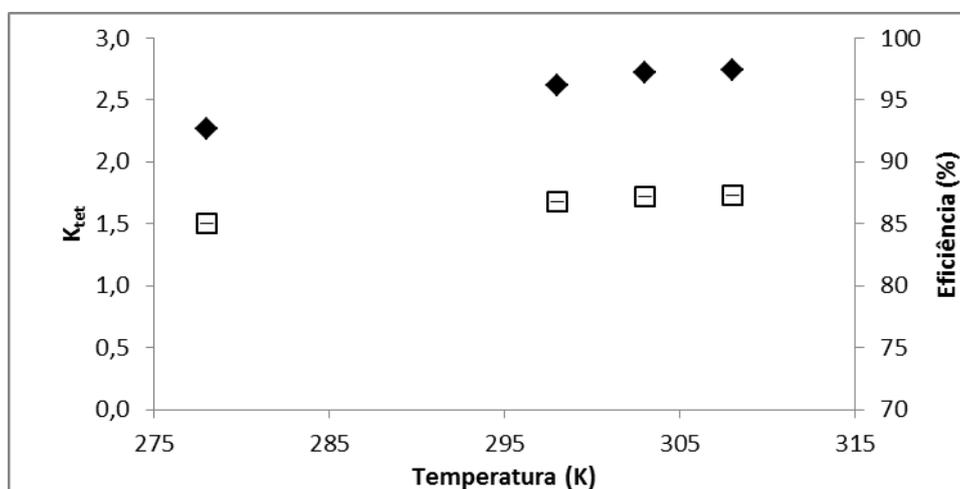


Figura 5.15: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da tetraciclina para sistema 2-propanol (60%, p/p) e K_3PO_4 (20%, p/p).

Enquanto He *et al.* (2011) indicaram que a temperatura não teve influência significativa sobre o comportamento de distribuição de esteróides, por outro lado, Klomklao *et al.* (2005) relataram que a temperatura influencia grandemente a eficiência da extração de proteínas. Isto mostra que o efeito da temperatura na extração depende muitíssimo da biomolécula a ser particionada. Wang et al (2010) apresenta um aumento

de até 5% na eficiência de extração de tetraciclina quando a temperatura aumentava de 283,15 para 298,15 K, em sistemas 2-propanol – (NH₄)₂SO₄.

A equação de van't Hoff foi utilizada para determinar os parâmetros termodinâmicos (Tabela 5.6) no processo de partição de tetraciclina para a fase de topo. O valor calculado ΔG°_m foi negativo e o valor de ΔH°_m positivo para o sistema avaliado, refletindo no particionamento espontâneo, endotérmico e preferencial do antimicrobiano para a fase rica em álcool, indicado pela $K > 1$.

Tabela 5.6: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da tetraciclina em sistema 2propanol/K₃PO₄ (60/20%, p/p).

	ΔH (KJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
2propanol/K ₃ PO ₄ (60/20%, p/p)	5,66	25,93	-2,33

Foi observado na Figura 5.16, a influência da adição de cloreto de sódio e sua variação de concentração no coeficiente de partição e eficiência do antimicrobiano. A adição de NaCl não foi efetiva no aumento do coeficiente de partição de tetraciclina, nem na eficiência de extração deste antimicrobiano.

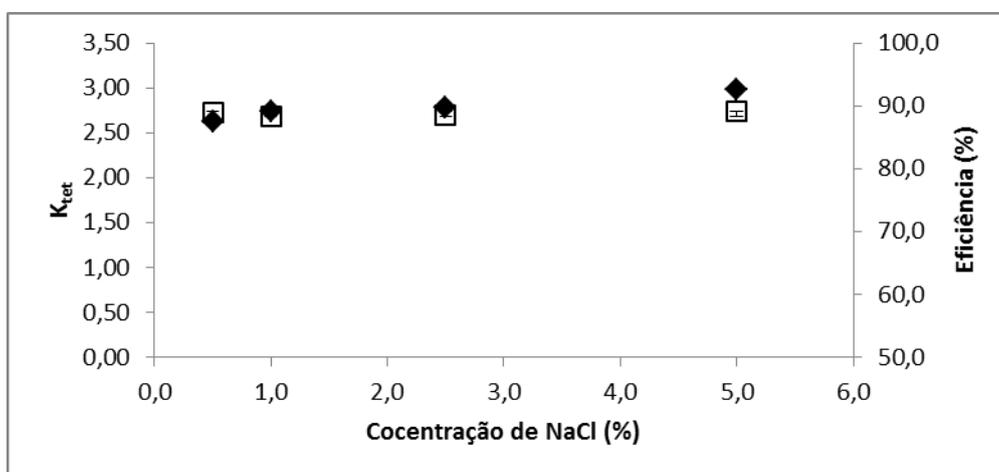


Figura 5.16: Efeito da concentração de NaCl sobre o coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) da tetraciclina para sistema 2-propanol (60%, p/p) e K₃PO₄ (20%, p/p).

O outro caminho no processo de otimização foi o particionamento da tetraciclina para fase de fundo formado pelo sistema etanol e solução tampão com menor valor de coeficiente de partição ($K_{tet} = 0,432$), após a determinação do K_{tet} no sistema álcool/sal (50/15%, p/p), foi mantido a concentração do etanol (50%, p/p) e variou-se a concentração do tampão de 10 a 20% em peso (Figura 5.17).

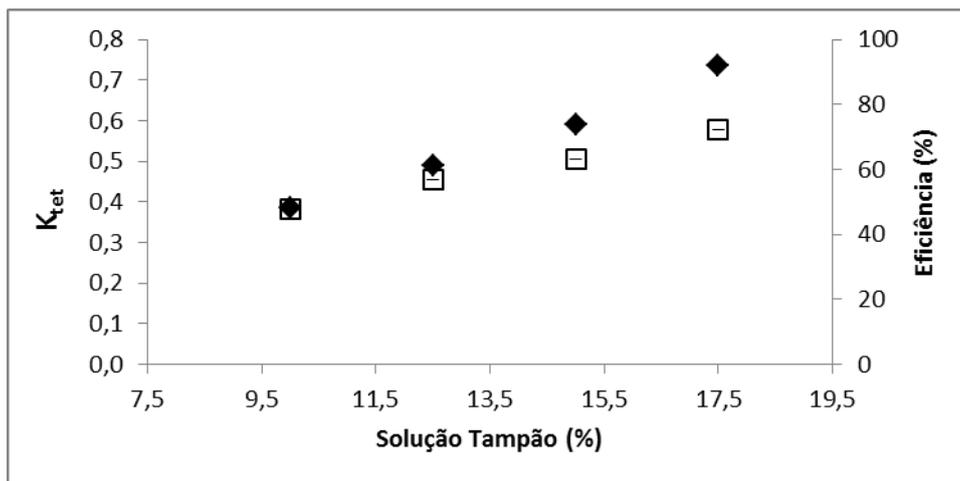


Figura 5.17: Representação do coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) da tetraciclina em função variação da concentração do sal (10-20%, p/p) para o sistema etanol (50%, p/p) e solução tampão a 298.15 K.

Para a partição da tetraciclina no sistema etanol 50% (p/p) e solução tampão 10% (p/p), foi obtido um valor de $K_{tet} = 0,39$ com uma eficiência da extração de 47,89%. Isso ocorre devido a elevação da concentração da solução tampão que favorece o aumento da migração de moléculas para a fase de fundo, efeito também apontado por Trindade *et al.*, (2006).

O estudo da influência da variação da concentração do etanol (40, 45, 50, 55 e 60% em peso), foi fixado o valor da concentração da solução tampão em 10% (p/p), sendo observada uma resposta do coeficiente de partição. O menor valor encontrado $K_{tet} = 0,29$ com concentração do álcool a 60% (Figura 5.18).

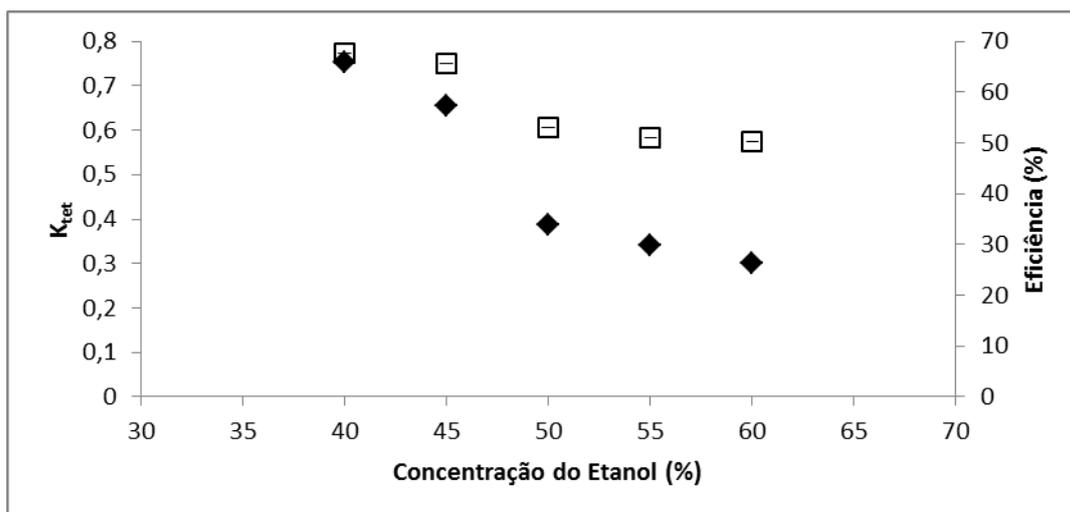


Figura 5.18: Representação do coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) de tetraciclina em função variação da concentração do etanol (40-60%, p/p) com solução tampão (10%, p/p) a 298.15 K.

No estudo do efeito da variação de temperatura (278,15-308,15 K) sobre a extração da tetraciclina com o sistema contendo de etanol (60%, p/p) e de tampão fosfato (10%, p/p), o valor do coeficiente de partição foi de $K_{tet} = 0,28$ a 308,15K (Figura 5.19).

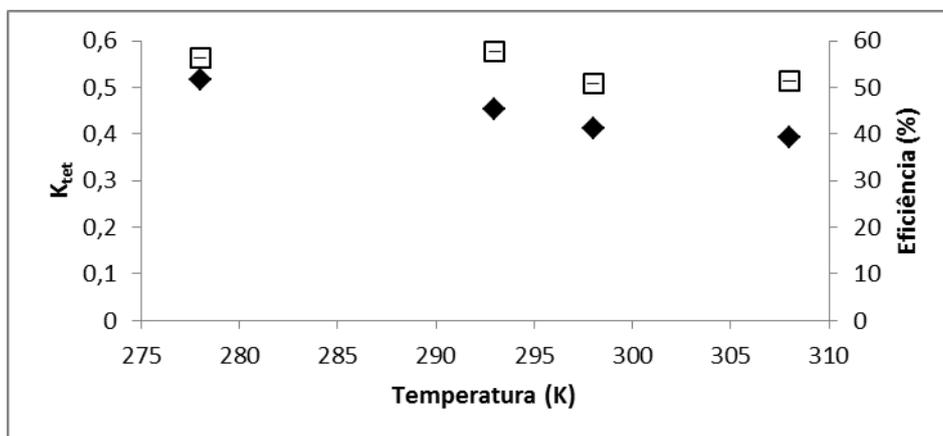


Figura 5.19: Efeito da temperatura sobre o coeficiente de partição (\blacklozenge) e eficiência de extração (\square) da tetraciclina para sistema etanol (60%, p/p) e solução tampão (10%, p/p).

Os resultados obtidos mostram que o aumento da temperatura na extração do antimicrobiano favorece a diminuição do coeficiente de partição da tetraciclina. Segundo Claudio *et al.* (2010) a temperatura é um fator necessário para ser controlado afim obtermos uma melhor eficiência. Na Linearização do coeficiente de partição e da variação de temperatura (278,15 - 308,15K) do antimicrobiano foi utilizada a equação de van't Hoff na determinação dos parâmetros termodinâmicos (ΔH°_m , ΔG°_m e ΔS°_m) demonstrados na Tabela 5.7. Segundo esses dados à partição da tetraciclina para a fase de fundo é espontânea, exotérmica e controlada por efeitos entrópicos.

Tabela 5.7: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da tetraciclina em sistema etanol/tampão (60/10%, p/p).

	ΔH (KJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
Etanol/tampão (60/10%, p/p)	-6,34	28,18	-8,69

5.3.3-Alcalóide (cafeína)

O processo de otimização da partição da cafeína foi realizado utilizando os sistemas propostos no ítem 5.2, e os resultados da partição desta biomolécula são apresentados na Figura 5.20.

O aumento do comprimento da cadeia alquílica do álcool, ou seja, da hidrofobicidade, leva a um aumento linear do coeficiente de partição da cafeína. Por outro lado a ramificação da cadeia alquílica promove uma elevação da partição da molécula de cafeína para a fase rica em álcool (fase de topo). Freire *et al.* (2012) reporta que a interação da cafeína com a cadeia alquílica do líquido iônico utilizado na formação do sistema bifásico e as formação de pontes de hidrogênio regem na partição da biomolécula. Comparando com os sistemas álcool-sais de potássio deste trabalho, a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio do álcool com a cafeína não é alterada, entretanto a cadeia alquílica crescente desempenham um papel primordial, o que vem a justificar a tendencia de crescimento do coeficiente de partição anteriormente comentada.

O aumento no valor do logaritmo do coeficiente de partição com o sal de potássio utilizado segue a série de Hofmeister ($K_3PO_4 > K_2HPO_4 > K_2HPO_4/KH_2PO_4$). Sais extremamente cosmotrópicos, tais como K_3PO_4 , exibem uma forte capacidade de criar uma camada de hidratação, excluindo a água da fase rica em álcool, favorecendo desta forma o efeito de *salting-out* da cafeína para a fase rica em álcool (HE *et al.*, 2005).

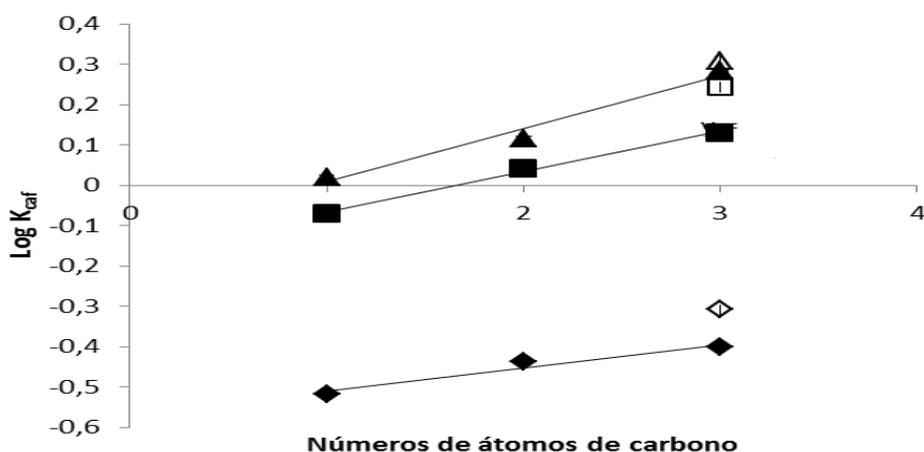


Figura 5.20: Influência do tipo de álcool (1=metanol, 2=etanol e 3=1-propanol) e fosfato de potássio (▲ - K_3PO_4 , ■ - K_2HPO_4 e- ◆ K_2HPO_4/KH_2PO_4 tampão) sobre o coeficiente de partição da cafeína usando 50% de álcool em peso e 15% em peso de fosfato de potássio em 298,15K. O símbolo aberto representa 2-propanol.

O efeito de exclusão da água é observado pelo aumento da razão volumétrica entre as fases com a ordem crescente da série de Hofmeister (Tabela 5.8). Freire *et al.*, (2012) utilizando sistemas líquidos iônicos sais de potássio e sódio verificaram que o

aumento do coeficiente de partição da cafeína segue a série de Hofmeister, como descrito nos resultados deste trabalho.

Tabela 5.8: Efeito do tipo de álcool e do sal de fosfato de potássio na partição de cafeína (K_{caf}) usando sistemas álcool (50%, p/p) e sais de potássio (15%, p/p), a 298,15 K.

Álcool	K_3PO_4		K_2HPO_4		K_2HPO_4/KH_2PO_4	
	R_v	E (%)	R_v	E (%)	R_v	E (%)
Metanol	5,8	85,8	5,2	80,8	4,8	59,4
Etanol	3,7	82,9	4,1	81,5	3,4	55,2
1-Propanol	2,2	81,0	2,3	75,2	3,2	55,6
2-Propanol	2,5	83,6	3,1	84,6	3,0	59,6

Segundo Valko *et al.* (2003), o coeficiente octanol/água para a cafeína é de cerca de -0,07, indicando que a molécula de cafeína tem maior afinidade para a fase aquosa. No entanto, para sais fortemente cosmotrópicos, o efeito *salting-out* supera a característica hidrofílica apresentada pela cafeína. Freire *et al.* (2010) também relatou que o efeito que o efeito *salting-out* do K_3PO_4 promove a extração dos alcalóides, incluindo a cafeína para a fase rica em líquido iônico em sistemas com K_3PO_4 .

A eficiência da extração de cafeína seguiu a mesma tendência de $\log K_{caf}$, com os melhores resultados ocorrendo com o sistema usando K_3PO_4 . Pan *et al.* (2003) reportam que sistemas de extração por solvente de cafeína de folhas de chá verde, utilizando microondas são influenciados pelo tipo de álcool utilizado, soluções aquosas de álcoois possibilitam maior extração, e que álcoois mais polares como etanol (3,6 % de extração) são mais eficientes que o metanol (3,3% de extração). Louros *et al.* (2010) obtiveram valores de coeficiente de partição de cafeína de $K_{caf} = 4,75$ quando aplicaram sistemas aquosos bifásicos formado por tributil(metil)fosfônio metil sulfato $[P_{4441}][MeSO_4]$.

Como se pode observar a partir dos coeficientes de partição relatados, uma das vantagens dos SABs aqui relatados é sua versatilidade. O sistema pode ser escolhido de modo que a cafeína migre para a fase rica em álcool ($\log K > 0$), neste caso a

recuperação da cafeína dar-se-á por evaporação do álcool, ou para a fase rica em sal de fosfato de potássio ($\log K < 0$), neste caso o objetivo será a obtenção de um extrato aquoso concentrado em cafeína. A otimização da recuperação para os dois processos é realizada a seguir estudos dos efeitos da concentração de álcool, sal e temperatura em detalhe.

A otimização da extração da cafeína para a fase rica em álcool em sistemas aquosos bifásios foi executada utilizando 2-propanol e K_3PO_4 , devido ao maior coeficiente de partição apresentado por este sistema ($K_{caf} = 2,036$) no ponto de mistura 50 % (p/p) e 15% (p/p). Inicialmente manteve-se a concentração do 2-propanol e variou-se a concentração do K_3PO_4 entre 10 e 20 % (p/p) como mostra a Figura 5.21.

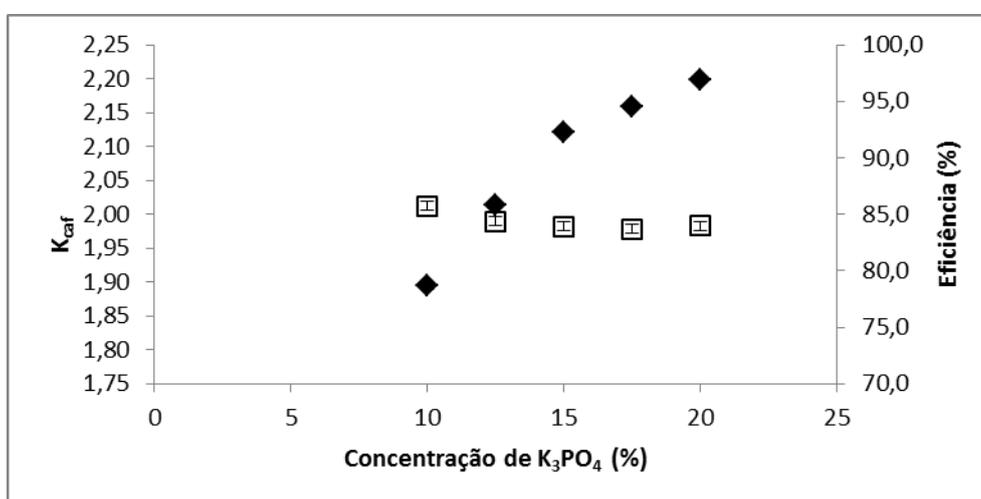


Figura 5.21: Representação do coeficiente de partição (♦) e eficiência de extração (□) da cafeína em função da concentração do K_3PO_4 no sistema 2-propanol (50%, p/p)/ K_3PO_4 a 298,15 K.

O aumento da concentração do K_3PO_4 melhora a exclusão da cafeína para a fase de topo devido ao efeito de *salting-out*, na maior concentração deste sal (20% p/p) o valor de $K_{caf} = 3,0$. Entretanto, a eficiência da extração manteve-se praticamente constante (84,0 a 85,8%), como mostra a Figura 5.21.

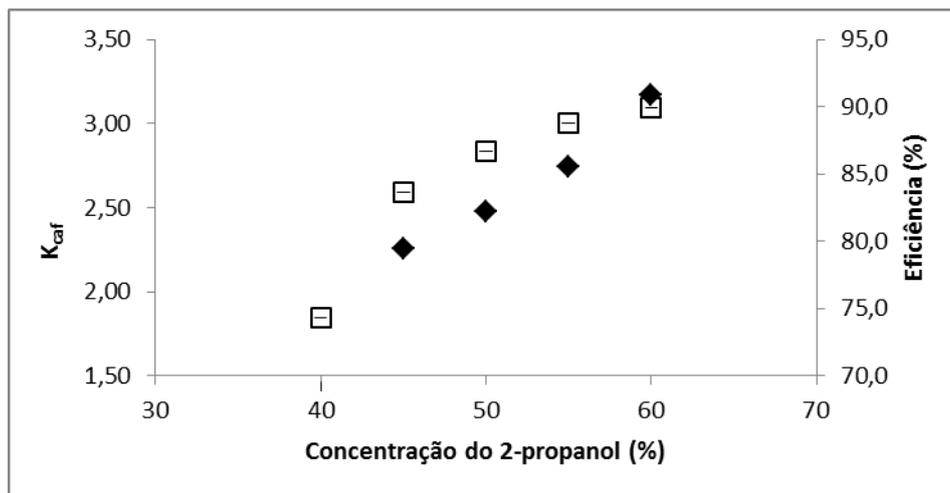


Figure 5.22: Representação do coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) de cafeína em função da concentração de 2-propanol no sistema 2-propanol/ K_3PO_4 (20%, p/p) a 298,15 K.

Para Wang *et al.* (2010), quando o solvente é adequado a molécula é particionada para a fase de topo, caso contrário acumula-se na interface das fases, o que não foi observado nos experimentos. Uma vez determinada a melhor concentração do K_3PO_4 , analisou-se a influência da concentração do 2-propanol (40 a 60 %, p/p) no coeficiente de partição da cafeína, como mostra a Figura 5.22. Com o aumento da concentração deste álcool promove a gradual desidratação da fase de fundo, causando desta forma um desequilíbrio que favorece a migração da cafeína para a fase rica em álcool.

O estudo do efeito da temperatura (278,15 a 303,15 K) na extração da cafeína utilizando os sistemas selecionados (60%, p/p, 2-propanol e 20 %, p/p de K_3PO_4) foi observado (Figura 5.23). Na temperatura mais alta de condução da extração (303,15 K) o coeficiente de partição atinge $K_{caf} = 3,42$. Esse resultado sugere que a temperatura é um parâmetro importante a ser manipulado, apesar do efeito na eficiência poder ser praticamente negligenciável.

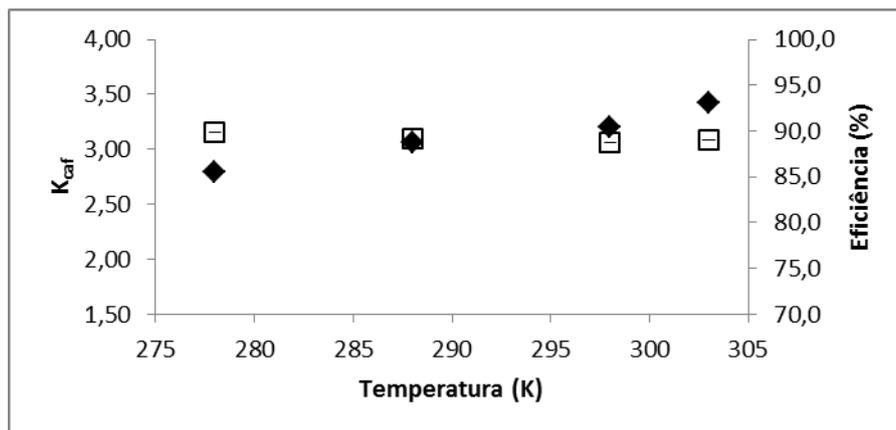


Figura 5.23: Efeito da temperatura no coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) da cafeína no sistema 2-propanol (60%, p/p) /K₃PO₄ (20%, p/p).

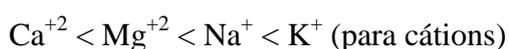
Os valores dos parâmetros termodinâmicos calculados a partir da equação de van't Hoff e apresentados na Tabela 5.9, indicam que a partição da cafeína para a fase rica em álcool é um processo espontâneo ($\Delta G_m^0 < 0$), endotérmico ($\Delta H_m^0 > 0$) e governado pelas contribuições entrópicas, pois o valor de $T \times \Delta S_m^0$ é maior que o valor de ΔH_m^0 .

Tabela 5.9: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da cafeína em sistema 2-propanol/ K₃PO₄ (60/20%, p/p).

	ΔH (KJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
2-propanol/ K ₃ PO ₄ (60/20%, p/p)	5,35	27,78	-8,28

O estudo da influência da adição de eletrólito na partição de cafeína foi realizado por meio da variação da concentração de sais de cloro (BaCl₂, CaCl₂, MgCl₂, LiCl e KCl) desta forma observando o efeito dos cátions mono e divalentes, e de sais de sódio (NaSCN, NaI, NaBr, Na₂HPO₄, Na₂SO₄ e NaF), averiguando o efeito dos ânions, como mostram as Figuras 5.24.

O aumento do coeficiente de partição segue a seguinte ordem:



A sequência de aumento para os cátions segue a mesma tendência apresentada por Cacace *et al.* (1997) para a série de Hofmeister. Para a sequência dos ânions

também foi observada a similaridade da série de Hofmeister para ânions apresentada por Zhang e Cremer (2006). Segundo Al-maaieh e Flanagan (2002) apresentaram um estudo de solubilidade de xantinas, como a cafeína, utilizando o coeficiente de Setschenow, e observaram que o maior valor desta constante denotava um menor valor de solubilidade, como ocorre para o NaSCN (-0,47) e valores elevados para Na_2SO_4 (0,76) e NaCl (0,17). Desta forma pode-se concluir que o aumento da solubilidade da cafeína em solução aquosa de NaSCN permite o aumento da migração da cafeína para a fase de fundo, o que se reflete no valor mais baixo do coeficiente de partição. Na outra extremidade solubilidades baixas da cafeína em solução aquosa de Na_2SO_4 permitem uma maior migração da cafeína para a fase rica em álcool e desta forma o maior valor do coeficiente de partição.

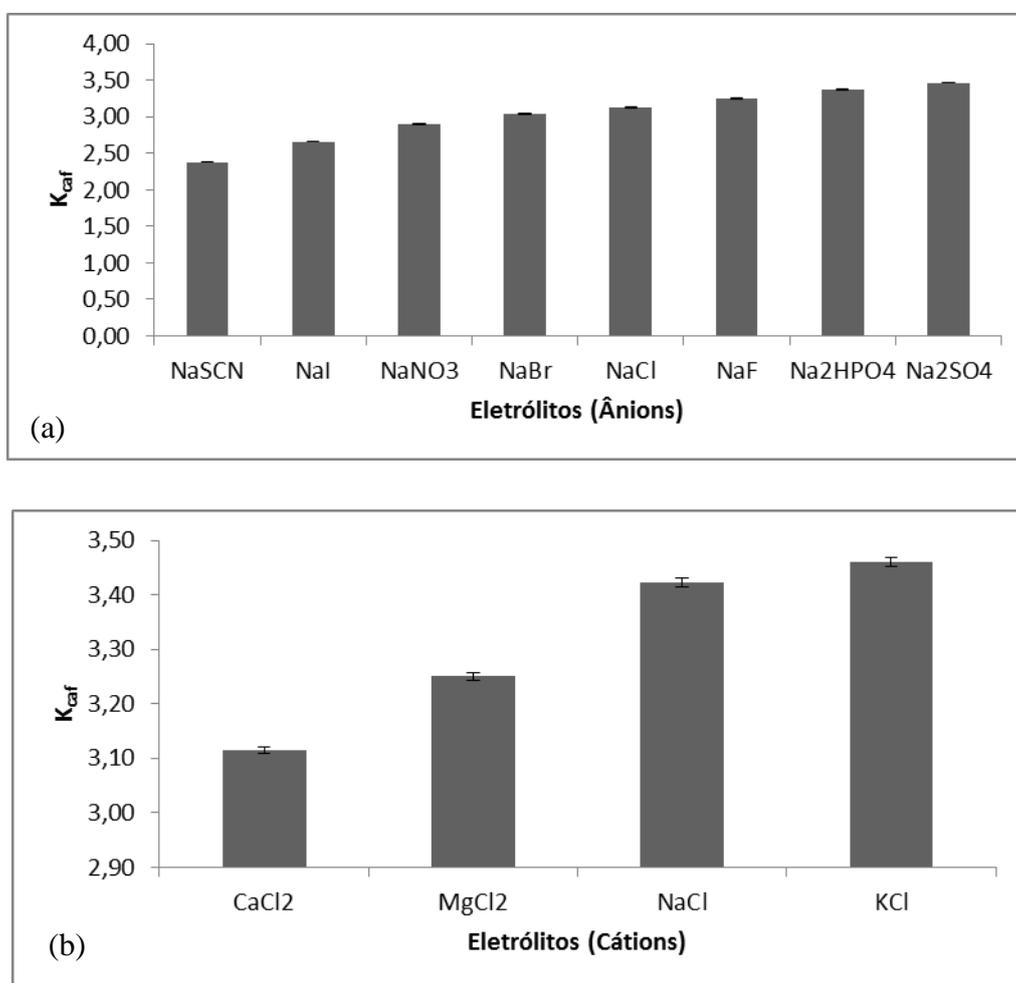


Figura 5.24: Influência da adição de eletrólitos no coeficiente de partição de cafeína (10 mg/L) em sistema aquoso bifásico formado por 2-propanol (60%, p/p) e K_3PO_4 (20%, p/p) à temperatura de 303,15 K: (a) ânions e (b) cátions.

Tomando-se a molécula de NaCl para estudar o efeito da concentração do eletrólito, observa-se na Figura 5.25, que o aumento da concentração de NaCl permite o aumento do coeficiente de partição de $K_{caf} = 3,21$ (sem adição de NaCl) a $K_{caf} = 3,82$ com adição de NaCl (5,0%, p/p). Ferreira *et al.* (2011) estudaram o efeito de diferentes eletrólitos na partição de diversas moléculas, dentre elas a cafeína, em sistemas aquosos bifásicos formado por polietileno glicol 8000 e sulfato de sódio (11,10% e 6,33%, respectivamente). Estes observaram que o aumento da concentração de NaCl permitiu o aumento do coeficiente de partição de aproximadamente $K_{caf} = 1,6$ (sem adição de NaCl) a $K_{caf} = 2,2$ (com cerca de 5,0% de NaCl). Apesar do aumento do coeficiente de partição a eficiência de extração permaneceu praticamente inalterada (em média $E = 88,58 \pm 0,32 \%$).

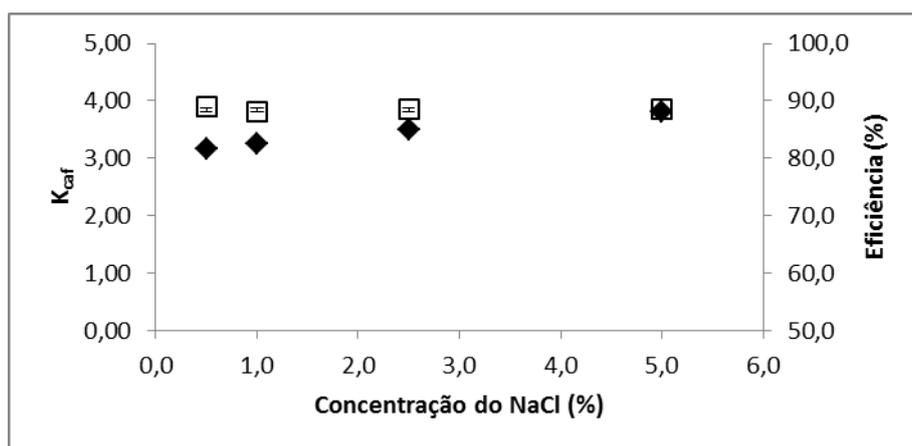


Figura 5.25: Efeito da concentração de NaCl sobre o coeficiente de partição (◆) e eficiência na extração (□) da cafeína para sistema 2-propanol (60%, p/p) e K_3PO_4 (20%, p/p).

No caso da otimização da partição da cafeína ser direcionada para a fase rica em sais de fosfato de potássio, o sistema selecionado constituía-se de metanol e tampão fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4) devido ao menor coeficiente de partição ($K_{caf} = 0,304$) apresentado quando se utilizou o pronto de mistura 50 % (p/p) e 15 % (p/p), respectivamente.

Inicialmente variou-se a concentração da solução tampão entre 10 e 17,5 % (p/p). O aumento da concentração do tampão favoreceu a migração da cafeína para a fase rica no tampão e a redução da eficiência de extração. O menor valor encontrado foi $K_{caf} = 0,302$ com a eficiência de extração de aproximadamente 20% (Figura 5.26). Ao

se fixar o valor da concentração do tampão em 17,5% (p/p) e variar a concentração de metanol no sistema (40 a 60% p/p) observou-se que o coeficiente de partição da cafeína diminui com a concentração, como menor resultado encontrado a 60% (p/p) deste álcool ($K_{caf} = 0,202$). O aumento da concentração de metanol favorece a migração de moléculas de água para a fase de topo e conseqüentemente desidrata a fase rica em sal, que associado ao efeito do *salting-in* promovido pelo KH_2PO_4 leva a migração da cafeína da fase rica em sal e provocando uma diminuição do coeficiente de partição (Figura 5.27).

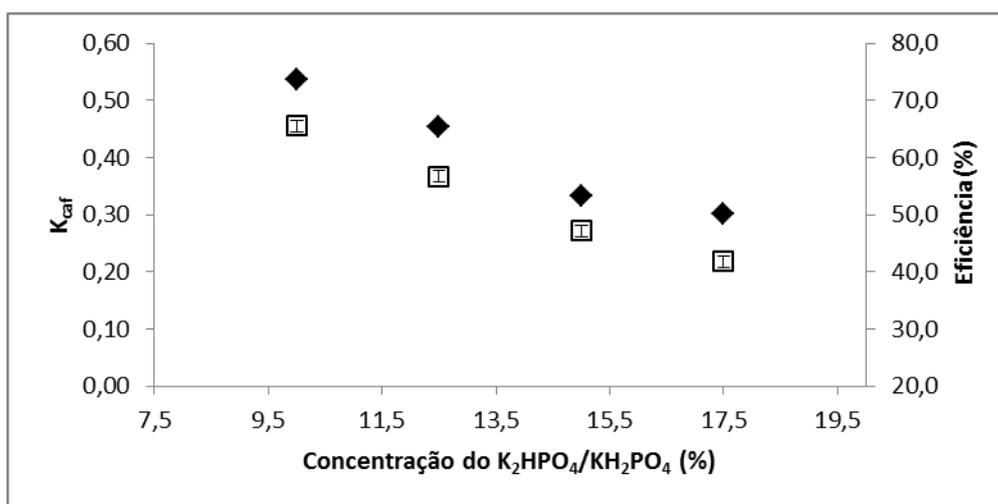


Figura 5.26: Coeficiente de partição (◆) e eficiência de extração (□) da cafeína em função da concentração da solução tampão no sistema metanol (60%, p/p)/ solução tampão a 298,15 K.

A eficiência de extração seguiu a mesma tendência do coeficiente de partição, os menores valores foram de aproximadamente 20%. Jun (2009) também observou que o rendimento da extração da cafeína decresce com o aumento da concentração de etanol de 50 para 100% (p/p) de 4% para 1,5%, em sistemas a alta pressão 500 MPa aplicada por 1 min e razão líquido sólido de 20:1 (mg/g), estes valores de rendimento estão abaixo da eficiência de extração encontrada neste trabalho.

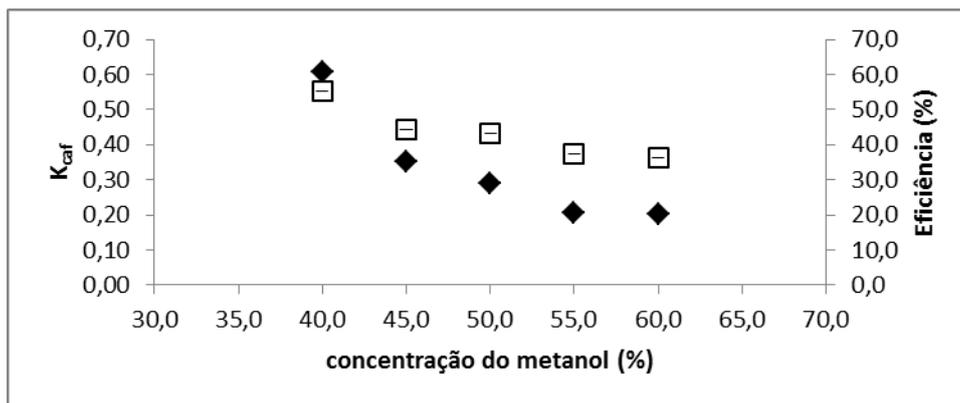


Figura 5.27: Coeficiente de partição (\blacklozenge) e eficiência de extração (\square) de cafeína em função da concentração de metanol no sistema metanol/solução tampão (17,5, p/p%) a 298,15 K.

O efeito da temperatura na partição da cafeína para a fase de fundo foi determinado utilizando sistemas metanol-tampão fosfato de potássio (60 – 17,5 %, p/p), como mostra a Figura 5.28. A temperatura mais baixa utilizada (278,15 K) apresentou a maior concentração da cafeína na fase de fundo ($K_{caf} = 0,06$). Domingues-Perez *et al.* (2010) aplicaram sistemas bifásicos formados por líquidos iônicos (1-etil-3-metilimidazólio trifluorometanosulfonato $[C_4mim][CF_3SO_3]$ e lisina, obtendo coeficientes de partição para cafeína de $K_{caf} = 0,145$ demonstrando que a biomolécula migra para a fase de fundo.

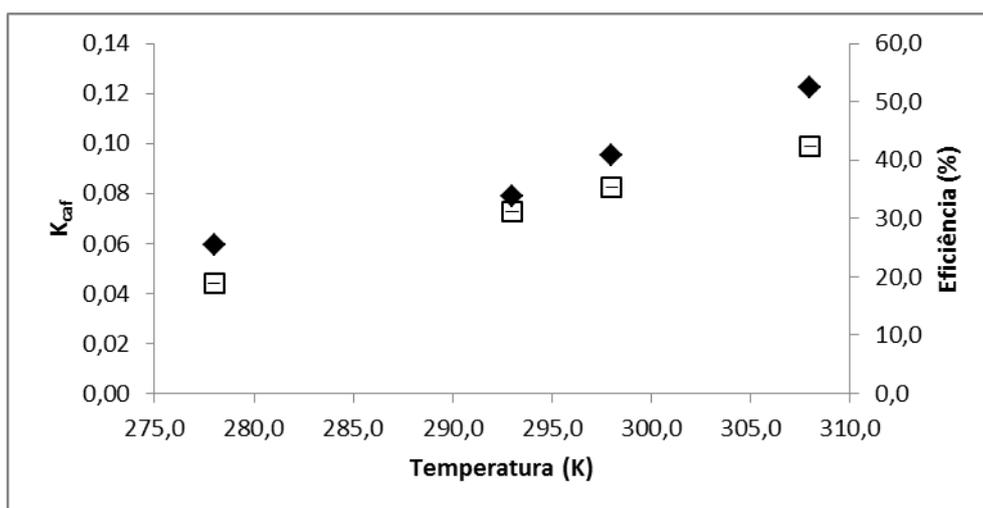


Figura 5.28: Efeito da temperatura no coeficiente de partição (\blacklozenge) e eficiência de extração (\square) da cafeína usando sistema metanol (60%, p/p)/Solução tampão (17,5%, p/p).

A determinação dos parâmetros termodinâmicos (Tabela 5.10) indica que o processo de partição da cafeína para a fase rica em tampão fosfato de potássio é não espontânea ($\Delta G_m^0 > 0$), endotérmica e controlada por efeitos entrópicos.

Tabela 5.10: Parâmetros termodinâmicos de particionamento da cafeína em sistema etanol/ solução tampão (60/ 17,5%, p/p).

	ΔH (KJ.mol ⁻¹)	ΔS (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
etanol/ solução tampão (60/17,5%, p/p)	17,25	6,6	38,29

Capítulo 6

6. CONCLUSÕES

Os principais resultados mostram que os alcoóis com cadeias alifáticas mais longas (maior hidrofobicidade) favorecem a separação das fases. Os sistemas aquosos bifásicos formados por álcool-sal (SAB) foram aplicados com sucesso para o particionamento das biomoléculas: aminoácidos, alcalóide e tetraciclina.

O processo de extração foi otimizado pela variação do tipo e concentração dos componentes dos sistemas, da temperatura e da adição de diferentes eletrólitos. A depender dos constituintes dos sistemas as biomoléculas tanto podem migrar para a fase de topo ($K > 1,0$) como para a fase de fundo ($K < 1,0$). No processo de otimização das biomoléculas privilegiou-se a partição para a fase rica em álcool (fase de topo), neste sentido os melhores valores para o coeficiente de partição foram para L-tirosina ($K_{tir} = 3,01$ usando 2-propanol – 40%, K_2HPO_4 – 20%, NaCl 2,5% a 303,15 K); L-triptofano ($K_{trp} = 2,73$ usando 1-propanol – 60%, K_2HPO_4 – 20%, NaCl 2,5% a 303,15 K); tetraciclina ($K_{tet} = 2,74$ usando 2-propanol – 60%, K_3PO_4 – 20%, NaCl 5% a 308,15 K) e cafeína ($K_{caf} = 3,81$ usando 2-propanol – 60%, K_3PO_4 – 20%, NaCl 5,0% a 303,15 K). Também foi otimizada a partição da tetraciclina para a fase rica em sal ($K_{tet} = 0,28$ usando etanol – 60%, tampão fosfato – 17,5% a 308,15 K) e da cafeína para a fase rica em sal ($K_{caf} = 0,12$ usando metanol – 60%, tampão fosfato – 17,5% a 308,15 K).

O efeito dos eletrólitos no sistema de partição de cafeína seguiu a série de Hofmeister e apresentaram maiores valores de partição quando se adicionou ao sistema Na_2SO_4 e KCl (K_{caf} igual a 3,55 e 3,45, respectivamente).

Este trabalho mostra que os SABs formados por álcool-sal são promissoras para executar separações seletivas e recuperar produtos para a bioengenharia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALBERTSSON, P.A.; Partition of cell and macrocolecules. New York. Jonh Wiley, p. 346. 1986.
- AL-MAAIEH, A.e FLANAGAN, D.R. Salt effects on caffeine solubility, distribution, and self-association. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 91,1000-8. 2002
- ANDREO, D., JORGE, N.Antioxidantes naturais: técnicas de extração B.CEPPA, Curitiba v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.
- ASENJO, J.A. e ANDREWS B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *Journal of Chromatography A*. 49:8826-35. 2011
- AZEVEDO, A.M. GOMES, A.G. ROSA, P.A.J. FERREIRA, I.F. PISCO, A.M.M.O. AIRES- BARROS, M.R. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 65 14–21. 2009.
- AZNAR, M. ; MADURO, R. M. Liquid-Liquid Equilibrium of Ternary Systems 1-Butyl-3-Methylimidazolium Hexafluorophosphate + Aromatic + Aliphatic. *Fluid Phase Equilibria*. 265, 129-138. 2008.
- BELAY, A.; TURE, K. ;REDI, M. e ASFAW, A. Measurement of caffeine in coffe beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry* 108, 310-315. 2008.
- BRETTI, C., CREA,F., STEFANO,C., SAMMARTANO, S., VIANELLI, G. Some thermodynamic properties of dl-Tyrosine and dl-Tryptophan. Effect of the ionic medium, ionic strength and temperature on the solubility and acid–base properties. *Fluid Phase Equilibria*. 314, 185– 197. 2012
- BORA, M. M., BORTHAKUR, B. RAO, P. C. DUTTA, N.N. Aqueous two-phase partitioning of cephalosporin antibiotics: effect of solute chemical nature, *Separation and Purification Technology*. 45 153–156. 2005.
- CACACE, M. G.; LANDAU, E. M. e RAMSDEN, J. J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quarterly Reviews of Biophysics* 30, 241–277. 1997

- CHAN, C.H.; YUSOFF, R.; NGOH, G.C.; KUNG, F.W.L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*. 1218: 6213 – 6225, 2011.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. *Process Biochemistry*. 45, 1148-55. 2010.
- CHUNG, E.S.; SODEN, B. J. E SOHN, B. J. Revisiting the determination of climate sensitivity from relationships between surface temperature and radiative fluxes. *Geophysical Research Letters*, 37, L10703, 6. 2010.
- CLÁUDIO, A. F. M.; FREIRE, M. G.; FREIRE, C.S.R.; SILVESTRE, A.J.D. E COUTINHO, J.A.P. Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology* 75, 39–47. 2010.
- CARVALHO, C.P. Estudo de Equilíbrio de Fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. Dissertação de Mestrado UFV, Viçosa-MG, 2004.
- CHATCHAWALSAISIN, J. The preparation by extrusion/spheronization and the properties of pellets containing drugs, microcrystalline cellulose and glyceryl monostearate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 35-48. 2005.
- COIMBRA, J. S. R., GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., MINIM, L.A., MEIRELLES, A.J.A. Uso de Sistemas Aquosos Bifásicos na Extração Líquido-Líquido. Editora UFV, Viçosa, 2003.
- DOMÍNGUES-PÉREZ, M.; TOMÉ, L.I.N.; FREIRE, M.G.; MARRUCHO, I.M.; CABEZA, O.; COUTINHO, J.A.P. (extraction of biomolecules using) aqueous biphasic systems formed by ionic liquids and aminoacids. *Separation and Purification Technology*. 72, 85-91. 2010.
- FREIRE, M.G.; NEVES, C.M.S.S.; MARRUCHO, I.M.; LOPES, J.N.C.; REBELO, L.P.N.; Coutinho, J.A.P. High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids. *Green Chemistry*. 12, 1715–1718. 2010.
- FREIRE, M.G.; LOUROS, C.L.S.; REBELO, L.P.N. e COUTINHO, J.A.P. Aqueous biphasic systems composed of water-stable ionic liquid +carbohydrates and their applications. *Green Chemistry*.13, 1536. 2011.
- FREIRE, M.G.;TELES, A.R.; LOPES, J.N.C.;REBELO,L.P.N.;MARRUCHO, I.M. e COUTINHO, J.A.P. Partition coefficients of alkaloids in biphasic ionic-liquid-

- aqueous systems and their dependence on the hofmeister series. *Separation Science and Tecnology*.47,284-291. 2012.
- FREIRE, M.G.; PEREIRA, J.F.B.; FRANCISCO, M.; RODRIGUEZ, H.; REBELO, L.P.N.; ROGERS, R.D. e COUTINHO, J.A.P. Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systms composed of polyethylene glycol polymers and ionis liquids. *Chemistry Eutopean journal*.18,1831-1839. 2012.
- FERREIRA, L.A.; TEIXEIRA, J.A.; MIKHEEVA, L.M.; CHAIT, A. e ZASLAVSKY, B.Y. Effect of salt additives on partition of nonionic solutes in aqueous PEG_sodium sulfate two-phase system. *Jornal of Chomatography A*.1218,5031-5039. 2011.
- FISONE, G., BORGKVIST, A., USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61, 857–72. 2004.
- FONTOURA, R. e BRANDELLI, A. Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas sp.* *World Journal Microbiol Biotechmol*. 25, 205-213. 2009.
- GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry*. 45, 1082-87. 2010.
- GOIHL, J. Tryptophan can lower aggressive behavior. *Feedstuffs*, 78, 12-22. 2006.
- GONZÁLEZ-NUÑEZ L.N. e CAÑIZARES-MACÍAS M.P., Focused microwaves-assisted extraction of theobromine and caffeine from cacao, *Food Chemical*. 129, 1819–1824. 2011.
- GREISLER, H. P. Biomolecules. Chapter - 4. WTEC Panel Report on tissue Engineerin Research. Copyright 2003. Elseiver Science (USA).
- GREVE, A.; KULA, M.R. Phase diagrams of new aqueous phase systems composed of aliphatic alcohols, salts and water. *Fluid Phase Equilibria*. 62, 53–63. 1991.
- GRYCOVA, L.; DOSTÁL, J.; MAREK, R. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* 68, 150–175. 2007.
- HAN, J.; WANG, Y. ; YU, C.; LI, C.; YAN, Y.; LIU, Y. E WANG, L. Separation, concentration and determination of chloramphenicol in environment and food using an ionic liquid/salt aqueous two-phase flotation system coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 685, 138–145. 2011.

- HANSON, A.T.; SAMANI, Z.; DWYER, B.; JACQUEZ, R. Heap leaching as a solvent extraction technique for remediation of metals-contaminated soils. In: Sabatini, D.A., Knox, R.C. (Eds.), *Transport and Remediation of Subsurface Contaminants*. ACS Symposium Series. *American Chemical Society*. 108-121. 1992.
- HASMANN, F.A., MAZZOLA, P. G., MAGALHÃES, P. O., Penna, T. C. V., Pessoa Junior, A. Purificação de biomoléculas intracelulares, produzidas por microrganismos. *Microrbiologia in Foco*. 04-11. 2008.
- HE, Z., FU, M. e MAO, L.. Total phenolic, condensed tannin and antioxidant activity of four Caryaspecies from China. *African Journal of Biotechnology*. 10, 10472-10477. 2011.
- HE, C., LI, S., LIU, H., LI, K., & LIU, F. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. *Journal of Chromatography A*, 1082: 143–149. 2005.
- HEARD, C.M. ; JOHNSON, S.; MOSS, G. e THOMAS, C.P. In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia Cupana*. *International journal of pharmaceutics*. 317, 26–31. 2006.
- HERBERT, B. J. e DORSEY, J. G. n-Octanol-water partition coefficient estimation by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytical Chemistry*. 67, 744-749. 1995.
- HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry*. 98, 136-148. 2006.
- JI, P. E FENG, W. Solubility of amino acids in water and aqueous solutions by the statistical associating fluid theory. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 47, 6275-6279. 2008.
- JOHANSSON, H-O; MAGALDI, F.M.; FEITOSA, E.; PESSOA-JR, A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. *Journal of chromatography A*, 1178, 145-153. 2008.
- JUN, X. Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. *Journal of Food Engineering*. 94, 105–109. 2009.

- KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SIMPSON, B. K. E. KISHIMURA, H. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry* 40, 3061-3067. 2005.
- LEE, S. W.; LIM, J. M.; BOO, S. H. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Anal. Chemical Acta*, 480, 267. 2003.
- LIMA, A.S.; ALEGRE, R.M.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two phase systems. *Carbohydrate Polymers*. 50, 63 – 68. 2002.
- LOUROS, C.L.S. COUTINHO, J.A.AP.; PAULY, J.; MARRUCHO, I.M.; FREIRE, M.G.; NEVES, C. M.S.S.; CLÁUDIO, A.F.M.; Extraction of biomolecules using phosphonium-based ionic liquids + K_3PO_4 aqueous biphasic systems. *international journal molecular sciences*. 11, 1777-1791. 2010.
- LUECAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A.A descriptive model and methods for up-scaled process router for interfacial partition of bioparticles in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering journal*. 50, 122-130. 2010.
- MACHADO, F. L. C. Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por polietileno glicol-maltodextrina-água. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 1999.
- MADURO, R. M. Equilíbrio Líquido-Líquido em Sistemas Nicotina + Água + Extratante. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.
- MARKLOVÁ, E.; MAKOVIC'KOVÁ, H.; KRÁKOROVA, I. Screening for defects in tryptophan metabolism. *Journal of chromatography A*, 870, 289-293. 2000.
- MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chemistry*, 58, 245- 248. 1997.
- MAZZERA, D.; HAYES, T.; LOWENTHAL, D.; ZIELINSKA, B. Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil at McMurdo Station, Antarctica. *The Science of the Total Environment*. 229, 65-71. 1999.
- MAGESTE, A. B.; LEMOS, L. R.; FERREIRA, G. M. D.; SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase systems: Na eficiente, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7623-29. 2009.

- MALPIEDI, L.P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G.A.; NERLI, B.B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers, *Separation Purification Technology*, 65, 40-45. 2009.
- MEDINA, A. R.; MARIN, M.G.G.; CORDOVA, M.L.F. e DIAZ, A.M. Uv-spectrophotometric flow-injection assay of tetracycline antibiotics retained on Sephadex QAE A-25 in drug formulations. *Microchemical Journal* 65, 325-331. 2000.
- MERCHUK, J.C., ANDREWS, B.A., AND ASENJO, J.A., Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711, 285-293. 1998.
- MOKHATARANI, B.; KARIMZADEH, R.; AMINI, M. H. e MANESH, S. D. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly (ethylene glycol) and sodium sulphate. *Biochemical Engineering Journal*. 38, 241-247. 2008.
- NEHLING, A.Z.; FREDHOLM, B.B.; BATTIG, K. E ZVARTAU, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Review journal* 51, 83-133. 1999.
- NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger, Principles of Biochemistry. 3rd Ed. Worth Publishing: New York, 2000.
- NEVES, C. M.S.S.; VENTURA, S.P.M.; FREIRE, M.G.; MARRUCHO, I.M. e COUTINHO, J.A.P. Evaluation of cation influence on the formation and extraction capability of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. *Journal of Physical Chemistry B*. 113, 5194-5199. 2009.
- OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M. ; LAN, J. C. W. ; ARIFF, A. ; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process biochemistry*. 44, 1083-1087. 2009.
- OLIFERENKO, A.A. ; OLIFERENKO, P.V. ; HUDDLESTON, J.G.; ROGERS, R.D.; PALYULIN, V.A. ZEFIROV, N.S.E KATRITZKY, A.R. Theoretical Scales of Hydrogen Bond Acidity and Basicity for Application in QSAR/QSPR Studies and Drug Design. Partitioning of Aliphatic Compounds. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 44, 1042-1055. 2004.

- PAN, X.; NIU, G.; LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and processing*. 42, 129-133. 2003.
- PARK, H.S.; IM, N.G.; KIM, K.H. Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. *Food Science and Technology*. 45, 73-78. 2012.
- PALMER, A., ANGELINO, E., & KISHONY, R.. Chemical decay of an antibiotic inverts selection for resistance. *Nature Chemical Biology*, 6, 105-107. 2010.
- PEI, Y. ; LIUA, J.; YANB,Z.; LIA, Z.; FANA, J. e Wang, J. Association of ionic liquids with cationic dyes in aqueous solution: A thermodynamic study. *Journal of Chemical Thermodynamics*. 47, 223–227. 2012.
- PENTEADO, M. D. V. C. Vitaminas –Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. São Paulo: Ed. Metha. 611p. 2003.
- PEREIRA, J.F.B.; LIMA, A.S.; FREIRE, M.G.; COUTINHO, J.A.P. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. *Green Chemistry*. 12, 1661–1669. 2010.
- PERVA-UZUNALIC, A. ; SKERGET, M. ; KNEZ, Z.; WEINREICH, B. OTTO, F. e GRÜNER, S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*. 96, 597–605. 2006.
- PESSOA-JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos, Barueri - SP, Manole, 2005.
- RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. *Food Science and Technology International*, 8, 269-284. 2002.
- RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P. e BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. *Food and Bioproducts Processing*. doi: 10.1016. 2010.
- RODRIGUES, C.I.; MARTA, L.; MAIS, R.; MIRANDA, M.; RIBEIRINHO, M. e MÁGUAS, C. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20, 440-448. 2007.

- ROGERS, R.D.; WILLAUER, H. D.; GRIFFIN, S.T. e HUDDLESTON, J.G.. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 711, 255–263. 1998.
- ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*. 1217, 2296-2305. 2010.
- ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, V. 48, N. 2, P. 227-233. 2004.
- SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*. 187-188. 2001.
- SALABAT, A; ABNOSI, M. H.; BAHAR, A. R. Amino acids partitioning in aqueous two-phase system of polypropylene glycol and magnesium sulfate. *Journal of Chromatography B*, 858, 1–2. 2007,
- SALVA, T.J.G.; LIMA, V. B. A composição química do café e as características da bebida do grão. Instituto Agrônomo, Centro de Café “Alcides Carvalho”, Campinas, 2007.
- SARAVANAN, S.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)-poly(acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature. *Process Biochemistry*. 43, 905-911. 2008.
- SELVAKUMARA, P.; LINGA, T. C.; WALKERA, B.S. e LYDDIATTA, A. Redefinition of working aqueous two-phase systems: A generic description for prediction of the effective phase chemical composition for process control and biorecovery. *Journal of Chromatography B*. 878, 1784–1790. 2010.
- SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. PEG + Potassium Phosphate + Urea Aqueous Two-Phase Systems: Phase Equilibrium and Protein Partitioning. *Chemical Engineering Journal*. 46, 251-255. 2000.
- SILVA, L.H.M AND LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, 29, 1345-1351. 2006.
- SILVA, D. B.; MATOS, M.F.C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A.; FABRI, J.R.; MIGLIO, H.S. e SIQUEIRA, J.M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de annonaceae. *Química Nova*. 30, 1809-1812. 2007.

- SINGH, B. e SAHU, P.M. Anti-inflammatory activity of alkanoids and triterpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytomedicine : International Journal Of Phytotherapy And Phytopharmacology*. 13, 152-6. 2006.
- TELLO, J.; VIGUERA, M. e CALVO, L. Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*. 59, 53 – 60. 2011.
- TRINDADE, J.R.; VISAK, Z.P.; BLESIC, M.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P.; LOPES, J.N.C. e REBELO, L.P.N. Salting-out in aqueous ionic liquid solutions: cloud-point temperature shifts. *Journal of Physical Chemistry B*. 18, 4737-41. 2006.
- TOMÉ, L.I.N.; CATMBAS, V.R.; TELES, A.R.R.; FREIRE, M.G.; MARRUCHO, I.M. e COUTINHO, J. A.P. Tryptophan extraction using hydrophobic ionic liquids. *Separation and purification technology*. 72, 167-173. 2010.
- VALKO, K.; NUNHUCK, S.; BEVAN, C.; ABRAHAM, M.H.; REYNOLDS, D.P. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin: Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 92, 2236-2248. 2003.
- VENTURA, S. P. M. ; Sousa, Sílvia ; Freire, Mara G. ; SERAFIM, L. S. ; Lima A. S. ; Coutinho, João A. P. . Design of ionic liquids for lipase purification. *Journal of Chromatography B.*, 879, 2679-2687. 2011.
- VENTURA, S. P. M. ; MARQUES, C. S. ; Rosatella, Andreia A ; Gonçalves, Fernando ; Afonso, Carlos A.M. ; Coutinho, João A. P. . Toxicity Assessment of Various Ionic Liquid Families Towards *Vibrio fischeri* Marine Bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 76, 162-168. 2012.
- VON NUSSBAUM, F. Medicinal Chemistry of Antibacterial Natural Products – Exodus or Revival. *Angewandte Chemie International*. 45, 5072–5129. 2006.
- WANG, Y.; HAN, J.; XU, X.; HU, S.; YAN, Y. Partition behavior and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol–ammonium sulfate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 75, 352–357. 2010.
- WANG, Y.; WANG, J.; HAN, J.; HU, S. e YAN, Y. Liquid-liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of salting-out abilities of salts. *Central European Journal of Chemistry*. 8, 886-891. 2010.

- WANG, Y.; Liu, Y.; HAN, J.; HU, S. Application of Water-Miscible Alcohol-Based Aqueous Two-Phase Systems for Extraction of Dyes. *Separation Science and Technology*. 46, 1283–1288. 2011.
- WANNMACHER; L.; KUCHENBECKER, R. Antimicrobianos. In: Fundamentos farmacológicos-clínicos dos medicamentos de uso corrente. Rio de Janeiro: ENSP, 2004. n.p.
- WAZIRI, S. M.; ABU-SHARKH, B. F.; ALI, S. A. The effect of pH and salt concentration on the coexistence curves of aqueous two-phase systems containing a pH responsive copolymer and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib.* 205, 275-290. 2003.
- WILLIAMS, H. D.; BARRET, D.A.; WARD, R. ; HARDY, I .J. e DELIA, C.D. Aliquid chromatography method for quantifying caffeine dissolution from pharmaceutical formulations into colloidal, fat-rich media. *Journal of chromatography B*. 878, 1739-1745. 2010.
- WILLAUER, H.D.; HUDDLESTON, J.G. e ROGERS, R.D. Solute Partitioning in Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol and Salt: The Partitioning of Small Neutral Organic Species. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 41, 1892–1904. 2002.
- YANG, L.; HUO, D.; HOU, C.; HE, K.; LV, F.; FA, H.; LUO, X. Purification of plant-esterase in PEG 1000/NaH₂PO₄ aqueous two-phase system by a two-step extraction. *Process Biochemistry*. 45, 1664-71. 2010.
- YAN-MIN, L.; YAN-ZHAO, Y.; XI-DAN, Z.; CHUAN-BO, X. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. *Food and Bioproducts Processing*. 88, 40-46. 2010.
- ZAFARANI-MOATTAR, M. T., NASIRI, S. Phase diagrams for liquid–liquid and liquid–solid equilibrium of the ternary poly ethylene glycol di-methyl ether 2000 + tri-sodium phosphate + water system at different temperatures and ambient pressure. *Computer Coupling Of Phase Diagrams And Thermochemistry*. 34, 222-231. 2010.
- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B. ELICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos metodos existentes. *Química nova*. 21.1998.
- ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-

solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*. 24, 57-76. 2002.

ZHANG, Y. e CREMER, P.S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Chemical Biology*. 10, 658-663. 2006.

ZUÑIGA, A. D. G.ROJAS, E. E. G.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R. ; PEREIRA, J. A. M.; Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Vol. 21, No 1, 2003.

ANEXO A

Tabela A1: Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por metanol (1) + sal de fosfato de potássio (2) + água (3) a 298,15 K.

K₃PO₄		K₂HPO₄		KH₂PO₄/K₂HPO₄	
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
77,761	1,119	77,459	1,271	76,819	1,591
71,190	1,759	66,454	2,502	68,362	2,165
59,623	3,453	47,671	6,694	62,376	2,603
55,068	4,196	42,179	8,584	43,984	4,766
49,930	5,623	33,943	13,458	40,683	5,312
35,409	13,345	25,035	21,786	26,260	9,866
30,958	16,904	20,706	32,120		
22,804	26,022				
21,269	28,328				
19,528	31,402				

Tabela A2. Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por etanol (1) + sal (2) + água (3) a 298 K

K₃PO₄		K₂HPO₄		KH₂PO₄/K₂HPO₄	
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
60,138	1,341	78,476	0,762	78,382	0,809
52,740	2,227	64,258	1,426	69,996	1,533
37,034	6,745	60,604	1,845	51,200	4,270
20,875	15,301	47,554	3,007	29,370	12,899
15,267	24,453	42,300	3,820	25,961	15,169
13,704	27,097	38,373	4,940	24,682	16,304
11,526	30,820	34,967	5,905	20,351	23,440
		26,540	9,882		
		23,790	12,840		
		21,849	14,043		
		19,301	16,259		
		14,201	21,136		
		10,116	26,963		

Tabela A3. Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por 1-propanol (1) + sal (2) + água (3) a 298 K

K₃PO₄		K₂HPO₄	
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
75,966	2,017	25,481	7,336
67,157	2,194	24,007	7,879
35,465	5,302	22,778	8,173
34,651	5,573	21,455	8,911
28,667	7,097	20,266	9,372
27,300	7,411	19,415	9,705
25,721	7,634	18,657	10,058
24,585	8,183	17,742	10,578
23,306	8,426	17,376	11,034
22,126	8,666	16,943	11,086
20,727	9,427	16,288	11,686
19,328	9,693	16,022	11,694
18,066	10,505	15,652	12,114
16,815	10,924	11,502	16,197
15,553	12,022	10,265	17,582
14,330	12,806		

Tabela A4. Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por 1-propanol (1) + K₂HPO₄/KH₂PO₄ (2) + água (3) a 298 K.

KH₂PO₄/K₂HPO₄			
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
33,330	6,670	75,336	2,332
30,252	7,605	67,423	2,856
28,011	8,284	36,421	6,075
25,494	9,222	35,320	6,375
23,454	10,248	32,464	7,166
22,019	10,710	30,086	7,692
20,680	11,277	29,417	7,921
19,175	12,187	28,685	8,116
17,950	12,863	10,287	20,607
15,949	14,418	8,112	24,408
13,873	16,024	6,390	27,628
12,177	17,855		

Tabela A5. Dados da fração mássica da curva binodal para o sistema composto por 2-propanol (1) + sal (2) + água (3) a 298 K.

K₃PO₄		K₂HPO₄		KH₂PO₄/K₂HPO₄	
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
76,040	1,980	75,480	2,260	77,449	1,276
29,226	12,604	65,908	2,824	66,984	1,816
19,924	16,607	27,032	10,638	36,671	6,221
17,517	19,203	24,824	11,858	33,497	7,366
15,280	21,730	23,327	12,746	29,687	9,595
13,110	24,430	21,718	13,849	26,655	11,486
11,486	26,655	20,954	14,339	24,430	13,110
9,595	29,687	19,826	15,172	21,730	15,280
7,366	33,497	11,548	22,134	19,203	17,517
6,221	36,671	9,225	24,513	16,607	19,924
4,760	40,190			14,192	22,334

