

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**RECUPERAÇÃO SELETIVA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E VANILINA DE
RESÍDUOS ALIMENTARES EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
CONTÍNUOS UTILIZANDO REATOR AGITADO POR IMPELIDORES**

Autor: Alex Viana Veloso

Orientadores: Prof. Álvaro Silva Lima, D. Sc.

Prof.^a Cleide Mara Faria Soares, D. Sc.

ARACAJU-SE, BRASIL
FEVEREIRO DE 2019

RECUPERAÇÃO SELETIVA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E VANILINA DE RESÍDUOS
ALIMENTARES EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS CONTÍNUO UTILIZANDO
REATOR AGITADO POR IMPELIDORES

Alex Viana Veloso

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. Cleide Mara Faria Soares



Dr. Hosiberto Batista Sant'Ana



Dr. Eliane Bezerra Cavalcanti



Dr. Matheus Mendonça Pereira

ARACAJU-SE, BRASIL

FEVEREIRO DE 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

V432r Veloso, Alex Viana.

Recuperação seletiva de ácido ascórbico e vanilina de resíduos alimentares em sistemas aquosos bifásicos contínuos utilizando um reator agitado por impelidores / Alex Viana Veloso; orientadores Álvaro Silva Lima, Cleide Mara Faria Soares – Aracaju, 2019.

85 p.: il. 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, 2019.

Inclui bibliografia.

1. SAB. 2. Contínuo. 3. Reatores. 4. Recuperação de biomoléculas. I. Veloso, Alex Viana. II. Lima, Álvaro Silva (orient.). III. Soares, Cleide Mara Faria (orient.). VI. Universidade Tiradentes - UNIT. V. Recuperação seletiva de ácido ascórbico e vanilina de resíduos alimentares através de sistemas aquosos bifásicos semi-contínuo utilizando um reator agitado por impelidores.

CDU: 57.088

“Somente se aproxima da perfeição quem a procura com
constância, sabedoria e sobre tudo muita humildade. ”

Jigoro Kano

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a minha família composta por minha avó Domingas, minha tia Arilene e minha irmã Renata, pela confiança depositada em mim e a ajuda prestada em todos os momentos que precisei. Em especial dedico esse trabalho a minha mãe Ariane Campos Viana a qual teve que se superar para criar dois filhos com sucesso. Agradeço a Lorenza Araújo Santos Viana pelo companheirismo, incentivo e confiança.

Agradeço ainda aos meus colegas de laboratório e do mestrado como um todo pelas constantes ajudas e ensinamentos fornecidos e as minhas alunas de iniciação científica Brenda Caroline e Sthefany Araújo sempre dispostas a ajudar e a aprender comigo.

E por fim, não menos importante, agradeço aos meus orientadores Álvaro Silva Lima e Cleide Mara Faria Soares pela paciência, ensinamentos e tempo dedicado durante todo o transcorrer do mestrado cheio de momentos de alegria e momentos mais estressantes, mas sempre prevalecendo o objetivo maior, ou seja, engrandecimento intelectual e profissional.

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.

RECUPERAÇÃO SELETIVA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E VANILINA DE RESÍDUOS ALIMENTARES EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS CONTÍNUO UTILIZANDO REATOR AGITADO POR IMPELIDORES

Alex Viana Veloso

Dentre as técnicas utilizadas para a recuperação de biomoléculas, pode-se destacar o Sistema Aquoso Bifásico (SAB) que se baseia na partição da biomolécula entre duas fases formadas por constituintes dispersos em água. A literatura tem destacado o potencial dos SAB em processo batelada para a recuperação de biomoléculas, entretanto, a aplicação e o estudo de SAB em operação contínua ainda são bastante incipientes. Atualmente, não existem reatores específicos para a aplicação em SAB contínuo e, portanto, se utiliza comumente os modelos de reatores difundidos na extração líquido-líquido convencional. Além disso, poucos dados relativos a parâmetros operacionais são reportados. Nesse contexto, esse trabalho desenvolveu um reator de coluna baseado no modelo amplamente difundido na indústria química, dispondo de: encamisamento para o controle de temperatura, duas alimentações e duas saídas, as quais permitem a circulação contínua das fases de topo e fundo formadoras do SAB. O desenho do reator contempla ainda um sistema de agitação mecânica utilizando impelidores de pás retas as quais são de fácil fabricação. O reator foi operado de forma contínua e semi-contínua utilizando um SAB formado C_2H_5OH (50%, m/m) + K_2HPO_4 (15%, m/m) + H_2O (35%, m/m) a 298K, o qual permitiu a análise da influência da vazão volumétrica e velocidade de agitação no índice de recuperação (IR) de duas biomoléculas distintas: ácido ascórbico (AA) e vanilina (van). Estas biomoléculas são bastante exploradas na indústria alimentícia em função do seu caráter antioxidante e saborizante respectivamente. Finalmente, utilizou-se uma matriz alimentar real, Pudim Diet Dr. Oetker sabor baunilha, onde foi possível particionar 75% do ácido ascórbico na fase de fundo e 62% e vanilina na fase de topo utilizando a menor rotação estudada (60 rpm) e a máxima vazão ($6,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), parâmetros que maximizam o IR das biomoléculas.

Palavras-chave: sistema aquoso bifásico, processo contínuo, desenho de reator, seletividade.

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.)

SELECTIVE RECOVERY OF ASCORBIC ACID AND VANILLIN OF FOOD WASTE IN CONTINUOUS AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM USING REACTOR STIRRING BY IMPELLERS

Alex Viana Veloso

Among the techniques used for the recovery of biomolecules, we can highlight the Aqueous Two-Phase System (ATPS), which is based on the partition of the biomolecule between two phases formed by constituents dispersed in water. The literature has highlighted the potential of the ATPS in batch process for the recovery of biomolecules, however, the application and the study of ATPS in continuous operation are still very incipient. Currently, there are no specific reactors for the application in continuous ATPS and, therefore, it is commonly used the models diffused in the conventional liquid-liquid extraction. In addition, few data on operational parameters are reported. In this context, this work developed a column reactor based on the reactors model widely diffused in the chemical industry, having: a jacketing system for temperature control, two inputs and two outputs, which allow continuous circulation of the top and bottom phases forming the ATPS. The design of the reactor also includes a mechanical agitation system using straight-blade impellers which are easy to manufacture. The reactor was operated continuously and semi-continuous using a ATPS formed for $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (50 wt%) + K_2HPO_4 (15 wt%) + H_2O (35 wt%) at 298K, which the analysis of the influence of volumetric flow rate and agitation speed on the recovery index (IR) of two different biomolecules: ascorbic acid (AA) and vanillin (van). These biomolecules are widely exploited in the food industry due to their antioxidant and flavoring character respectively. Finally, a real food matrix was used where it was possible to partition 75% of the ascorbic acid in the bottom phase and 62% and vanillin in the top phase using the lowest rotation studied (60 rpm) and the maximum flow ($6.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), parameters that maximize the IR of the biomolecules.

Keywords: aqueous two-phase system, continuous process, reactor design, selectivity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 BIOMOLÉCULAS.....	17
• Ácido Ascórbico.....	19
• Vanilina	20
3.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	23
3.2.1 Sistema Aquoso Bifásico (SAB).....	26
3.2.2 Seletividade de Biomoléculas.....	30
3.2.3 Sistemas Aquosos Bifásicos em Operação Contínua	32
• Reatores	34
4. PROJETO DO REATOR E DO SISTEMA DE AGITAÇÃO.....	38
5. ARTIGO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	79
7. TRABALHOS SUBMETIDOS	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	19
FIGURA 2: ESTRUTURA MOLECULAR DA VANILINA.	20
FIGURA 3: VANILLA PLANIFOLIA.	22
FIGURA 4: DIAGRAMA DE FASES DE UM SAB. OS PONTOS A, B E C APRESENTAM DISTINTAS RELAÇÕES DE VOLUME (V_R), ENTRE AS FASES DE TOPO E FUNDO, EM UMA MESMA TIE-LINE DELIMITADA PELOS PONTOS 1 E 2. O PONTO PC REPRESENTA O PONTO CRÍTICO DA SOLUÇÃO. ...	28
FIGURA 5: ETAPAS PARA EXECUÇÃO DO SAB CONTÍNUO.	33
FIGURA 6: COLUNAS ESTÁTICAS.	35
FIGURA 7: COLUNAS AGITADAS.	35
FIGURA 8: PROBLEMAS EM SAB CONTÍNUO: A) INUNDAÇÃO B) RETORNO DA MISTURA C) EMULSIFICAÇÃO D) BAIXA EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO DAS FASES.	37
FIGURA 9: MODELO DO PROTÓTIPO DE REATOR E REATOR CONSTRUÍDO.	38
FIGURA 10: DIMENSÕES DO REATOR (MILÍMETROS). PONTOS 1 E 2 ENTRADA E SAÍDA DO ENCAMISAMENTO. PONTOS 3 E 4 COLETAS DAS FASES COALESCIDAS E SEPARADAS. PONTOS 5 E 6 ALIMENTAÇÕES DAS FASES.	39
FIGURA 11: DIMENSÕES DO EIXO (MILÍMETROS) COM IMPELIDORES RETOS PERTENCENTE AO SISTEMA DE AGITAÇÃO.....	40
FIGURA 12: MONTAGEM DO REATOR E ESQUEMÁTICO DE OPERAÇÃO CONTÍNUA.....	40
FIGURA 13: DIMENSÕES DO CENTRALIZADOR (MILÍMETROS) DO SISTEMA DE AGITAÇÃO.....	41

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

FIGURE 1: DESIGN OF COLUMN REACTOR AND ITS CONSTITUENTS. A) DIMENSIONS OF THE REACTOR; B) DIMENSIONS OF IMPELLERS; C) DIMENSIONS OF THE CENTRALIZER; D) AXIS AND EQUIDISTANT IMPELLERS; E) ASSEMBLY OF THE REACTOR AND F) REAL REACTOR. ALL DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS.	49
FIGURE 2: EFFECT OF AGITATION SPEED (▲ - 60 RPM; ■ - 150 RPM; ◆ - 275 RPM AND ● - 360 RPM) IN RECOVERY INDEX OF VANILLIN - TOP PHASE (A) AND ASCORBIC ACID - BOTTOM PHASE (B) USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 M. DISPERSED PHASE FLOW RATE OF $3\text{ ML}\cdot\text{MIN}^{-1}$ OF VANILLIN $0.05\text{ MG}\cdot\text{ML}^{-1}$ (DISSOLVED IN BOTTOM PHASE) OR $0.02\text{ MG}\cdot\text{ML}^{-1}$ ASCORBIC ACID (DISSOLVED IN TOP PHASE). ...	52
FIGURE 3: EXPERIMENTAL DENSITY (A) AND VISCOSITY (B) FOR AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM BASED ON 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT DIFFERENT TEMPERATURES ($283.15 - 338.15$ K) AND 0.10 ± 0.01 MPA. ● - BOTTOM PHASE AND ■ - TOP PHASE.	53
FIGURE 4: EFFECT OF VOLUMETRIC FLOW RATE (▲- $1.5\text{ ML}\cdot\text{MIN}^{-1}$; ■ - $3.0\text{ ML}\cdot\text{MIN}^{-1}$; ◆ - $4.5\text{ ML}\cdot\text{MIN}^{-1}$ AND ● - $6.0\text{ ML}\cdot\text{MIN}^{-1}$) OF VANILLIN $0.05\text{ MG}\cdot\text{ML}^{-1}$ (DISSOLVED IN BOTTOM PHASE) OR $0.02\text{ MG}\cdot\text{ML}^{-1}$ ASCORBIC ACID (DISSOLVED IN TOP PHASE) IN RECOVERY INDEX OF VANILLIN - TOP PHASE (A) AND ASCORBIC ACID - BOTTOM PHASE (B) USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA. AGITATION SPEED OF 60 RPM.....	54

FIGURE 5: RECOVERY INDEX OF ASCORBIC ACID IN THE BOTTOM PHASE (●) AND VANILLIN IN THE TOP PHASE (■) (A), PARTITION COEFFICIENT OF ASCORBIC ACID (—) AND VANILLIN (—), AND SELECTIVITY (—) (B) USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM (PROTOCOL 3) COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT 60 RPM, $6.0\text{ ML}\cdot\text{MIN}^{-1}$, $298.15 \pm 1\text{ K}$ AND 0.1 MPA .. 56

FIGURE 6: RECOVERY INDEX OF ASCORBIC ACID IN THE BOTTOM PHASE (●) AND VANILLIN IN THE TOP PHASE (■) FROM PUDIM DIET DR. OETKER (A), PARTITION COEFFICIENT OF ASCORBIC ACID (—) AND VANILLIN (—), AND SELECTIVITY (—) (B) USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM (PROTOCOL 4) COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT 60 RPM, $6.0\text{ ML}\cdot\text{MIN}^{-1}$, $298.15 \pm 1\text{ K}$ AND 0.1 MPA 57

FIGURE S1: SCHEME OF REACTOR OPERATION USING PROTOCOL 1 WITH THE INJECTION OF VANILLIN DISSOLVED FROM THE BOTTOM PHASE ($C_0 = 0.05\text{ MG / ML}$) AND INJECTED BY THE TOP OF THE REACTOR. (SEMI-CONTINUOUS MODE)..... 65

FIGURE S2: SCHEMATIC OF REACTOR OPERATION USING PROTOCOL 2 WITH THE INJECTION OF DISSOLVED ASCORBIC ACID FROM THE TOP PHASE ($C_0 = 0.02\text{ MG / ML}$) BEING INJECTED FROM THE BOTTOM OF THE REACTOR. (SEMI-CONTINUOUS MODE) 65

FIGURE S3: SCHEME OF REACTOR OPERATION USING PROTOCOL 3 WITH VALININE INJECTION DISSOLVED IN THE BOTTOM PHASE ($C_0 = 0.05\text{ MG / ML}$) AND ASCORBIC ACID DISSOLVED IN THE TOP PHASE ($C_0 = 0.02\text{ MG / ML}$). THE PHASES ARE INJECTED COUNTERCURRENT SIMULTANEOUSLY. (CONTINUOUS MODE)..... 66

FIGURE S4: SCHEME OF REACTOR OPERATION USING PROTOCOL 4 WITH THE INJECTION OF DIET PUDDING DR. OETKER DISSOLVED FROM THE BOTTOM PHASE ($C_0 = 0.015\text{ MG / ML}$) AND INJECTED BY THE TOP OF THE REACTOR. (SEMI-CONTINUOUS MODE)..... 66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PRINCIPAIS AGENTES DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	18
TABELA 2: PROPRIEDADES DO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	19
TABELA 3: PROPRIEDADES DA VANILINA	21
TABELA 4: CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS SAB E SUAS CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS.....	27
TABELA 5: SAB APLICADOS A RECUPERAÇÃO DE VANILINA.....	31
TABELA 6: SAB APLICADOS A RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO OU ANTIOXIDANTES	32
TABELA 7: CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS DOS REATORES UTILIZADOS EM SAB CONTÍNUOS.....	36

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

TABLE 1: EFFECT OF AGITATION SPEED IN THE PARAMETERS FOR MASS TRANSFER OF BIOMOLECULES IN ATPS AFTER THE STEADY STATE.....	52
TABLE 2: EFFECT OF DISPERSED PHASE FLOW RATE IN THE PARAMETERS FOR MASS TRANSFER OF BIOMOLECULES IN ATPS AFTER THE STEADY STATE.....	55
TABLE S1. EFFECT OF AGITATION SPEED (60 RPM; 150 RPM; 275 RPM AND 360 RPM) IN RECOVERY INDEX OF VANILLIN IN TOP PHASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA OPERATED IN SEMI-CONTINUOUS MODE. DISPERSED PHASE FLOW RATE OF $3.0 \text{ ML} \cdot \text{MIN}^{-1}$ OF VANILLIN $0.05 \text{ MG} \cdot \text{ML}^{-1}$ (DISSOLVED IN BOTTOM PHASE).	65
TABLE S1 (CONT). EFFECT OF AGITATION SPEED (60 RPM; 150 RPM; 275 RPM AND 360 RPM) IN RECOVERY INDEX OF VANILLIN IN TOP PHASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA OPERATED IN SEMI-CONTINUOUS MODE. DISPERSED PHASE FLOW RATE OF $3.0 \text{ ML} \cdot \text{MIN}^{-1}$ OF VANILLIN $0.05 \text{ MG} \cdot \text{ML}^{-1}$ (DISSOLVED IN BOTTOM PHASE).	68
TABLE S2. EFFECT OF AGITATION SPEED (60 RPM; 150 RPM; 275 RPM AND 360 RPM) IN RECOVERY INDEX OF ASCORBIC ACID IN BOTTOM PHASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA OPERATED IN SEMI-CONTINUOUS MODE. DISPERSED PHASE FLOW RATE OF $3.0 \text{ ML} \cdot \text{MIN}^{-1}$ OF ASCORBIC ACID $0.02 \text{ MG} \cdot \text{ML}^{-1}$ (DISSOLVED IN TOP PHASE).	69
TABLE S2 (CONT). EFFECT OF AGITATION SPEED (60 RPM; 150 RPM; 275 RPM AND 360 RPM) IN RECOVERY INDEX OF ASCORBIC ACID IN BOTTOM PHASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA OPERATED IN SEMI-CONTINUOUS MODE. DISPERSED PHASE FLOW RATE OF $3.0 \text{ ML} \cdot \text{MIN}^{-1}$ OF ASCORBIC ACID $0.02 \text{ MG} \cdot \text{ML}^{-1}$ (DISSOLVED IN TOP PHASE).	70
TABLE S3. EXPERIMENTAL DENSITY AND VISCOSITY FOR AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM BASED ON 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT DIFFERENT TEMPERATURES ($283.15 - 338.15$ K) AND 0.10 ± 0.01 MPA OF TOP PHASE.	71
TABLE S4. EXPERIMENTAL DENSITY AND VISCOSITY FOR AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM BASED ON 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K_2HPO_4 + 35 WT% WATER AT DIFFERENT TEMPERATURES ($283.15 - 338.15$ K) AND 0.10 ± 0.01 MPA OF BOTTOM PHASE.	71

TABLE S5. EFFECT OF VOLUMETRIC FLOW RATE (1.5 MG.ML⁻¹; 3.0 MG.ML⁻¹; 4.5 MG.ML⁻¹ AND 6.0 MG.ML⁻¹) OF VANILLIN 0.05 MG.ML⁻¹ (DISSOLVED IN BOTTOM PHASE) IN RECOVERY INDEX OF VANILLIN - TOP PHASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K₂HPO₄ + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA OPERATED IN SEMI-CONTINUOUS MODE. AGITATION SPEED OF 60 RPM.	72
TABLE S5 (CONT). EFFECT OF VOLUMETRIC FLOW RATE (1.5 MG.ML⁻¹; 3.0 MG.ML⁻¹; 4.5 MG.ML⁻¹ AND 6.0 MG.ML⁻¹) OF VANILLIN 0.05 MG.ML⁻¹ (DISSOLVED IN BOTTOM PHASE) IN RECOVERY INDEX OF VANILLIN - TOP PHASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K₂HPO₄ + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA OPERATED IN SEMI-CONTINUOUS MODE. AGITATION SPEED OF 60 RPM.	73
TABLE S6. EFFECT OF VOLUMETRIC FLOW RATE (1.5 MG.ML⁻¹; 3.0 MG.ML⁻¹; 4.5 MG.ML⁻¹ AND 6.0 MG.ML⁻¹) OF 0.02 MG.ML⁻¹ ASCORBIC ACID (DISSOLVED IN TOP PHASE) IN RECOVERY INDEX OF ASCORBIC ACID - BOTTOM PHASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K₂HPO₄ + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA OPERATED IN SEMI-CONTINUOUS MODE. AGITATION SPEED OF 60 RPM.	74
TABLE S6 (CONT). EFFECT OF VOLUMETRIC FLOW RATE (1.5 MG.ML⁻¹; 3.0 MG.ML⁻¹; 4.5 MG.ML⁻¹ AND 6.0 MG.ML⁻¹) OF 0.02 MG.ML⁻¹ ASCORBIC ACID (DISSOLVED IN TOP PHASE) IN RECOVERY INDEX OF ASCORBIC ACID - BOTTOM PHASE USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K₂HPO₄ + 35 WT% WATER AT 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA OPERATED IN SEMI-CONTINUOUS MODE. AGITATION SPEED OF 60 RPM.	75
TABLE S7. RECOVERY INDEX OF VANILLIN IN THE TOP PHASE, PARTITION COEFFICIENT VANILLIN, AND SELECTIVITY USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM (PROTOCOL 3 – CONTINUOUS MODE) COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K₂HPO₄ + 35 WT% WATER AT 60 RPM, 6.0 ML.MIN⁻¹, 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA.	76
TABLE S8. RECOVERY INDEX OF ASCORBIC ACID IN THE BOTTOM PHASE, PARTITION COEFFICIENT OF ASCORBIC ACID, AND SELECTIVITY USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM (PROTOCOL 3 – CONTINUOUS MODE) COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K₂HPO₄ + 35 WT% WATER AT 60 RPM, 6.0 ML.MIN⁻¹, 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA.	77
TABLE S9. RECOVERY INDEX OF VANILLIN IN THE TOP PHASE FROM PUDIM DIET DR. OETKER, PARTITION COEFFICIENT OF VANILLIN, AND SELECTIVITY USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM (PROTOCOL 4 – SEMI-CONTINUOUS MODE) COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K₂HPO₄ + 35 WT% WATER AT 60 RPM, 6.0 ML.MIN⁻¹, 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA.	78
TABLE S10. RECOVERY INDEX OF ASCORBIC ACID IN THE BOTTOM PHASE FROM PUDIM DIET DR. OETKER, PARTITION COEFFICIENT OF ASCORBIC ACID, AND SELECTIVITY USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM (PROTOCOL 4 – SEMI-CONTINUOUS MODE) COMPOSED BY 50 WT% ETHANOL + 15 WT% K₂HPO₄ + 35 WT% WATER AT 60 RPM, 6.0 ML.MIN⁻¹, 298.15 ± 1 K AND 0.1 MPA.	78

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

Do campo à mesa do consumidor, os alimentos passam por diferentes processos gerando resíduos ou ações que levam ao desperdício. De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), cerca de um terço da produção global de alimentos são perdidos ou desperdiçados, o que representa cerca de 1,3 bilhão de toneladas por ano (GUSTAVSSON *et al.*, 2011). Se por um lado esse dado se mostra catastrófico no sentido do desperdício, por outro lado ele fomenta o interesse científico no desenvolvimento de técnicas e equipamentos que possibilitem, de forma oportuna e rentável, recuperar biomoléculas de alto valor agregado, as quais poderiam ser reutilizadas como insumo na produção de novos produtos.

Existem inúmeros métodos de extração de biomoléculas que podem ser divididos em: métodos convencionais de extração utilizando solventes orgânicos à quente ou à frio, e métodos não convencionais como a extração em fluido supercrítico, extração por micro-ondas e extração por ultrassom. No entanto, essas técnicas consomem quantidades elevadas de solventes ou requerem equipamentos e/ou procedimentos dispendiosos. Ademais, podem apresentar condições operacionais que sejam danosas às biomoléculas, já que algumas vezes requerem condições de alta temperatura e pressão.

Uma estratégia de extração líquido-líquido (LLE) conhecida por sistema aquoso bifásico (SAB) pode ser uma alternativa viável para extração/purificação de biomoléculas, uma vez que não requer o uso de equipamentos dispendiosos, uso excessivo de solventes e podem ser formados utilizando uma série de compostos como polímeros, sais inorgânicos, líquidos iônicos, álcoois, dentre outros (GARZA-MADRID *et al.*, 2010). RAGHAVARAO *et al.* (2003) ressalta que SAB é reconhecido como uma técnica potencial devido às suas múltiplas vantagens, incluindo: compatibilidade biológica, baixa tensão interfacial, alta capacidade de carga e aumento de escala com facilidade sendo largamente explorado para a recuperação de diversas biomoléculas como anticorpos (ROSA *et al.*, 2012), proteínas e enzimas (FIGUEIREDO PORTO *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2018), toxinas (CAVALCANTI *et al.*, 2008), antioxidantes (REIS *et al.*, 2012), antibióticos (RABIEENEZHAD; ROOSTA, 2018), metais (CHEN *et al.*, 2018), dentre outras. Apesar da grande quantidade de estudos e do conhecimento adquirido a

utilização em escala industrial de SAB tem tido forte resistência, visto que, a maioria desses estudos foram realizados em modo de operação por batelada. Esse tipo de operação geralmente possui custos operacionais elevados pois não são integrados com outras etapas dos processos industriais. A integração dos processos tem como finalidade fornecer insumos para compor as fases do SAB visando a separação/recuperação de biomoléculas ou suprir processos subsequentes com as biomoléculas recuperadas.

Nesse sentido uma mudança para a operação contínua pode melhorar o rendimento de um processo e reduzir substancialmente os custos de operacionalização, viabilizando a extração ou recuperação dessas biomoléculas de forma flexível às demandas do processo industrial e rentável economicamente. Estes aspectos são importantes para estratégias futuras de implementação de sistemas contínuos nas indústrias. No entanto, estudos envolvendo a caracterização e o desenvolvimento de equipamentos adequados para a operação contínua de SAB têm sido geralmente negligenciados e os processos por batelada ainda são os mais utilizados na biotecnologia (ESPITIA-SALOMA *et al.*, 2014; JUNGBAUER, 2013). De acordo com RITO-PALOMARES (2017), ainda não existem equipamentos especializados para utilização de SAB contínuos e atualmente para essas aplicações utilizam-se principalmente as colunas empregados na tradicionais LLE. Além disso, poucos estudos relativos à geometria e aos efeitos hidrodinâmicos dos reatores contribuem para o conservadorismo das indústrias de biotecnologia em utilizar a operação em batelada.

Encontra-se nesse cenário um desafio tecnológico e científico de preencher essa lacuna por meio do desenvolvimento de novos desenhos de reatores que possibilitem a recuperação e reutilização de biomoléculas por meio de SAB, e que simultaneamente mitiguem o elevado desperdício de alimentos os quais são fontes de matérias-primas de alto valor agregado e que podem incrementar a receita das indústrias além de ser uma prática sustentável. Assim, esse estudo visa projetar e desenvolver um protótipo de reator em formato coluna para operação contínua de recuperação de biomoléculas utilizando SAB que permita o bombeamento simultâneo ou individual das duas fases do SAB, sistema de agitação para uma maior mistura e coalescência entre as fases e o controle de temperatura para adequação das características termodinâmicas do SAB e da manutenção das características das biomoléculas sensíveis a temperatura.

A operação contínua permitirá o estudo do particionamento e recuperação de biomoléculas. Neste sentido, serão utilizados produtos alimentícios fora do período de validade para o consumo humano caracterizam-se como resíduos alimentares e que

tenham biomoléculas de alta valor comercial. Desta forma foi selecionado duas biomoléculas modelos com características antioxidantes, ácido ascórbico e vanilina, as quais são facilmente encontradas em alimentos processados e industrializados. A recuperação dessas biomoléculas são de grande interesse industrial uma vez que são utilizados como conservantes, atrasando ou impedindo a deterioração dos alimentos por mecanismos oxidativos, além de possuírem características saborizantes e odorizantes únicas (STANNER; WEICHSELBAUM, 2013). Ressalta-se que não existem na literatura estudos vinculados operação contínua para a recuperação das biomoléculas modelos selecionadas. Por outro lado, REIS *et al.* (2012), mostrou ser possível a recuperação dessas biomoléculas com grande eficiência em operação batelada o que possibilita a comparação entre os métodos de operação.

Capítulo 2

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Projetar um reator em escala de bancada para a aplicação em sistemas aquosos bifásicos (SAB) operando de modo contínuo para permitir o particionamento de uma ou duas biomoléculas simultaneamente com a determinação de parâmetros ótimos (vazão volumétrica, velocidade de agitação e temperatura), de modo a verificar o ponto ótimo para a recuperação do soluto de interesse na fase de maior afinidade.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho tem como objetivos específicos:

- Desenvolver um desenho de reator de bancada dotado de sistema de encamisamento e agitação a ser operado de modo contínuo e semi-contínuo aplicado a SAB;
- Utilizar duas biomoléculas (ácido ascórbico e vanilina) de forma individual (operação semi-contínua) e simultânea (operação contínua) para elaboração das curvas que representam o índice de recuperação do soluto nas fases de topo e de fundo do SAB;
- Definir os parâmetros (vazão volumétrica e rotação) que maximizam a recuperação das biomoléculas estudadas nas fases de maior afinidade, e;
- Utilizar um modelo de produto alimentício para a recuperação das biomoléculas (ácido ascórbico e vanilina) de interesse.

Capítulo 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico serão apresentados o estado da arte referente às propriedades das biomoléculas de interesse e os métodos de extração das mesmas, em especial a revisão bibliográfica quanto à aplicação da técnica de extração líquido-líquido, focado no sistema aquoso bifásico (SAB). Além disso, serão abordados os métodos de operação em batelada e contínuo e os principais modelos de reatores utilizados.

3.1 Biomoléculas

As biomoléculas ou ainda molécula biológica são substâncias químicas sintetizadas por organismos vivos durante o seu metabolismo e, estão presentes na sua estrutura ou desempenham papel importante na manutenção e desenvolvimento celular. Estas moléculas caracterizam-se por apresentarem diversas funções químicas e distintos graus de complexidade por exemplo: conduzir e regular de processos celulares ou ainda transmitir informações genéticas (LIMA; SANTANA, 2017). Exemplos de biomoléculas são as proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos, vitaminas, hormônios, alcaloides, flavonoides, antioxidantes, entre outros (GREISLER, 2003; OLSZOWY; BURNS; CIBOROWSKI, 2013).

Dentre as biomoléculas citadas anteriormente, podemos destacar as biomoléculas antioxidantes, as quais de acordo com estudos mercadológicos mais recentes, movimentaram no ano de 2007, um volume total de cerca de 880 mil toneladas e 3,7 bilhões de dólares. Esses altos valores estão associados a grande aplicabilidade industrial dessas biomoléculas como produção de fármacos, utilização como conservante de alimentos, utilização como estabilizador de combustíveis e lubrificantes ou ainda como preventor de degradação oxidativa de polímeros como borrachas, plásticos e adesivos, evitando a perda de robustez e flexibilidade (CERESANA, 2013).

A oxidação é uma reação química que transfere elétrons de uma substância para um agente oxidante. Embora as reações de oxidação sejam fundamentais para os seres vivos, elas também podem ser prejudiciais, pois podem produzir radicais livres como produto das reações metabólicas. Esses radicais livre dão início a reações em cadeia que

podem modificar moléculas importantes como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, afetando o funcionamento normal e causando doenças como câncer, envelhecimento precoce dos tecidos, lesões em órgãos como fígado, entre outros (SIES, 1997).

Por outro lado, as moléculas antioxidantes são substâncias que possuem a capacidade de neutralizar ou eliminar os radicais livres, através da sua própria oxidação, sendo assim os antioxidantes são frequentemente agentes de redução e defesa. Esses agentes de defesa antioxidante podem ser classificados em enzimáticos ou não-enzimáticos, como apresentado na Tabela 1. Ademais substâncias polifenólicas, metais e minerais como zinco e selênio, que são componentes essenciais das enzimas antioxidantes, demonstram potencial antioxidante (SCHYVENS, 2014).

Tabela 1: Principais agentes de defesa antioxidante.

Não-enzimático	Enzimático
α -tocoferol (vitamina E)	superóxido dismutase
β -caroteno	catalase
ácido ascórbico (vitamina C)	glutathione peroxidase

Fonte: (SIES, 1997).

Um fato importante é que o organismo humano possui uma deficiência parcial do sistema antioxidante enzimático, necessitando a ingestão de compostos antioxidantes por meio de dieta alimentar, o que contribui para o mecanismo de antioxidantes não-enzimático (PIETTA *et al.*, 1998). Apesar das fontes geradoras de radicais livres diminuírem os níveis de antioxidantes celulares, as defesas antioxidantes do organismo podem ser restabelecidas com dietas apropriadas e suplementos vitamínicos. Dentre os alimentos, as frutas, verduras e legumes são as principais fontes de agentes antioxidantes. A vitamina C e os compostos fenólicos são considerados excelentes antioxidantes, capazes de sequestrar os radicais livres com grande eficiência (ANDERSON, 1996).

Em função dessas características, selecionaram-se a vitamina C e a vanilina (substância fenólica) como substâncias modelo para o estudo, as quais serão descritas com maiores detalhes a seguir.

- Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (AA), também conhecido como vitamina C, é o nome comum dado ao ácido 2,3-enediol-L-gulônico. O AA é o mais conhecido antioxidante, possuindo inúmeras funções bioquímicas como a capacidade de reação com oxigênio singlete (O_2^-) e outros radicais livres como a peroxila (OH^-), participação na formação do colágeno, síntese de alguns aminoácidos e auxílio na atividade enzimática por meio da doação de elétrons (YARDIM-AKAYDIN *et al.*, 2003). A fórmula química do AA é $C_6H_8O_6$, cuja estrutura molecular pode ser observada na Figura 1, verificando que sua estrutura se assemelha a de um monossacarídeo, apresentando extraordinário poder redutor devido à sua configuração enediol $C(OH)=C(OH)$ (CHANG; ISMAIL; DAUD, 2016).

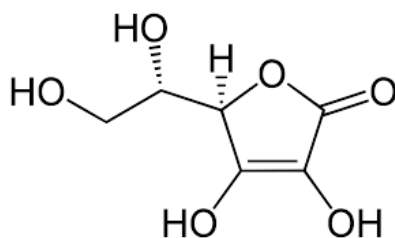


Figura 1: Estrutura molecular do ácido ascórbico.

Entretanto, o AA possui uma grande instabilidade quando exposto ao calor, luminosidade e oxigenação, podendo gerar alterações na sua estrutura e, conseqüentemente, na sua capacidade oxidativa (ARRIGONI; DE TULLIO, 2002). A Tabela 2 apresenta algumas propriedades químicas do AA onde pode-se destacar a sua grande solubilidade em água e seu potencial hidrofílico.

Tabela 2: Propriedades do Ácido Ascórbico

Propriedade	Valores
Massa Molar	176,124 g/mol
Densidade	1,694 g/cm ³
Log P	-1,88
Ponto de Fusão	155,71°C
Ponto de Ebulição	424,64°C
Solubilidade em	Água 330 g/L
	Etanol 20 g/L

Fonte:(CHEMSPIDER, 2018).

O AA natural pode ser obtido facilmente em diversas frutas e verduras, principalmente em frutas cítricas, goiabas, tomates, pimentões, kiwis e brócolis. Além disso, ele pode ser obtido de forma sintética utilizando glicose como molécula precursora (reagente) para depois submetê-la a processos fermentativos envolvendo reduções e oxidações até a obtenção do AA (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2003).

Além do seu papel nutricional, o ácido ascórbico é comumente utilizado como antioxidante nas indústrias para preservar o sabor e a cor natural de alimentos e rações animais, usado como aditivo nutricional em bebidas e cereais matinais, aplicados em formulações farmacêuticas e cosméticas, por essa razão, o AA é manufaturado em larga escala (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2003). A produção mundial é estimada em 154 mil toneladas por ano e o mercado da vitamina C tem se tornando cada vez mais competitivo sendo o seu valor comercial oscilando entre US\$ 6,00 e US\$ 11,00 por quilograma segundo estudos mercadológicos mais recentes (HANCOCK, 2009).

- Vanilina

Vanilina é o nome comum para o 3-metoxi-4-hidroxi-benzaldeído a qual caracteriza um aldeído fenólico sendo composto pelos grupos funcionais aldeído, éter e fenol (ESPOSITO *et al.*, 2000). A vanilina possui fórmula química $C_8H_8O_3$, e a sua estrutura molecular é apresentada na Figura 2.

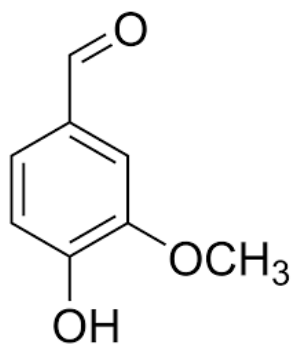


Figura 2: Estrutura molecular da vanilina.

Em virtude da sua característica fenólica a vanilina demonstra potencial antioxidante, promovendo a remoção ou inativação dos radicais livres, por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia, e está representado pelas reações abaixo onde os agentes antioxidantes agem por meio da transferência de hidrogênio para o radical $ROO^\bullet$ formando o radical fenoxil, este se torna

estável e inerte perdendo sua capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas conforme equações abaixo (RAMALHO; JORGE, 2006):



onde $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{R}^\bullet$ são radicais livres, AH um antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e $\text{A}^\bullet$ um radical inerte.

A vanilina é uma biomolécula de grande valor comercial devido à concentração da produção em poucos produtores e, principalmente, em função da sua extensa gama de aplicações industriais relacionadas a sua característica de aroma e de seu sabor único conhecido como baunilha sendo utilizada na preparação de sorvetes, chocolates, bolos, refrigerantes, licores, na indústria de perfumaria, bem como na indústria de cosméticos com o objetivo de criar perfumes, mascarar odores desagradáveis, e na obtenção de produtos de limpeza (ESPOSITO *et al.*, 2000; PACHECO; DAMASIO, 2010). Além dessas aplicações, a vanilina também é usada como um intermediário químico na produção de produtos farmacêuticos e produtos de química fina para uso em biocidas (devido à sua estrutura fenólica) (KAYGORODOV *et al.*, 2010; NOUBIGH; MGAIDI; ABDERRABBA, 2010). Vale ainda ressaltar que a vanilina possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes sendo bastante utilizado como conservante de alimentos (JADHAV *et al.*, 2009; TAI *et al.*, 2011). Algumas das propriedades da vanilina podem ser encontradas na Tabela 3, onde pode-se destacar a sua boa solubilidade em etanol e o seu potencial hidrofóbico.

Tabela 3: Propriedades da Vanilina

Propriedade		Valores
Massa Molar		152,147 g/mol
Densidade		1,20 g/cm ³
Log P		1,05
Ponto de Fusão		71,55°C
Ponto de Ebulição		274,30°C
Solubilidade em	Água	10 g/L
	Etanol	50 g/L

Fonte:(CHEMSPIDER, 2018).

A forma natural da vanilina é obtida principalmente da *Vanilla planifolia* A. (Figura 3), espécie pertencente à família das orquídeas. Essa espécie é cultivada principalmente no México, Madagascar, Java e Taiti (VIDAL *et al.*, 2006). No Brasil são listadas 31 espécies da família *Vanilla*, mas nenhuma delas é explorada comercialmente, pois seu sabor é diferente da planta da baunilha mundialmente conhecida (MAY *et al.*, 2006).

Além da forma natural que pode ser obtida pelos processos de extração sólido-líquido da vagem da *Vanilla*, a vanilina pode ser sintetizada a partir de percussores oriundos da indústria petroquímica como guaiacol e o p-cresol ou ainda utilizando lignina como percussora (MUKHOPADHYAY, 2005).



Figura 3: *Vanilla Planifolia*.
Fonte:(MANNERS, 2018).

Os dados mercadológicos mais recentes fornecidos por LOMASCOLO *et al.* (1999), afirmam que mais de 12 mil toneladas de vanilina são produzidas por ano. Os custos de produção da vanilina natural oscilam entre US\$ 1.200,00 e 1.400,00 por quilograma, e o preço da vanilina sintética, custa aproximadamente US\$ 15,00 por quilograma. Devido a essas características, a vanilina se caracteriza como uma biomolécula relevante para diversas finalidades e associada à escassez da mesma por fontes naturais, a síntese e rotas para a extração, purificação além da recuperação em resíduos alimentares, deste composto são exploradas visando obter processos viáveis economicamente e ambientalmente seguros (REIS *et al.*, 2012).

As competitividades industriais, principalmente nos setores alimentícios e farmacêuticos, alavancam o desenvolvimento de novas técnicas de extração e purificação de biomoléculas de forma a acelerarem o processo e aumentar o seu grau de pureza, porém, mantendo o custo favorável. Nesse cenário, serão apresentados os principais métodos de extração e purificação das biomoléculas de interesse nesse estudo.

3.2 Métodos de Extração e Purificação de Biomoléculas

Extração é um processo no qual um ou mais componentes são separados seletivamente, ou não, de uma matriz sólida ou líquida, portanto, resulta nas extrações sólido-líquido e líquido-líquido. A força motriz para a transferência da biomolécula da matriz para o solvente, é a solubilidade de cada componente, resultando assim em duas fases, uma enriquecida (extrato) e outra pobre (refinado) no componente a ser separado (LIMA; SANTANA, 2017).

Os métodos de extração de biomoléculas podem ser classificados em métodos tradicionais, como extração por solvente à quente ou a frio, como é o caso do Soxhlet, e as, metodologias não-convencionais, tais como: extração com fluidos supercríticos (SCF), extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, microextração em fase sólida, dentre outros processos (EKEZIE; SUN; CHENG, 2017; TETALA; VIJAYALAKSHMI, 2016). Entretanto a técnica a ser utilizada dependerá: do grau de pureza exigido; das condições de operação (pressão, temperatura, etc.), tendo em foco não degradar a biomolécula; da taxa de separação da biomolécula; e, claro do custo envolvido no processo. Mediante as essas características, pode-se analisar as 3 (três) opções bastante utilizadas para a extração de compostos vegetais e alimentícios, são eles: solventes orgânicos, fluidos supercríticos e ultrassom.

A extração Soxhlet é um método de extração conhecida como “extração sólido-líquido” e classicamente denominada de lixiviação o qual objetiva a extração de um composto sólido geralmente utilizando solventes orgânicos. A eficiência do processo depende da escolha correta de solventes e do uso de calor e/ou agitação para aumentar a solubilidade dos compostos e a taxa de transferência de massa. Esse método apresenta algumas vantagens atraentes como baixo custo, baixa complexidade de operação e maior transferência de massa que os métodos de extração mais novos (extração por fluidos supercríticos, extração assistida por ultrassom, etc.), o que faz que ele ainda seja um método bastante utilizado (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Entretanto, as principais desvantagens do Soxhlet, em comparação com outras técnicas, estão relacionadas ao tempo necessário para a extração da biomolécula e a grande quantidade de solvente desperdiçado, o que não é apenas dispendioso, mas também a fonte de problemas ambientais adicionais. Além disso, as amostras são geralmente extraídas no ponto de ebulição do solvente por longos períodos, o que pode resultar em

decomposição térmica de espécies alvo voláteis (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA AYUSO, 2000; SINHA *et al.*, 2008).

A extração com fluidos supercríticos (SCF) representam uma alternativa aos solventes orgânicos, contudo o solvente utilizado encontra-se em seu estado crítico, ou seja, condições de temperatura e pressão do solvente deverá ser superior à sua temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). A especificidade do SCF depende de suas propriedades físicas, que podem ser moduladas por um aumento de pressão e/ou temperatura, além de seus valores críticos. Vale ressaltar que o SCF tem uma densidade próxima aos líquidos, o que induz um poder de solvatação próxima aos líquidos e sua viscosidade está próxima a dos gases denotando uma difusividade entre líquidos e gases, esses fatores resultam no aumento da transferência de massa entre a extração do soluto e o SCF. Essas propriedades permitem o ajuste da seletividade do solvente de um SCF em direção a um composto alvo, o que é particularmente interessante no caso da extração. Dentre os fluidos supercríticos, o fluido formado por dióxido de carbono (SC-CO₂) é o mais utilizado devido as suas baixas coordenadas críticas ($T_c = 31^\circ\text{C}$ e $P_c = 7,38\text{ MPa}$), caráter não inflamável e volatilidade à pressão atmosférica o que garante extratos livres de solvente após a despressurização (CHEMAT *et al.*, 2017).

Por sua vez, as ondas ultrassônicas possuem frequência inaudível pelos seres humanos. O equipamento denominado de ultrassom de potência (US) emite ondas com baixa frequência e uma alta potência, e o seu uso causa cavitação (PANIWNYK, 2014). O fenômeno de cavitação acústica gera microbolhas em uma fase líquida e ao sujeitar uma mistura ao US essas microbolhas crescerão e oscilarão rapidamente antes do colapso devido a mudanças de pressão. Essas implosões violentas fragmentarão ou interromperão a superfície da matriz sólida ou ainda causarão a instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás, aumentando a transferência de massa e acelerando a difusão. Assim, a eficácia da extração por ultrassom depende da temperatura e pressão aplicada e principalmente da frequência acústica pois, baixas frequências geram bolhas maiores e, portanto, um colapso de bolhas mais violento com temperaturas e pressões localizadas mais altas. No entanto, à medida que a frequência aumenta, há mais eventos de colapso por unidade de tempo (CHEMAT *et al.*, 2017). Vale ressaltar que, o US reduzirá drasticamente o tamanho das partículas sólidas, o que aumentará sua solubilidade sendo assim usado para dispersão sólida em solvente.

De modo geral, a extração assistida por ultrassom é uma tecnologia com grande potencialidade para acelerar a transferência de calor e massa. As ondas de ultrassom após

a interação com a mistura alteram suas propriedades físicas e químicas e seu efeito cavitatório facilitando a liberação de compostos extraíveis. Os ultrassons são empregados sucessivamente no campo de extração de plantas (GUO *et al.*, 2017). Várias classes de componentes alimentares, como aromas, pigmentos, antioxidantes e outros compostos orgânicos e minerais, foram extraídos e analisados eficientemente a partir de uma variedade de matrizes de origem animal, alimentar ou vegetal (BARBERO *et al.*, 2008; CHEMAT *et al.*, 2017; PANIWNKY, 2014).

Ao comparar as técnicas de extração citadas anteriormente observa-se que o método convencional e as técnicas mais recentes exigem ou alto consumo de solventes ou equipamentos mais robustos e de custo elevado devido às altas pressões e temperaturas utilizadas o que nem sempre condiz com o aumento da taxa de extração da biomolécula.

Uma vez extraída a biomolécula de interesse, sua aplicação dependerá do grau de pureza que ela apresenta. Sendo assim, procedimentos adicionais de purificação necessitam ser implementados. No entanto, é sabido que a purificação requer até 80% dos gastos para a obtenção de biomoléculas puras. Comumente, as metodologias de purificação baseiam-se em procedimentos de precipitação, filtração em membranas e cromatografia (LIMA; SANTANA, 2017). Ademais a escolha do processo a ser utilizado dependerá também das condições de operação de modo a não comprometer a biomolécula não só estruturalmente, mas também suas características intrínsecas por exemplo, a extração de vanilina utilizando fluidos supercríticos resulta em uma menor proporção de seus constituintes principais do sabor de baunilha dos extraídos por processos convencionais de extração alcoólica, ou seja, apesar de termos a mesma biomolécula temos sabores distintos (SINHA *et al.*, 2008).

Nesse cenário, a extração e purificação da biomolécula utilizando sistema aquoso bifásico (SAB) torna-se uma alternativa atraente pois, esse método utiliza um único passo e além disso, têm sido amplamente utilizados para a separação e recuperação de produtos biológicos como proteínas, enzimas, componentes biológicos valiosos para indústria farmacêutica, como anticorpos, ácidos nucleicos, hormônios, vitaminas e antioxidantes, entre outros (ASENJO; ANDREWS, 2011; CLÁUDIO *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2012, 2014). Além disso, o alto teor de água nas fases do sistema garante alta estabilidade das biomoléculas ao longo do processo de extração/purificação, o que pode resultar em maiores rendimentos, algo bastante almejado industrialmente (ALCÂNTARA *et al.*, 2013; DA SILVA; LOH, 2006).

3.2.1 Sistema Aquoso Bifásico (SAB)

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB ou em inglês *aqueous two-phase system* - ATPS) fazem parte da classe de extração líquido-líquido tendo como característica alta eficiência do processo de transferência de massa já que as duas fases que compõe o SAB são ricas em água. De forma geral os SABs são formados por soluções aquosas entre os seguintes compostos: polímeros, sais inorgânicos, líquidos iônicos e álcoois; os quais, acima da concentração crítica promovem espontaneamente à separação de fases (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2004). A Tabela 4 mostra a classificação geral de SAB e suas características principais.

Apesar dos diversos componentes formadores do SAB, a ideia geral permanece a mesma, ou seja, no final do processo cada fase do sistema deve conter de forma majoritária um dos compostos formadores e que a(s) biomoléculas acompanhem uma dessas fases. Além disso, a partição das biomoléculas ocorre em condições não-desnaturantes, devido à elevada concentração de água em ambas as fases.

As interações químicas específicas envolvidas na formação de fases nos SABs são altamente dependentes do tipo de SAB e os eventos físico-químicos envolvidos na formação e separação do SAB são complexos, porém de modo geral, eles podem ser simplificados com base na entalpia de hidratação e no equilíbrio líquido de entropia. Embora os dois principais compostos do SAB sejam primordialmente hidrófilos, a entalpia de hidratação entre esses compostos difere. Como resultado, dois cenários termodinâmicos são possíveis. Se a quantidade de energia no sistema for alta o suficiente para superar a diferença líquida entre entropia e entalpia de hidratação, os dois compostos químicos principais podem coexistir na sua concentração atual em uma única fase homogênea. Caso contrário, a separação dos dois compostos é energeticamente favorecida, promovendo a formação de duas fases (BENAVIDES *et al.*, 2011).

Tabela 4: Classificação geral dos SAB e suas características principais

Grupo do SAB	Características	Exemplo de Constituintes
Polímero - Polímero	Sistemas baseados em polímeros e eletrólitos ou polímeros e solutos de baixo peso molecular.	PEG – Dextrana
	Recuperação de proteínas, ácidos nucleicos, células e organelas.	PEG – PVA
	Ambiente favorável para proteínas e biomoléculas sensíveis à força iônica.	PEG – Poliacido acrílico
Polímero - Sal	Sistema formado pela adição de sal em soluções certos polímeros.	PEG-Fosfato de Potássio
	Recuperação de proteínas, ácidos nucleicos, nanopartículas e componentes de baixo peso molecular.	PEG-Sulfato de Magnésio
	São sistemas de baixo custo.	
	Altas concentrações de sal promovem elevadas força iônicas.	PEG-Tartarato de Sódio
Álcool - Sal	Sistemas formados por álcoois alifáticos e soluções aquosas com sal.	Álcool - Citrato de Sódio
	Recuperação de componentes de baixo peso molecular.	Álcool - K_2HPO_4
	Possuem baixa viscosidade, baixo custo e alta recuperabilidade do solvente.	
	Muitas proteínas não são compatíveis com a fase rica em álcool.	Álcool - Sais de Potássio
Líquido Iônico (LI)	Composto por líquidos iônicos hidrofílicos e sais cosmotrópicos.	$[C_4min]Br$ - Fosfato de Potássio
	Separam macromolécula sensíveis às forças iônicas.	
	Não são inflamáveis e nem voláteis.	$[C_7mim]Cl$ - Fosfato de Potássio
	Alguns LI são tóxicos.	
Micelar	Sistemas formados por alguns surfactantes em certas condições.	Triton X – Citrato de Sódio
	Separam produtos sensíveis às forças iônicas.	
	Os componentes podem ser recicláveis.	
	Podem prover um ambiente favorável para materiais biológicos.	PEG – Triton X

Fonte: Adaptado de (RITO-PALOMARES, 2017).

Os mecanismos relacionados à separação de duas fases aquosas, bem como o comportamento de divisão de solutos entre essas fases, são dominados pelo equilíbrio termodinâmico do sistema o que difere para cada tipo de SAB baseados na natureza química de seus dois componentes principais. Diante disso antes de qualquer aplicação para extração ou purificação é imprescindível determinar o diagrama de fases do SAB

(Figura 4) visando identificar informações importantes. Ressalta-se que o diagrama de fases é dependente das condições de temperatura, pH e pressão.

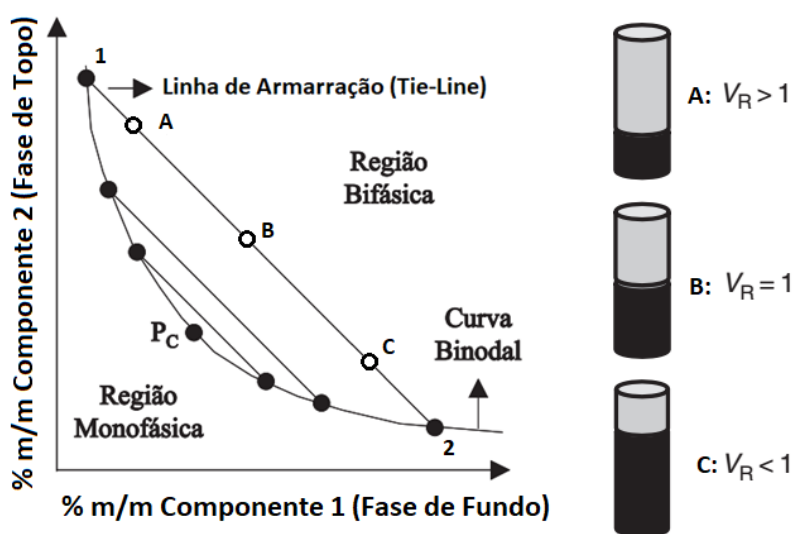


Figura 4: Representação esquemática de diagrama de fases de um SAB. Os pontos A, B e C apresentam distintas relações de volume (V_R), entre as fases de topo e fundo, em uma mesma Tie-Line delimitada pelos pontos 1 e 2. O ponto P_c representa o ponto crítico da solução.

Segundo SILVA (2006), a análise do digrama de fases indica por exemplo, a capacidade dos compostos de formarem um SAB visto que, quanto maior a região bifásica maior é essa capacidade. A curva binodal divide as regiões monofásica e bifásica e nela está presente um ponto conhecido como crítico (P_c) onde ambas as fases possuem a mesma composição. Ademais são apresentadas a linhas de amarração ou Tie-Lines (TL) as quais apresentam a composição de equilíbrio de cada fase de forma constante ao longo da mesma (pontos 1 e 2 da Figura 4), porém com diferentes razões volumétricas ou mássicas como pode ser observado para os pontos A, B e C da Figura 4 pela relação de volume (V_R) conforme Equação 3:

$$V_R = V_T/V_F \quad (3)$$

onde V_T e V_F são os volumes das fases de topo e de fundo respectivamente.

Além disso, o comprimento da tie-line (TLL) é um parâmetro que indica a diferença de composição entre ambas as fases dos compostos de um SAB sendo geralmente utilizado para correlacionar as tendências na partição dos mais variados solutos (BENAVIDES *et al.*, 2011; SILVA; LOH, 2006). O TLL pode ser obtido pela Equação 4:

$$TLL = \sqrt{(C1_T - C1_F)^2 + (C2_T - C2_F)^2} \quad (4)$$

onde $C1_T$ e $C2_T$ (% m/m) são as concentrações dos componentes 1 e 2 respectivamente na fase de topo e $C1_F$ e $C2_F$ (% m/m) são as concentrações dos componentes 1 e 2 respectivamente na fase de fundo. Comumente, no diagrama, o eixo da ordenada é usado para o constituinte predominante na fase de topo, enquanto o eixo das abscissas é usado para o constituinte predominante na fase de fundo. Constata-se ainda que à medida que o valor do TLL aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, elevando, conseqüentemente, a eficiência na extração e/ou partição do soluto de interesse (HESPANHOL *et al.*, 2006). Vale ressaltar que, teoricamente no ponto crítico o TLL é igual a zero.

A partição do soluto no SAB pode ser descrita pelo coeficiente de partição (K_p), o qual relaciona a concentração do soluto de interesse na fase de topo (C_T) com a concentração do mesmo na fase de fundo (C_F) de acordo com a Equação 5 a seguir:

$$K_p = C_T / C_F \quad (5)$$

O coeficiente de partição não é estimado de modo trivial uma vez que os solutos de interesse interagem com os constituintes do sistema bifásico através de interações iônicas e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, podendo ainda interagir consigo mesmos e com qualquer outro aditivo ou contaminante. Assim, a partição dos solutos será seletivamente baseada na conquista do estado energético mais favorável (equilíbrio termodinâmico). De modo geral, as três propriedades físico-químicas mais influentes são o tamanho (peso molecular e diâmetro hidrodinâmico), carga eletroquímica superficial e caráter hidrofóbico (ASENJO; ANDREWS, 2011; RAJA *et al.*, 2012; RITO-PALOMARES, 2017).

3.2.2 Seletividade de Biomoléculas

Uma solução pode ser definida como uma mistura de duas ou mais substâncias que possuem propriedades químicas e físicas uniformes. No mínimo existem dois componentes para cada solução os quais são denominados de solvente e soluto e por uma questão de conveniência, a parte de uma solução em excesso é designada solvente e o componente que está em menor proporção é denominado de soluto. Pode-se ainda dizer que qualquer substância que dissolva outra é um solvente, contudo os solventes variam em seu poder de dissolução e alguns dos fatores que influenciam a solvência são: condições de pressão e temperatura, pureza e associação molecular.

Na literatura, encontra-se diversas maneiras de classificar ou agrupar os solventes. Entretanto, podemos separá-los em dois grandes grupos denominados de solventes convencionais e não-convencionais (WYPYCH, 2014).

Os solventes convencionais são os principais solventes utilizados industrialmente. Dentro dessa classe podemos destacar a água, substâncias inorgânicas como ácidos, bases e sais e as substâncias orgânicas compostos com alto teor de carbono geralmente oriundos do petróleo (SMALLWOOD, 1997).

A utilização dos solventes é de suma importância para os processos de extração e purificação, visto que a dissolução de sólidos, transferência de calor e massa e seletividade são imprescindíveis. Nesse sentido, uma boa definição de qual solvente utilizar é primordial pois implicará na eficiência do processo e, conseqüentemente, na competitividade de mercado. Além disso, ao final dos processos de extração/purificação os solventes devem ser reciclados, reutilizados ou ainda descartados de forma ambientalmente segura. Cada vez mais as agências governamentais têm se preocupado com a poluição ambiental, de forma a adotar regras e regulamentos que afetam o uso de muitos solventes.

Nesse contexto, os solventes não-convencionais visam se adequar aos conceitos vinculados à “*Green Chemistry*”, os quais têm como objetivo o desenvolvimento e uso de produtos químicos e processos visando mitigar ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente. Dentre os solventes não-convencionais pode-se destacar dois grandes grupos: líquidos iônicos (LI) e os solventes eutéticos conhecidos como *Deep Eutectic Solvents* (DES) no inglês (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2017).

Conforme mencionado anteriormente existem diversas combinações possíveis para a formação de SABs. Entretanto, o estudo da biomolécula a qual pretende-se extrair ditará qual deverá ser a melhor combinação de solventes considerando o custo, a toxicidade, as condições de operação (pressão, temperatura e pH), a seletividade e a eficiência de recuperação do soluto e dos solventes envolvidos.

Visando extrair as biomoléculas de vanilina e de ácido ascórbico, encontra-se na literatura diversos solventes. No entanto, muitos solventes orgânicos são inadequados pois, os mesmos podem degradar a capacidade antioxidante dessas substâncias. Assim, apesar do grande número de trabalhos dedicados ao problema da extração de vanilina e ácido ascórbico ou de modo geral substâncias antioxidantes, observa-se algumas desvantagens como: baixa seletividade/eficiência de extração e toxicidade elevada para o uso solventes comuns, como ésteres ou hidrocarbonetos parafínicos e benzeno; alta viscosidade resultando numa transferência de massa lenta e de baixa eficiência inerentes aos DES; alto custo, síntese dispendiosa, informações limitadas sobre toxicidade e baixa biodegradabilidade inerentes aos LI (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2017). Todos esses fatores dificultam a escolha do solvente apropriado. As Tabelas 5 e 6 demonstram alguns dos coeficientes de partição e as eficiências de recuperação relacionadas aos solventes aplicados ao SAB para as biomoléculas antioxidantes de interesse nesse trabalho.

Tabela 5: SAB aplicados a recuperação de Vanilina

SAB	Coeficiente de Partição (K)	Eficiência de Recuperação (R)	Referência
LIs + K ₃ PO ₄	49,59	-	(CLÁUDIO <i>et al.</i> , 2010)
Carboidratos + Acetonitrila	9,67	90%	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2013)
Polióis + Acetonitrila	49,00	90%	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014; CARDOSO <i>et al.</i> , 2014)
Álcoois + Sais	430,00	99,93%	(REIS <i>et al.</i> , 2012)

Os sistemas compostos por solventes orgânicos usando álcoois e sais têm sido usados para separação de biomoléculas, e apresentam como vantagem a baixa viscosidade, alta polaridade, baixa toxicidade ambiental e a fácil recuperação dos álcoois, enquanto que os sais podem ser recuperados através da precipitação, por tudo isto, o custo associado a estes sistemas é reduzido o que é bastante atrativo pois, o valor comercial da vanilina gira em torno de 15 USD/kg o que pode ser facilmente superado pelo custo de um solvente do grupo dos LI (KAYGORODOV *et al.*, 2010; OOI *et al.*, 2009).

Tabela 6: SAB aplicados a recuperação de Ácido ascórbico ou Antioxidantes

SAB	Coeficiente de Partição (K)	Eficiência de Recuperação (R)	Referência
Polímeros + Sais	18	95%	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014)
Polímeros + Sais + LI (adjuvante)	30	97%	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014)
DES + Sais	35	98%	(FARIAS <i>et al.</i> , 2017)
Álcoois + Sais	0,018	95,5%	(REIS <i>et al.</i> , 2012)

Segundo REIS *et al.* (2012), é possível separar simultaneamente ácido ascórbico e vanilina utilizando SABs compostos por álcoois e sais através de resíduos alimentares. Observando que a vanilina se concentra preferencialmente na fase rica em álcool, enquanto que o ácido ascórbico migra para a fase rica em sal o que pode ser explicado pelo caráter hidrofílico de cada biomolécula. Além disso, pode-se obter fatores de recuperação na ordem de 99,93% e 95,5% para a vanilina e o ácido ascórbico, respectivamente, utilizando SAB compostos de 50% de etanol + 15% de K_2HPO_4 + 35% H_2O e 50% de 2-propanol + 15% de K_2HPO_4 + 35% H_2O , respectivamente sendo as porcentagens consideradas em massa. Nesse contexto, a utilização de SABs compostos por álcoois e sais para extração de vanilina e de ácido ascórbico torna-se vantajoso uma vez que, além de interagir satisfatoriamente com as biomoléculas sem comprometê-las, possuem custo acessível e alta recuperabilidade dos solutos e solventes. Além disso, ao comparar com outros processos de extração e os diversos solventes, percebe-se que os solventes convencionais ainda são os mais utilizados na indústria, porém, vale ressaltar que dentro desse grupo existem grandes distinções de seletividade, toxicidade, recuperabilidade além da interação com a biomolécula sem comprometê-la. Nesse cenário, o álcool se destaca.

3.2.3 Sistemas Aquosos Bifásicos em Operação Contínua

Os SABs são uma alternativa limpa e com vasto histórico de utilização no particionamento de uma grande variedade de biomoléculas de interesse de seus contaminantes, explorando as diferenças de peso molecular, hidrofobicidade, ponto isoelétrico entre outras características. Embora os SABs sejam conhecidos por serem sistemas biocompatíveis e de fácil manipulação da escala de operação, algumas das desvantagens desta tecnologia estão relacionadas às limitações de separação de fases de sistemas altamente viscosos, alto custo de alguns solventes e falta de *know-how* em

termos de operação, instalações e equipamentos. Além disso, a maioria de suas aplicações foram desenvolvidas em escala de bancada visando operar em sistema de batelada (RITO-PALOMARES, 2017; SOARES *et al.*, 2015).

Contudo, o sucesso obtido em estudos realizados em pequenas escalas e em batelada, possibilitam que os mesmos sejam ampliados e utilizados em sistemas contínuos. Isso envolve esforços na integração do processo, a fim de reduzir o consumo de matéria-prima, diminuir o tempo e os custos do processo e aumentar o rendimento tornando o procedimento industrialmente competitivo (CROUGHAN *et al.*, 2015; JUNGBAUER, 2013; ZYDNEY, 2016). Entretanto até o momento, as delimitações das características de operação, validação dos desenhos de reatores e análise econômica de sua aplicação foram poucos explorados para o processo em estado contínuo. No entanto, estudos comprovam a grande oportunidade de extrair biomoléculas através de SABs em operação contínua (CAVALCANTI *et al.*, 2008; ESPITIA-SALOMA *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2012; VÁZQUEZ-VILLEGAS *et al.*, 2015).

Em geral, as operações ou etapas utilizadas em processos operando em batelada devem ser realizadas para os processos em operação contínua. Contudo as etapas de alimentação, bombeamento, mistura, purificação/recuperação das biomoléculas e tratamentos das fases para reutilização ou descarte devem possuir sistemas para que operem continuamente, conforme Figura 5.

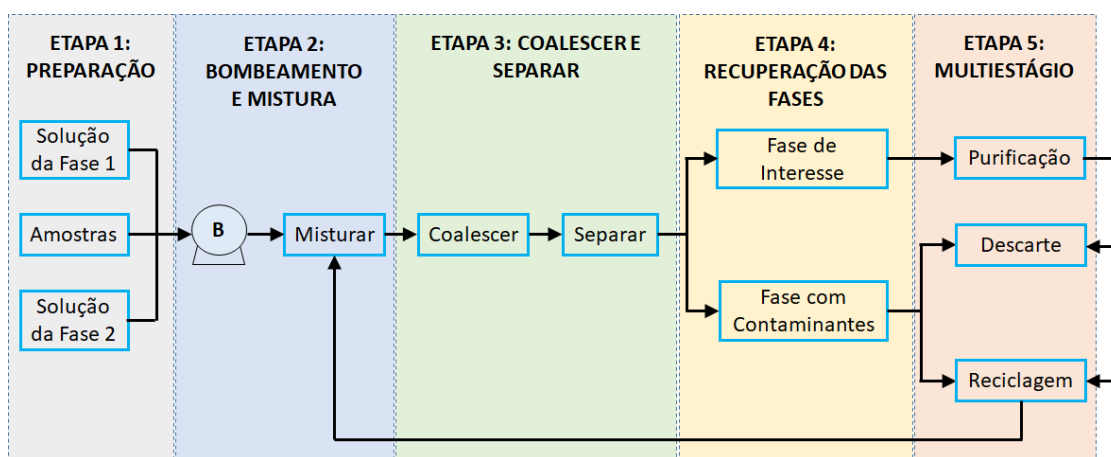


Figura 5: Etapas para execução do SAB contínuo.
Fonte: Adaptado de (RITO-PALOMARES, 2017).

A primeira etapa consiste em preparar os estoques das soluções de cada fase e da amostra, reservando-os em recipientes distintos para posterior bombeio ao reator. A amostra pode ser bombeada individualmente ou diluída em uma das correntes dos

componentes. Observa-se que esta etapa pode fazer parte do ciclo contínuo. A segunda etapa contempla a mistura adequada das fases de modo a permitir que a molécula de interesse entre em contato com a sua fase preferencial. Em sistemas de batelada, este estágio é realizado manualmente usando agitadores mecânicos. Já em sistemas contínuos, o encontro entre os fluxos bombeados pode ser usado para executar esta operação ou ainda ser executado por misturadores estáticos ou agitadores mecânicos.

A terceira etapa foca na coalescência seguida da separação das fases o qual resultará na formação da fase de topo e da fase de fundo, característicos dos SABs. A etapa seguinte consiste em recuperar a fase a qual o produto de interesse esteja contido, podendo ser direcionada para etapas posteriores de purificação. Já a fase contendo os contaminantes pode ser descartada ou enviada para um processo de reciclagem de modo a retornar ao ciclo contínuo. Vale salientar que em processos contínuos, as fases topo e de fundo são formadas continuamente diferentemente dos processos em bateladas as quais teremos apenas uma recuperação e/ou descarte final. Além disso, a condução direta da fase contaminada para reinjeção no reator deve ser evitada, uma vez que a quantidade e a característica dos contaminantes podem ser diferentes da amostra original, o que pode implicar em alterações no comportamento da partição do produto de interesse.

O tópico a seguir descreverá os principais tipos de reatores que podem ser utilizados nas operações contínuas de SABs identificando as principais características e problemas operacionais de cada um.

- Reatores

Conforme mencionado anteriormente, não há equipamentos especializados para executar processos contínuos envolvendo SAB. Dessa forma, os equipamentos utilizados até hoje para esse propósito são os mesmos empregados em extrações líquido-líquido tradicionais. Entretanto, para cada SAB a geometria, a cinética e a dinâmica dentro desses protótipos podem variar, mas em suma, o equipamento adequado para executar todas essas tarefas seria um sistema fechado com a capacidade de variar todas as suas vazões de entrada, ter no mínimo três alimentações e conter tomadas de amostragem em diferentes estágios do procedimento de extração e recuperação de fases. Nesse sentido, os dispositivos mais comuns empregados para processos SAB contínuos são colunas, as quais podem ser divididas em dois grupos o das colunas estáticas e o das colunas agitadas (ESPITIA-SALOMA *et al.*, 2014).

O primeiro grupo (Figura 6) contempla as colunas *spray*, colunas de enchimento (*packed*) e colunas de pratos (*sieve plate*). Já ao segundo grupo (Figura 7), pertencem as colunas com discos rotativos (*RDC*), colunas pulsadas e colunas agitadas com impelidores (*vane-agitated*). A principal variável entre os modelos citados anteriormente é o mecanismo de transferência de massa (ESPITIA-SALOMA *et al.*, 2014).

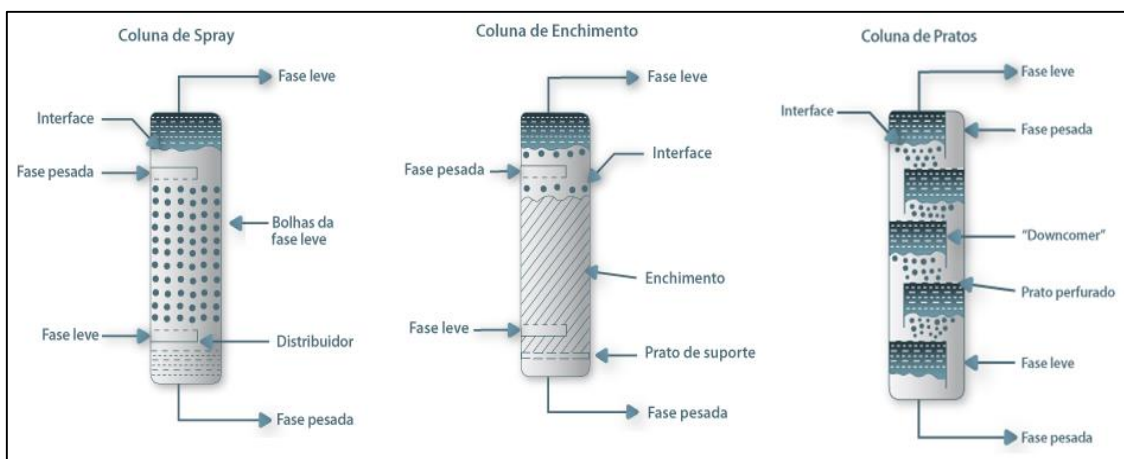


Figura 6: Colunas Estáticas.
Fonte: Adaptado de (BERNARDO; GRANJO, 2017).

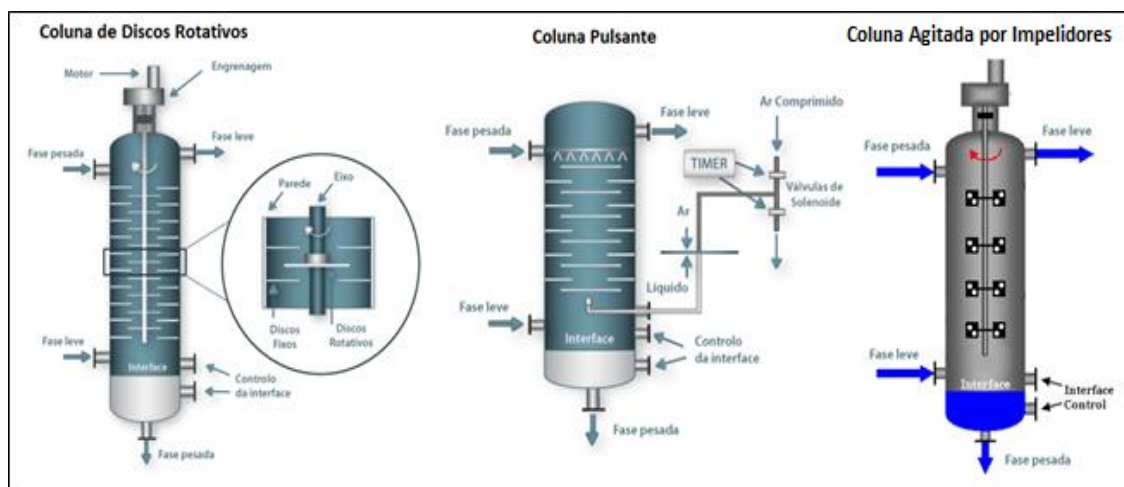


Figura 7: Colunas Agitadas.
Fonte: Adaptado de (ABEL FERREIRA *et al.*, 2007; KMPS, 2018).

A maioria dos reatores possui algum dispositivo de agitação, a presença física destes dispositivos diminui o contato das fases coalescidas com a alimentação iniciais (não reagida) e acelera a interação das fases aumentando a transferência de massa entre elas (ROSA *et al.*, 2012). Porém, é importante notar que a agitação pode ser uma vantagem no início do processo de extração SAB, contudo ao final do processo as fases devem estar imunes a agitação para que não ocorra o retorno da mistura. Além disso, à

agitação elevada pode resultar na emulsificação das fases em sistemas que apresentam baixa tensão interfacial (RITO-PALOMARES, 2017). A Tabela 7 apresenta as principais características de cada um dos reatores descritos anteriormente.

Tabela 7: Características principais dos reatores utilizados em SAB contínuos.

Colunas	Parâmetros Operacionais	Vantagens	Desvantagens
Spray	- Vazão. - Nº de furos do distribuidor.	- Fácil construção. - Fácil limpeza. - Baixo custo de manutenção e operação.	- Alto retorno da mistura. - Obtenção lenta das condições estacionárias. - Usado somente em sistemas com baixa tensão interfacial.
Discos Rotativos	- Vazão. - Nº de discos. - Rotação dos discos.	- Baixo retorno da mistura. - Alta transferência de massa.	- Inundação. - Baixa eficiência de separação em altas vazões.
Pulsante	- Vazão. - Frequência de pulsação.	- Boa eficiência de mistura. - Baixo nível de turbulência. - Alta transferência de massa.	- Emulsificação. - Baixas vazões como condição para um bom desempenho limitam a taxa de transferência de massa.
Enchimento	- Vazão. - Tipo de enchimento.	- Elevado tempo de contato. - Baixo retorno da mistura. - Fácil controle. - Obtenção rápida das condições estacionárias.	Capacidade de processamento reduzida.
Pratos	- Vazão. - Nº de pratos. - Nº de furos nos pratos.	- Baixo retorno da mistura. - Múltiplos estágios de coalescência. - Obtenção rápida das condições estacionárias.	Capacidade de processamento reduzida.
Impelidores	- Vazão. - Rotação dos impelidores. - Área livre entre impelidores e reator.	- Rápido mecanismo de coalescência. - Obtenção rápida das condições estacionárias.	Capacidade de processamento reduzida.

Fonte: Adaptado de (ESPITIA-SALOMA *et al.*, 2014).

Os modelos apresentados anteriormente quando aplicados a SAB contínuos podem apresentar alguns problemas operacionais (Figura 8) os quais limitam a seleção dos seus parâmetros ótimos, entre esses problemas podemos citar:

- **Inundação:** se as vazões forem maior do que necessário, não ocorrerá a coalescência entre as fases e alguma das fases pode prevalecer fazendo com a interface fique acima do limite.
- **Retorno da Mistura:** as fases coalescidas estão em contato com alimentações iniciais fazendo com as mesmas sejam arrastadas para a saída.
- **Emulsificação:** são formadas minúsculas gotículas, elevando o tempo de coalescência além do necessário fazendo com que a fase do contaminante invada as saídas da fase de interesse.
- **Baixa eficiência de separação das fases:** se o dispositivo de separação tiver um comprimento pequeno, impedirá a coalescência das fases, fazendo com que ambas as fases sejam obtidas na mesma saída.

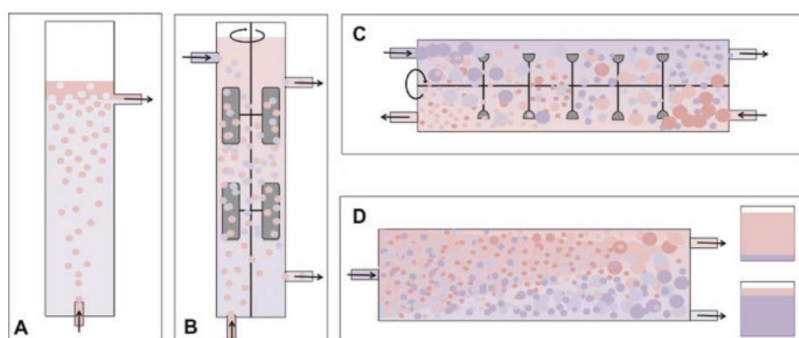


Figura 8: Problemas em SAB contínuo: A) Inundação B) Retorno da Mistura C) Emulsificação D) Baixa eficiência de separação das fases.

Fonte: (RITO-PALOMARES, 2017).

A escolha e modelagem do desenho do reator que se adeque à operação contínua, evitando os problemas anteriormente relatados deve promover com eficiência a partição de biomoléculas em SAB, geralmente tentando replicar as taxas de recuperação obtidas em experimentos operados em batelada. Nesse sentido, é recomendado que inicialmente o processo seja explorado em sistemas de pequena escala (bancada) em batelada visando obter a melhor composição para o máximo fator de recuperação. De acordo com RITO-PALOMARES (2017), após os testes em batelada sugere-se que os sistemas sejam testados em operação contínua para enfim utilizar os sistemas denominados de plantas piloto onde as variáveis operacionais do sistema podem ser estudadas a nível industrial.

4. PROJETO DO REATOR E DO SISTEMA DE AGITAÇÃO

Considerando os modelos de reatores, disponíveis na literatura que podem ser aplicados a SAB contínuos desenvolveu-se um reator com o objetivo de realizar testes operacionais para o particionamento de vanilina e de ácido ascórbico de forma individual e simultânea. Para tal, os requisitos execução dos experimentos incluem: controle de vazão de uma ou duas fases simultaneamente, controle de agitação e controle de temperatura. Nesse contexto é proposto o seguinte protótipo reator:

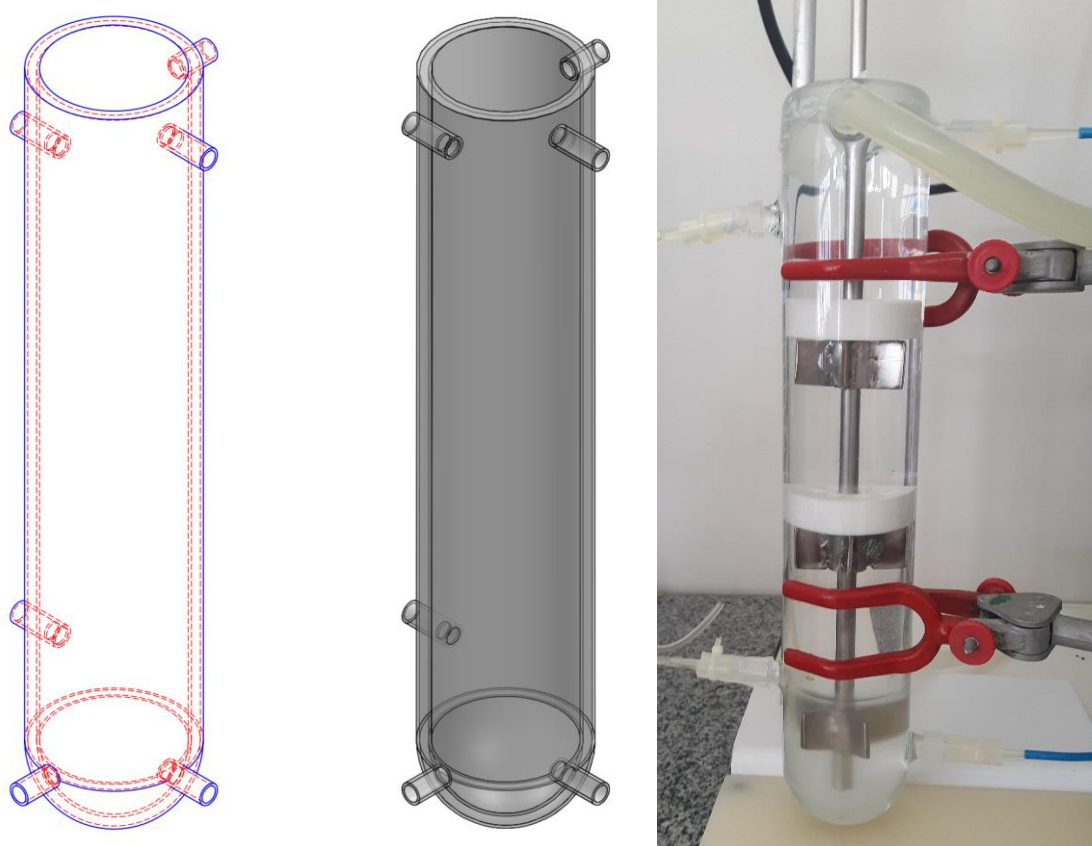


Figura 9: Modelo do protótipo de reator e reator construído.

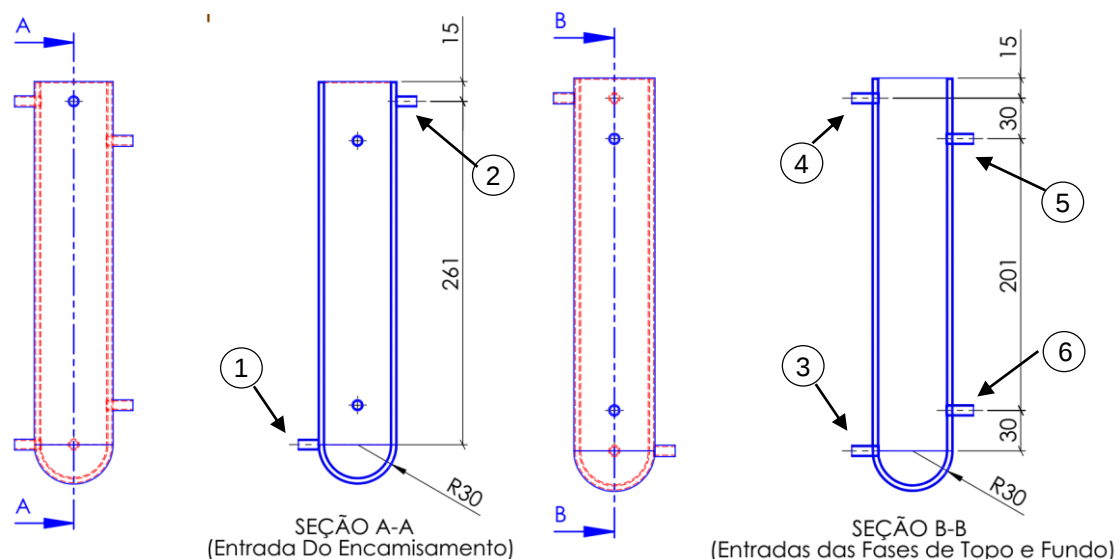


Figura 10: Dimensões do reator (milímetros). Pontos 1 e 2 entrada e saída do encamisamento. Pontos 3 e 4 coletas das fases coalescidas e separadas. Pontos 5 e 6 alimentações das fases.

De acordo com o projeto do reator (Figura 10) o mesmo possui dois pontos de coleta (pontos 3 e 4) e duas alimentações (pontos 5 e 6) possibilitando o bombeamento da fase de topo e de fundo individualmente ou simultaneamente. Além disso, visando controlar a temperatura de operação do sistema o reator é encamisado (pontos 1 e 2). Todo o reator foi construído em vidro possibilitando fácil higienização, atuação inerte e boa visualização da operação. O volume útil do reator após construção é de aproximadamente 440 mL.

O sistema de agitação projetado consiste em um eixo com impelidores de pás retas ou também como são conhecidas, palhetas, construído em aço inox 304 e contam com um sistema de ajuste de posicionamento e fixação ao eixo conforme ponto 1 da Figura 11. Para o sistema de agitação foram fabricados e distribuídos uniformemente ao longo do eixo, três impelidores visando obter zonas de coalescência uniformes ao longo de todo reator. No entanto, os impelidores são posicionados distante o bastante das alimentações evitando o efeito de retorno da mistura.

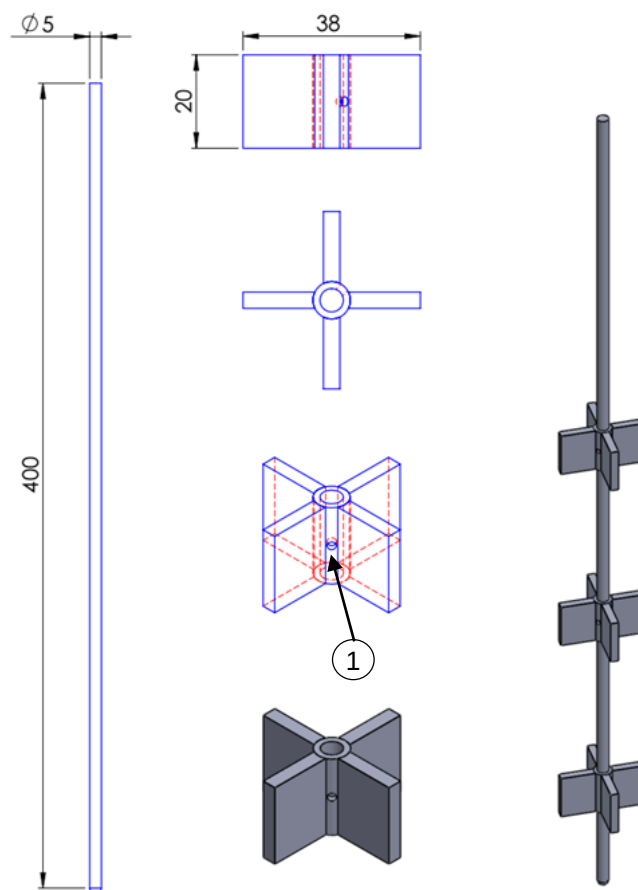


Figura 11: Dimensões do eixo (milímetros) com impelidores retos pertencente ao sistema de agitação.

A Figura 12 mostra esquematicamente como o reator deve ser montado e operado com o sistema de agitação.

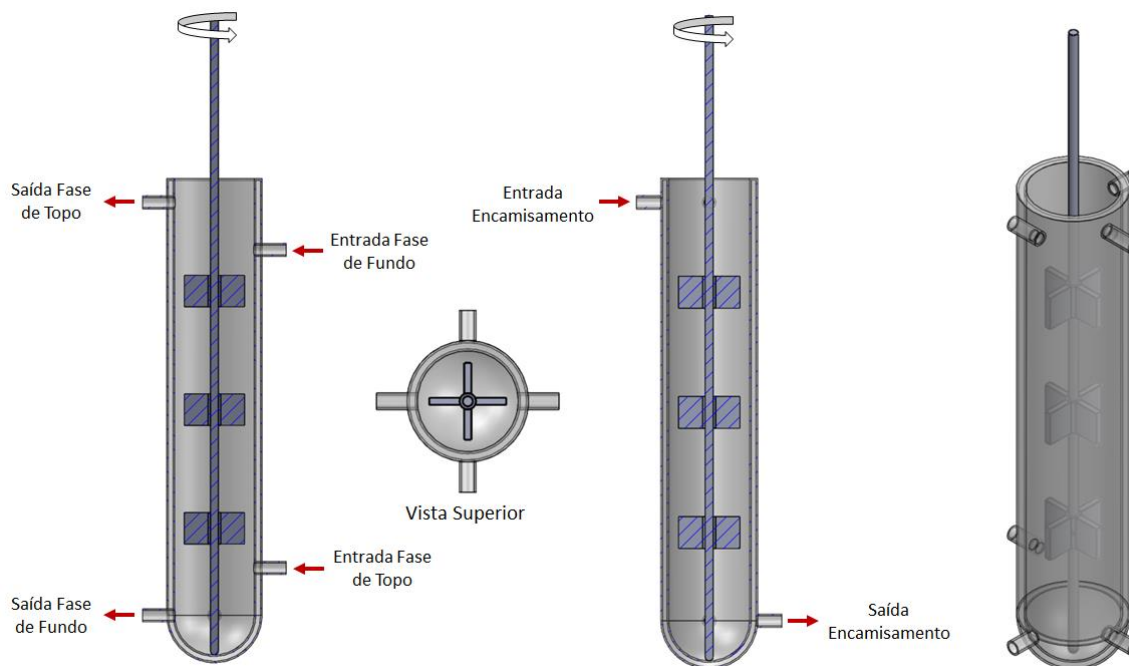


Figura 12: Montagem do reator e esquemático de operação contínua.

Nos primeiros testes após a montagem do reator observou-se que o sistema de agitação se encontrava desbalanceado em função do seu comprimento e posicionamento dos impelidores. Esse desbalanceamento gerou a colisão dos impelidores com as paredes do reator e grande turbulência ocasionando o desequilíbrio do SAB e dificuldades para o controle da velocidade de agitação. Nesse sentido foi projetado um sistema de centralizadores, usinados em teflon, material leve e inerte quimicamente, conforme Figura 13. Além disso, os centralizadores auxiliam os efeitos da interação entre as fases.

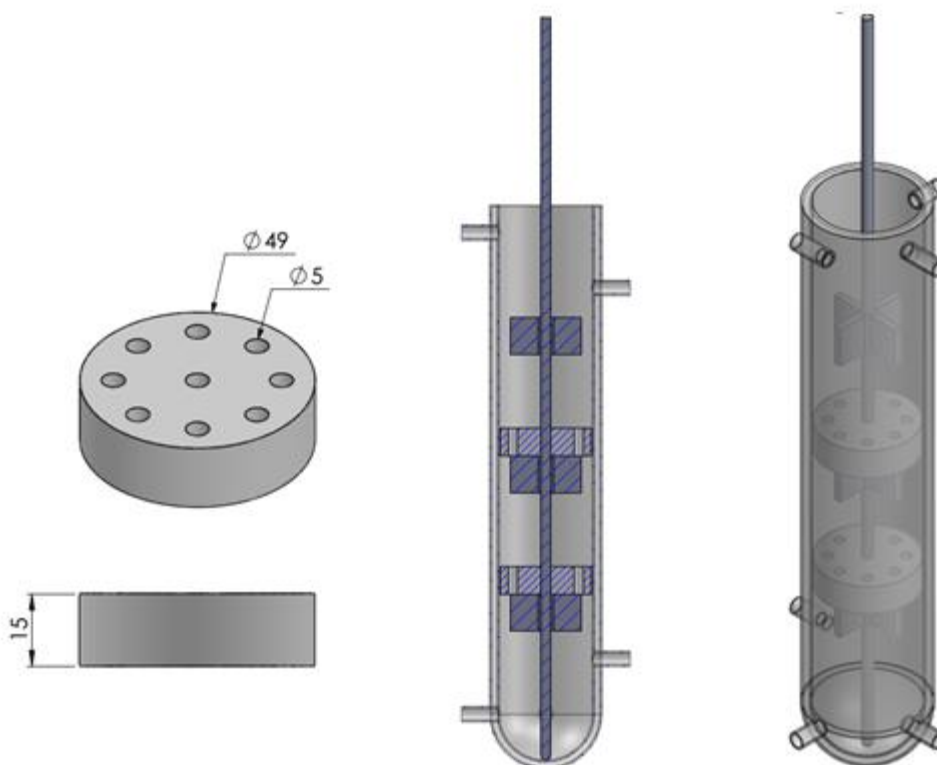


Figura 13: Dimensões do centralizador (milímetros) do sistema de agitação.

Observou-se também que a interface entre as fases de topo e de fundo do SAB selecionado é muito próxima da alimentação da fase de topo. Dessa forma o dimensionamento do reator deve levar em consideração a composição do SAB e as suas possíveis proporções em uma mesma Tie-line. No entanto, para este trabalho foi mantido a composição ótima obtida por Reis et al. (2012) com o intuito de manter os critérios de comparação.

Capítulo 5

5. ARTIGO

Neste capítulo é apresentado em forma de artigo científico, organizado conforme as normas propostas pelo periódico de publicação. Este capítulo traz uma pequena introdução, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do artigo, os resultados obtidos e sua discussão, além das conclusões.

No artigo intitulado de “Selective and continuous recovery of added-value compounds from food waste using aqueous two-phase system” foi projetado e construído um reator dotado de um sistema de agitação por impelidores para o estudo da recuperação seletiva e contínua de ácido ascórbico e de vanilina a partir de resíduos de alimentos e outras fontes utilizando um sistema aquoso bifásico formado por álcool e sal.

Este artigo será submetido em um periódico com classificação Qualis CAPES.

**Selective and continuous recovery of added-value compounds from food waste
using aqueous two-phase system**

Alex Viana Veloso¹, Brenda Caroline Silva¹, Sthefany Araújo Bomfim¹, Ranyere
Lucena de Souza, Cleide Mara Faria Soares^{1,2}, Álvaro Silva Lima^{1,2,*}

¹ Universidade Tiradentes. Av. Murilo Dantas, 300. Farolândia. 49032-490. Aracaju-Sergipe, Brasil.

² Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. Prédio do ITP. Farolândia. 49032-490. Aracaju-Sergipe, Brasil.

*Corresponding author: E-mail: aslima2001@yahoo.com.br

Abstract

In this study, ascorbic acid and vanillin were recovered using semi-continuous and continuous aqueous two-phase system (ATPS) formed by ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) and dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4). For operation, a column reactor was designed allowing the temperature control by a coating system and the circulation of up to two phases simultaneously. The reactor was equipped with a stirring system composed of shaft and impellers known as vanes. In the experiments the influence of the volumetric flow rate and the agitation speed were analyzed to optimize the recovery of the biomolecules of interest. The best recovery values were obtained in semi-continuous operation at low rotations (60 rpm) and high volumetric flow rate ($6.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). These parameters were used to verify the partitioning using a real food matrix (Diet Pudding Dr. Oetker) which obtained recovery rates of up to 75% for ascorbic acid in bottom phase and 62% for vanillin in top phases.

Keywords: Continues column reactor; partitioning; biocompounds; aqueous two-phase system.

1. Introduction

Aqueous two-phase system (ATPS) is a strategy of liquid-liquid extraction (LLE), which is constituted by two immiscible aqueous phases with different physical and chemical properties (Garza-Madrid et al., 2010). ATPSs are based on polymers (dextran, polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, among others), salts (phosphate, citrate, sulfate, among others), ionic liquids, carbohydrates and organic solvents (alcohols, organic acids, acetonitrile, tetrahydrofuran, etc.) combined over a critical concentration (Grilo et al., 2014; Souza et al., 2015a; Cardoso et al., 2014).

This strategy is widely used for recovery, partition, concentration and purification of several target biocompounds such as antibody (Campos-Pinto et al., 2017; Rosa et al., 2012), proteins and enzymes (Song et al., 2018a, Souza et al., 2015b), toxins (Gomez et al., 2016; Cavalcanti et al., 2008), antibiotics (Rabieenezhad and Roosta, 2018; Marques et al., 2013), antioxidants (Lima et al., 2017; Almeida et al., 2014) and alkaloids (Plácido et al., 2018; Flieger et al., 2015). The use of ATPS in these applications present many advantages such as low interfacial tension, biocompatibility, process integration, high selectivity, easy implementation and scalability (Raghavarao et al., 2003).

However, the industrial implementation is still limited due to the difficulty of separating phases when using viscous compounds (polymers, ionic liquid and some carbohydrates), low recyclability and high cost of the constituents (Soares et al., 2015). In order to overcome these disadvantages, some authors proposed the phase recyclability (Song et al., 2018b; Sankaran et al., 2018), the use of organic solvents (Santos et al., 2016; Li et al., 2017) and the performance of the protocol in continuous mode because allows robust purification of labile biocompounds (Vázquez-Villegas et al., 2015; Espitia-Saloma et al., 2014; Jungbauer, 2013).

Since now, studies focused on operational characteristics, validation of reactor designs and economic analysis for continuous process in ATPS have been few explored. According to Rito-Palomares and Benavides (2017), there is not still available specialized equipments, therefore the design reactor is those used in traditional LLE, highlighting spray column (Srinivas et al., 2002), packed column (Igarashi et al., 2004), conventional or perforated rotating disc contactor (Kalaovani and Regupathi, 2016; Porto et al., 2004), pulsed-cap micro column (Rabelo and Tambourgi, 2003) and column with impellers (Biazus et al., 2007).

In this context, the present work was addressed to propose a design for a jacketed column reactor with two feeds and two outputs operating in continuous or semi-

continuous mode. Moreover, the system was agitated by impellers (vertical 4 blades) adequately distributed in the reactor. It was studied the effect of volumetric flow rate and the agitation speed in the selective partition of ascorbic acid and vanillin, compounds present in several food waste. The results were compared with previous work by Lima and co-authors (Reis et al., 2012), who carried out the same system in batch operation.

It should be noted that according to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) approximately one third of global food production is lost or wasted, which represents about 1.3 billion tonnes per year (Gustavsson et al., 2011). These food wastes are originated from agricultural activity such as fruits, grains, vegetables production, or industrial activity as foods with expired validity. In addition, these residues contain compounds of high-added value, which can be extracted and purified. A good example is ascorbic acid (antioxidant) and vanillin (flavor), which were used as target biomolecules in this work.

Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$) or vitamin C is a crystalline white solid, odorless, water soluble and poorly soluble in organic solvents. This biocompound is present in several vegetables, mainly in citric fruits, and it is used as supplement to reinforce dietary (Uddin et al., 2001). Moreover, it is well known as an antioxidant used in preservation of industrial food. On the other hand, vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) is also a crystalline white solid, soluble in organic solvent (alcohols and chloroform), and presents as the most widely used flavor in food industry (Jadhav et al., 2009). Besides that, this biomolecule has antioxidant and antimicrobial, anticlastogenic, antimutagenic and antitumor properties (Mourtzinis et al., 2009).

2. Material and Methods

2.1. Material

The ATPS was prepared using ethanol – CAS n° 64-17-5 (> 99 wt%) supplied by Neon (São Paulo, Brazil) and dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) – CAS n° 7758-11-4 (> 98 wt%) acquired from Dinâmica Química (São Paulo, Brazil). The target biomolecules used in the partitioning were ascorbic acid (> 98 wt%) - CAS n° 50-81-7 purchased from Labsynth (São Paulo, Brazil) and vanillin (> 99 wt%) CAS n° 121-33-5 acquired from Dinâmica Química (São Paulo, Brazil). For a real application, diet pudding Dr. Oetker was used. Ultrapure water that was double-distilled, passed by a reverse

osmosis system and further treated with a Mill-Q plus 185 water purification apparatus was used in all experiments

2.2. Reactor Design

The Figure 1 depicts the design of column reactor used in the partition of biomolecules. The reactor was built in glass, having 550 mL of nominal capacity and a useful volume of 440 mL. The temperature was controlled by a jacketed system (points 1 and 2), and the samples were collected by points 3 and/or 4, and feeds were performed at points 5 and/or 6. The experiments were conducted with mixing system, which is formed by an axis with 3 impellers (vertical 4 blades) made in stainless steel 304, positioned equidistant (in this study) or can be adjusted along the axis by means of fixing screws (point 7). In order to avoid the imbalance of the shaft and consequently the collision of the impellers with the walls of the column, centralizers machined in Teflon.

2.3. Selective Partitioning of Biomolecules

ATPS composition was based on batch experiments performed in our previous studies (Reis et al, 2012), which identify the best condition to recovery separately vanillin and ascorbic acid (50 wt% C_2H_5OH + 15 wt% K_2HPO_4 + 35 wt% H_2O). The ATPS was prepared mixing and homogenizing the system constituents, and then the column reactor was full filled with the ATPS, left in rest for 8 h at least to reach the thermodynamic equilibrium, and make clear the interface. The operation was carried out in a semi-continuous and continuous mode, and regardless of the operation condition the volume of the reactor remained constant (inlet volumetric flow = outlet volumetric flow). It is noteworthy that in all experiments the disperse phases pumped to the column reactor had volumes similar to the phases contained in the reactor.

Initially, it was studied the partition of biomolecules pure in the semi-continuous mode, i.e., a disperse phase with same composition of top or bottom phase contend the biomolecule and a stationary phase (inside of reactor). **Protocol 1** - vanillin was dissolved in a bottom phase and pumped into the reactor through point 5 (Figure 1a), and harvested in the same ratio at point 3. **Protocol 2** - ascorbic acid was dissolved in the top phase and pumped into the reactor through point 6, and the collected occurred in the point 4. In sequence, it was studied the continuous mode, i.e., two disperse phase with same composition of phase, one of then contend ascorbic acid was dissolved in the top phase and pumped in the point 6 and is removal by point 4, and simultaneously the vanillin

dissolved in the bottom phase was pumped into countercurrent by point 5 and harvested in the point 3 (**Protocol 3**). Finally, the experiment was carried out using a real sample (diet pudding Dr. Oetker), which was dissolved in the bottom phase, pumped in the point 5 and collected by point 3 (**Protocol 4**), also operating in semi-continuous mode. For all cases, the target biomolecules were dissolved in the phase of lower affinity, and pumped in countercurrent with the phase of greater affinity, aiming to promote the retention of the biomolecule in this phase. All Protocols are demonstrated in Figures S1, S2, S3 and S4 of Supporting Information.

It was evaluated the effect of agitation speed (60, 150, 275 and 360 rpm) at 3 mL.min⁻¹ and the effect of volumetric flux (1.5; 3.0; 4.5 and 6.0 mL.min⁻¹) at 60 rpm. All experiments are carried out at 298.15 K and 0.1 MPa.

During the operation, samples of the bottom phase were harvested (pre-set time) to measure the concentration of biomolecules, and the concentration of biomolecule in top phase was determined through mass balance. For semi-continuous mode (Protocols 1, 2 and 4), the samples after measurement was returned to the reactor, aiming to keep the volume of ATPS. The partition coefficient (K) was determined by the ratio between the concentration of biomolecules (C) in top (T) and bottom phase (B), as described in equation (01).

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (01)$$

In order to analyze the recovery of biomolecules, it was defined the index of recovery (IR) as shown in equation (02). The IR consists of the ratio between the concentration (C) of the target biomolecule and the maximum concentration (C_{Max}) of the biomolecule in the analyzed phase. The selectivity (S) of the systems was determined by the ratio between the partition coefficients of vanillin (K_{VAN}) and ascorbic acid (K_{AA}) as show the equation (03).

$$IR = \frac{C}{C_{Max}} \quad (02)$$

$$S = \frac{K_{VAN}}{K_{AA}} \quad (03)$$

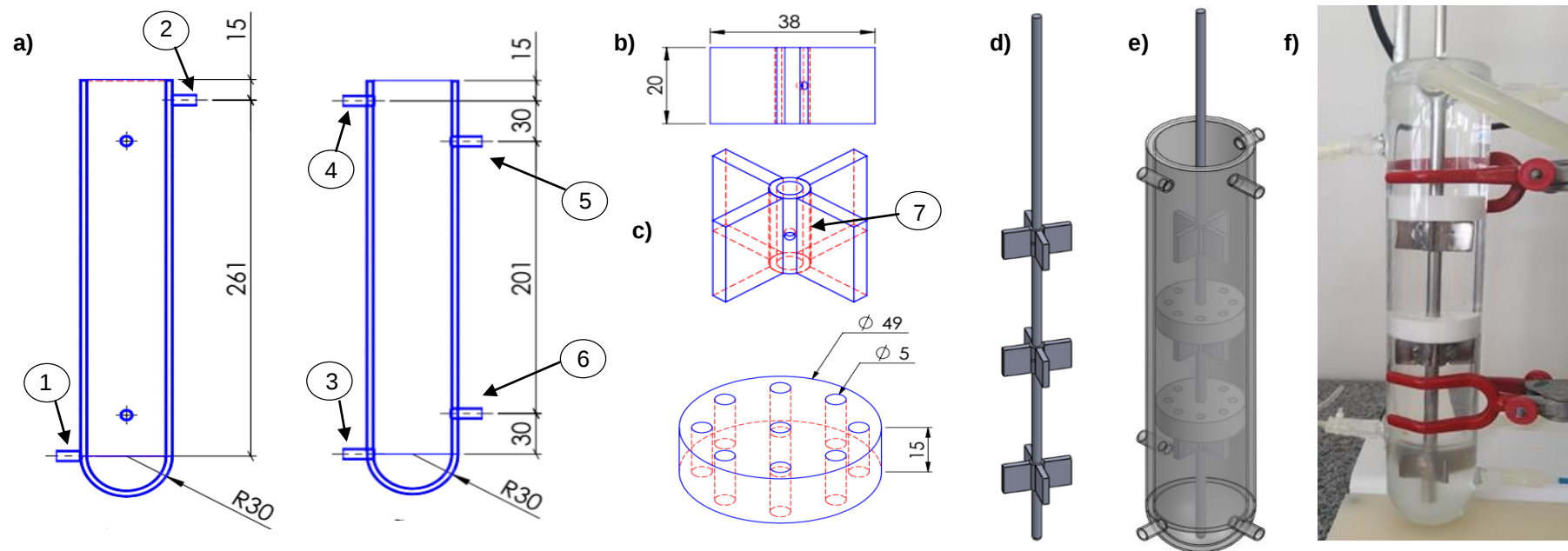


Figure 1: Design of column reactor and its constituents. a) dimensions of the reactor; b) dimensions of impellers; c) dimensions of the centralizer; d) axis and equidistant impellers; e) assembly of the reactor and f) real reactor. All dimensions are in millimeters. Points 1 and 2 are part of the temperature control system through the reactor jacketed. The samples were collected by points 3 and/or 4, and feeds were performed at points 5 and/or 6. The position of the impellers on the axis can be adjusted by the screw positioned in point 7.

The mass transfer coefficient (K_{Da}) (min^{-1}) was evaluated according to material balance proposed by Pawas et al (1997) and shown briefly through the equation (04).

$$K_{Da} = \frac{F_D}{V} \times \ln \left(\frac{C_{Di} - KC_S}{C_{Df} - KC_S} \right) \quad (04)$$

where F_D is volumetric flow rate ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), V is the volume of ATPS (mL), C_{Di} and C_{Df} are the initial and final biomolecule concentrations in the dispersed phase ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), K is the partition coefficient of biomolecule (dimensionless), C_S is the concentration of biomolecule in the stationary phase in steady-steady ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

In order to understand the effect of dispersed phase flow rate in the kind of flow regime, Reynolds number (R_e) was calculated. R_e is a ratio between the inertial forces and viscous force, as described in the equation (05).

$$R_e = \frac{\rho \times v \times d}{\mu} \quad (05)$$

where ρ and μ are each phase density ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) and viscosity ($\text{Pa} \cdot \text{s}$), respectively; v is the dispersed phase velocity ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) and d is the diameter of reactor (m).

Density and dynamic viscosity for each phase were determined at different temperatures ($293.15 - 323.15 \text{ K}$), with an uncertainty of $\pm 0.02 \text{ K}$, using an automated SVM 3000 Anton Paar rotational Stabinger viscosimeter-densimeter. The density assays have an absolute uncertainty of $0.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, and the relative uncertainty of the dynamic viscosity measurements is 0.35%. The equipment was calibrated using a standard solution.

2.4. Determination of Biomolecules Concentration

The concentrations of vanillin and ascorbic acid in the bottom phase were quantified through UV-spectroscopy (UV-Vis Hack DR 5000 spectrophotometer) at a wavelength of 280 and 265 nm, respectively, as described by Aydogys et al (2002), Hussein (2013) and Cardoso et al. (2015). The standard curves were previously established using each biomolecule at different concentrations, applying as a blank solution either water (calibration curve) or the corresponding phase being analyzed (partitioning process).

3. Results and Discussion

In 2012, our research group reported a selective partition of ascorbic acid and vanillin using a batch aqueous two-phase system based on different alcohols and inorganic salts. The optimized operational condition was 50 wt% C₂H₅OH + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% H₂O, at 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa. The results have shown that a recover of vanillin in top phase – $R_{(van)T} = 99.93 \pm 0.01$ % and recovery of ascorbic acid in bottom phase $R_{(AA)B} = 90 \pm 1$ %. Moreover, these conditions were applied in real sample (diet pudding) and the results were $R_{(van)T} = 99.62 \pm 0.05$ % and $R_{(AA)B} = 38 \pm 3$ % (Reis et al., 2012). This study used the same conditions to selectively recovery ascorbic acid and vanillin to evaluate the column reactor design operating in semi-continuous and continuous mode.

3.1. Partition of Standard Biomolecule

In this work, we used standards of vanillin (protocol 1) and acid ascorbic (protocol 2) separately in a column reactor with 3 impellers (vertical 4 blades). Initially, it was studied the effect of agitation speed (60, 150, 275 e 360 rpm) with a volumetric flow rate of 3 mL.min⁻¹ of vanillin 0.05 mg.mL⁻¹ (dissolved in bottom phase) or 0.02 mg.mL⁻¹ ascorbic acid (dissolved in top phase) at 298 ± 0.1 K and 0.1 MPa in the recovery index (Figure 2 and Tables S1-S2 of Supporting Information). It should be noted that the initial concentrations were determined by the solubility coefficient of the biomolecules in the respective phases.

Vanillin moved from bottom phase or salt-rich phase (feed) to top phase or ethanol-rich phase because present a hydrophobic character (logarithm of octanol water coefficient: log K_{ow} = 1.19 - Noubigh et al., 2010). However, the agitation speed has a soft effect in recovery index of vanillin in top phase ($IR_{(van)T}$), ranging between 95 to 99 %. In this case, the volume of phase to be crossed (330 mL) is large and the agitation speed has little influence in the mass transfer (K_{Da} ranged from 7,4 x 10⁻³ h⁻¹ to 1.6 x 10⁻² h⁻¹), as show the Table 1. On the other hand, the ascorbic acid is hydrophilic (log K_{ow} = -1.85 - Takács-Novak and Avdeef, 1996) and migrated from top (feed) to bottom phase, ranging to 26 to 36 %. In this case, increasing the agitation speed the recovery index of ascorbic acid in bottom phase $IR_{(AA)B}$ decreased. The ascorbic acid feed crossed through only 110 mL (volume of bottom phase), consequently, a higher agitation speed probably disperses the sample, reaching quickly the top phase and decreasing the contact between the phases. Biazus et al (2007) reported that agitation speed increases the mass transfer.

However, in high agitation the surface area of droplets is increased and promote a body-rigid behavior and reduces the mass transfer rate, whose K_{Da} ranged from $6.7 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ to $4.2 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Table 1).

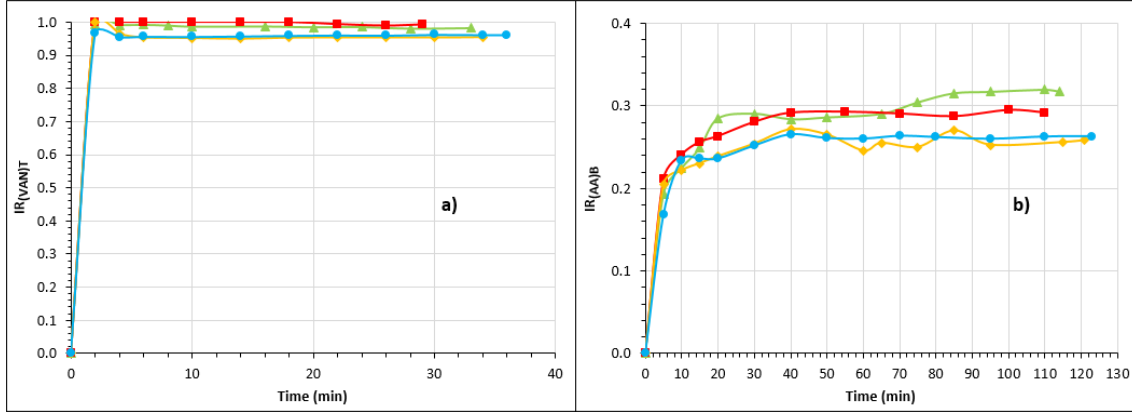


Figure 2: Effect of agitation speed ($\blacktriangle$ - 60 rpm; $\blacksquare$ - 150 rpm; $\blacklozenge$ - 275 rpm and $\bullet$ - 360 rpm) in recovery index of vanillin - top phase (a) and ascorbic acid - bottom phase (b) using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K_2HPO_4 + 35 wt% water at $298.15 \pm 1 \text{ K}$ and 0.1 M. Dispersed phase flow rate of $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ of vanillin $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (dissolved in bottom phase) or $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ascorbic acid (dissolved in top phase).

Table 1: Effect of agitation speed in the parameters for mass transfer of biomolecules in ATPS after the steady state.

Partition of Vanillin (Protocol 1)		
Agitation speed (rpm)	K	$K_{Da} (\text{h}^{-1})$
60	54.86	7.42×10^{-3}
150	130.58	3.10×10^{-3}
275	21.03	4.13×10^{-3}
360	25.38	1.56×10^{-2}
Partition of Ascorbic Acid (Protocol 2)		
Agitation speed (rpm)	K	$K_{Da} (\text{h}^{-1})$
60	2.13	6.67×10^{-2}
150	2.39	5.39×10^{-2}
275	2.91	3.77×10^{-2}
360	2.81	4.27×10^{-2}

R_e in top phase and bottom phase is 14.31 and 38.86, respectively.

The range of viscosity and density of each phase in different temperature (293.15 – 323.15 K) were measured in order to calculate the Reynolds number for each experimental condition. These determinations are important characterization to evaluate the design of reactor and to understand the kind of flow regime and mass transfer (Quental et al, 2015). The density and viscosity values at different temperatures are depicted in Figure 3 (Table S3 and S4 of Supporting Information). The linear and exponential trend for density and viscosity, respectively, are typical for ATPS (Oliveira et al., 2019). For the studied system, the density ranged between 0.839 and 0.866 g.m⁻³ (ethanol-rich phase); and, 1.506 and 1.524 g.m⁻³ (salt-rich phase). The density of the solvent-rich phases is similar to those found with other systems based on organic solvents such as tetrahydrofuran ranging between 0.873 and 0.905 g.m⁻³ (Sousa et al., 2017); and acetonitrile ranging 0.806 and 0.837 g.m⁻³ (Oliveira et al, 2019); and smaller than those observed in polymer such as PEG-1000 (1.089 – 1.091 g.m⁻³) reported by Snyder et al (1992). The viscosity ranged between 1.033 and 2.286 mPa.s (ethanol-rich phase); and, 4.902 and 11.060 g.m⁻³ (salt-rich phase). The viscosity of solvent-rich phase was higher than acetonitrile (0.312 – 0.505 mPa.s – Oliveira et al, 2019) and tetrahydrofuran-rich phase (0.420 – 0.651 mPa.s – Sousa et al., 2017), while the other phase is less viscous than those using polyvinylpyrrolidone (10.556 – 30.056 mPa.s - Oliveira et al, 2019) and glucose (6.900 – 24.551 mPa.s – Sousa et al., 2017).

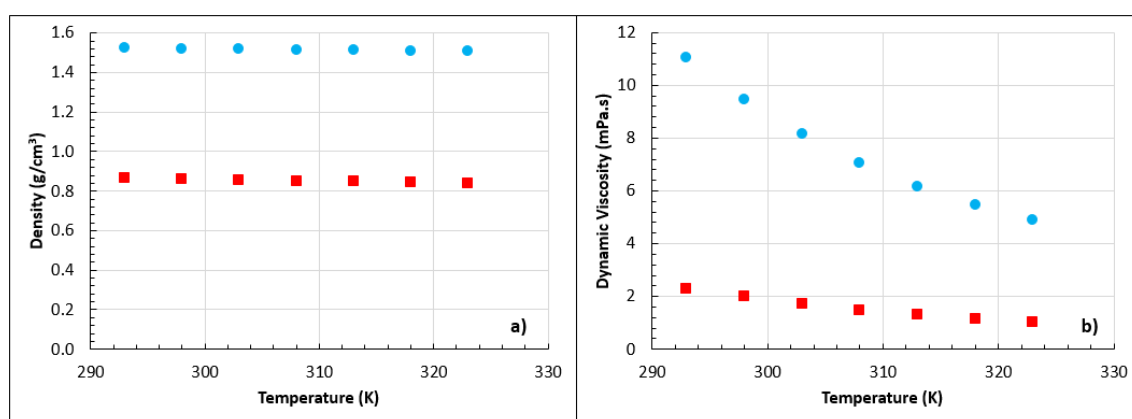


Figure 3: Experimental density (a) and viscosity (b) for aqueous two-phase system based on 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at different temperatures (283.15 – 338.15 K) and 0.10 ± 0.01 MPa. ● - bottom phase and ■ - top phase.

In the further trials, agitation speed of 60 rpm has been chosen due to the higher migration of vanillin and ascorbic acid to top and bottom phase, respectively. The effect of dispersed phase flow rate (1.5; 3.0; 4.5 and 6.0 mL.min⁻¹) in the recovery index was studied (Figure 4 and Tables S5-S6 of Supporting Information).

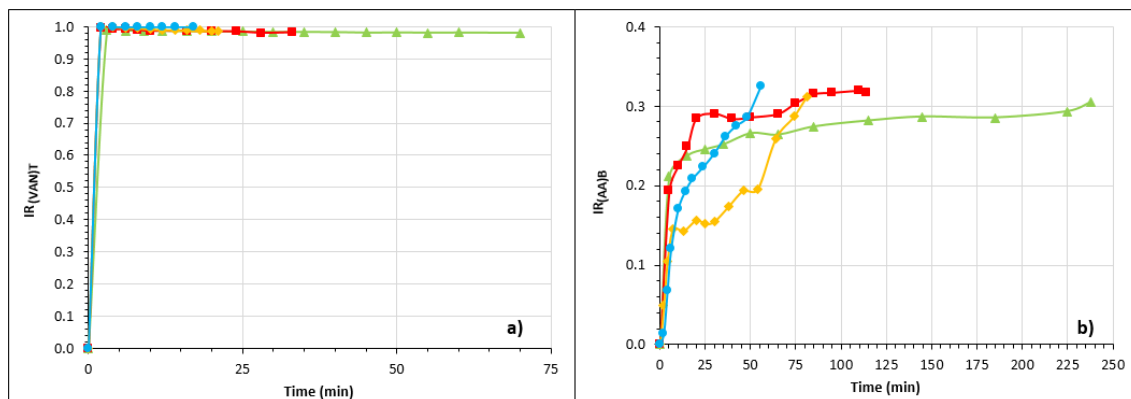


Figure 4: Effect of volumetric flow rate ($\blacktriangle$ - 1.5 mL.min⁻¹; $\blacksquare$ - 3.0 mL.min⁻¹; $\blacklozenge$ - 4.5 mL.min⁻¹ and $\bullet$ - 6.0 mL.min⁻¹) of vanillin 0.05 mg.mL⁻¹ (dissolved in bottom phase) or 0.02 mg.mL⁻¹ ascorbic acid (dissolved in top phase) in recovery index of vanillin - top phase (a) and ascorbic acid - bottom phase (b) using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 298.15 $\pm$ 1 K and 0.1 MPa. Agitation speed of 60 rpm.

The vanillin migrated integrally to the top phase ($IR_{(VAN)T} \cong 100\%$) and the F_D has no influence in $IR_{(VAN)T}$, regardless of used F_D , i.e., it had no effect on the recovery of vanillin in the top phase. The observation is due to the high volume of top phase (3 times higher than bottom phase). The migration of ascorbic acid to top phase from ethanol-rich phase (feed) to bottom phase reached 33% in the steady state. In this case, increasing the F_D verified the increase the Reynolds number (Re), and consequently make the flow more turbulence and the mass transfer easier. This phenomenon is also reported by Porto et al, (2004), Sarubbo et al., (2003) and Rosa et al., (2012). The value of K , Re and K_{Da} of top and bottom phase are shown in Table 2.

Table 2: Effect of dispersed phase flow rate in the parameters for mass transfer of biomolecules in ATPS after the steady state.

Partition of Vanillin (Protocol 1)			
F_D (mL.min ⁻¹)	K	R_e	K_{Da} (h ⁻¹)
1.5	50.02	7.15	4.05×10^{-3}
3.0	54.86	14.31	7.42×10^{-3}
4.5	70.94	21.46	8.59×10^{-3}
6.0*	-	28.62	-
Partition of Ascorbic Acid (Protocol 2)			
1.5	2.28	19.43	2.94×10^{-2}
3.0	2.13	38.86	6.67×10^{-2}
4.5	2.21	58.29	9.34×10^{-2}
6.0	2.07	77.72	1.40×10^{-1}

* Completed migration to top phase, thus K and K_{Da} could not be calculated.

3.2. Partition of Standard Biomolecules in Continuous Mode

In the mode continuous was used protocol 3 with the best parameters of agitation speed of 60 rpm and volumetric flow rate of 6.0 mL.min⁻¹ determined in experiments previous. It should be noted that the concentrations of vanillin 0.05 mg.mL⁻¹ (dissolved in bottom phase) and 0.02 mg.mL⁻¹ ascorbic acid (dissolved in top phase) at 298 ± 0.1 K and 0.1 MPa were maintained. Figure 5 (Tables S7 and S8 of Supporting Information) shows the recovery index, partition coefficient for both biomolecules and the selectivity of system. The vanillin obtained values $IR_{(van)T} \cong 100$ % in the top phase. On the other hand, it was observed that ascorbic acid diverged from that expected by remaining largely in the top phase ($IR_{(AA)B} \cong 13$ %). This low mass transfer values can be explained by the drag effect provided by the simultaneous flow of countercurrent phases and the yield strength provided by the stirring system as reported by Rosa et al. (2012), which is due to the viscosity difference between the continuous phase and the dispersed phase using a packed column in counter-current and co-current.

Despite the lower recovery values of ascorbic acid, there is a tendency in the increase of partitioning of the biomolecule demonstrated by the reduction of the partition coefficient (K) from $K_{AA} = 74.17$ to 1.67 throughout the operation. For the vanillin, the K_{VAN} increase was recorded, reaching values of 239.46. In this way, an increase in the selectivity (S) between the phases reaching values of 92.2 at the end of the process is

obtained. It should be noted that Reis et al. (2012) obtained the best partition coefficient value $K_{AA} = 0.034$ and $K_{VAN} = 430$ in the batch system.

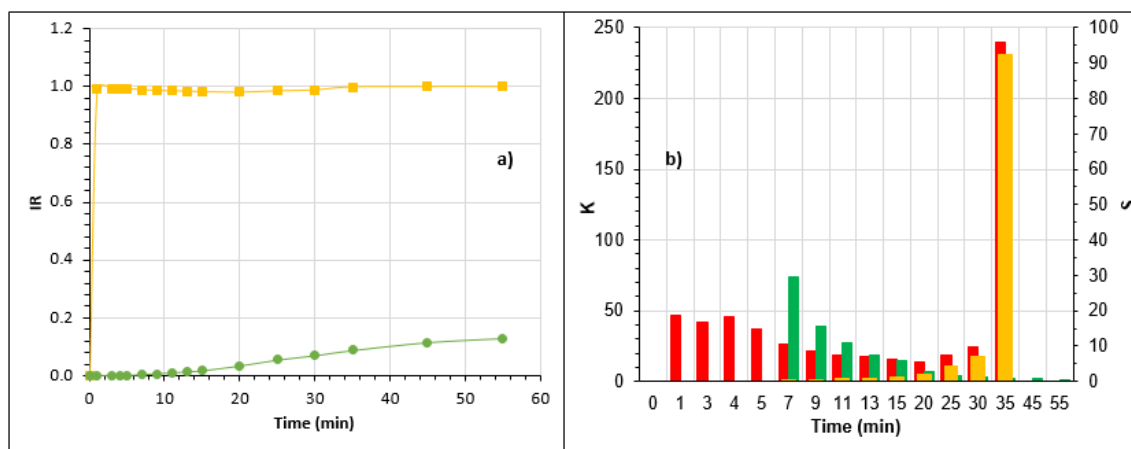


Figure 5: Recovery index of ascorbic acid in the bottom phase (●) and vanillin in the top phase (■) (a), partition coefficient of ascorbic acid (—) and vanillin (—), and selectivity (—) (b) using aqueous two-phase system (Protocol 3) composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K_2HPO_4 + 35 wt% water at 60 rpm, $6.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $298.15 \pm 1 \text{ K}$ and 0.1 MPa.

3.3. Partition of Biomolecule from Food Waste

Finally, to prove the ability of the continuous ATPS formed by ethanol and K_2HPO_4 in simultaneously separating vanillin and ascorbic acid from a food waste source was used protocol 4 of operation consisting in the dilution of Pudding Diet Dr. Oetker with initial concentrations average of $0.015 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The choice of this food matrix was based on presence of both biomolecules in significant (non-residual) quantities, providing the necessary conditions for its quantification. Again, the best recovery parameters were used (volumetric flow rate of $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and agitation speed of 60 rpm).

According to Figure 6 (Table S9 and S10 of Supporting Information), the system provided a top phase IR of 62% for vanillin and 25% for ascorbic acid. It is noted that lower values of vanillin recovery were obtained, which can be explained by the complexity of the pudding sample. However, there was a large increase in ascorbic acid transfer reaching recovery rates of 75% in the phase of higher affinity. Furthermore, it is observed that there is a reduction in the partition coefficients of ascorbic acid ($K_{AA} = 1.74$ to 0.03), as expected. However, an unexpected result occurred with the reduction of the vanillin partition coefficient ($K_{VAN} = 3.21$ to 0.30). Thus, there is a small increment of phase selectivity along the process reaching values of $S = 11.87$. It should be noted that

Reis et al. (2012) obtained the best partition coefficient value $K_{AA} \cong 2.82$ and $K_{VAN} \cong 63$ ($S = 22.34$) in the batch system with a food sample. This shows that the system in semi-continuous operation approach the batch mode in the partitioning of ascorbic acid and was lower for vanillin.

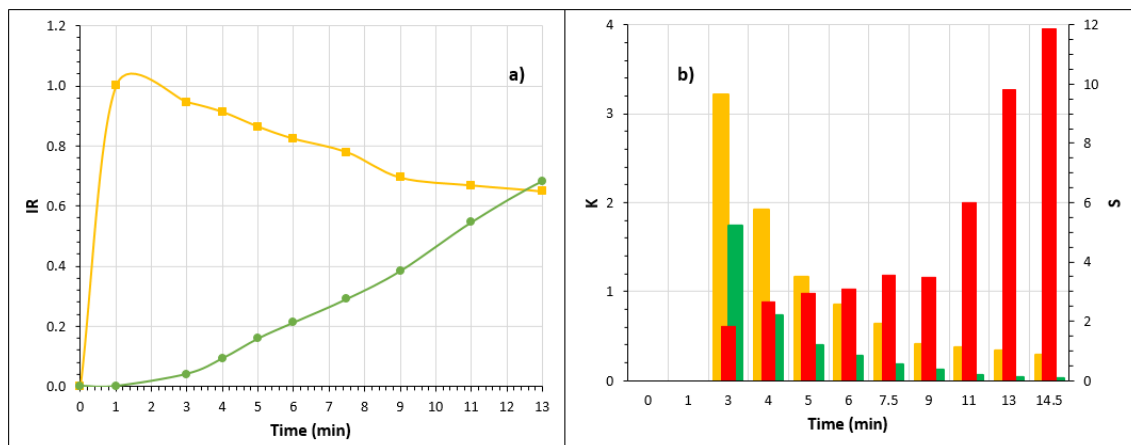


Figure 6: Recovery index of ascorbic acid in the bottom phase (●) and vanillin in the top phase (■) from Pudim Diet Dr. Oetker (a), partition coefficient of ascorbic acid (—) and vanillin (—), and selectivity (—) (b) using aqueous two-phase system (Protocol 4) composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K_2HPO_4 + 35 wt% water at 60 rpm, $6.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $298.15 \pm 1 \text{ K}$ and 0.1 MPa .

4. Conclusion

It has been shown that the agitation speed and the volumetric flow have negligible influence on the vanillin recovery index due to the volumetric ratio between the phases (top volume is 3 times of bottom volume). On the other hand, the increase of these parameters increase the recovery rate of ascorbic acid. The semi-continuous mode is more effective in the selective recovery than the continuous mode under the operating conditions used because the $IR > 50 \%$ for both biomolecules. Additionally, in the semi-continuous mode the reactor design was also favorable to the separation of the biomolecules under study, similarly to the batch conditions of previous studies. Finally, vanillin can be selectively separated of ascorbic acid from diet pudding ($S = 11.87$) using aqueous two-phase system based on 50 wt% ethanol + 15 wt% K_2HPO_4 + 35 wt% water at $298.15 \pm 1 \text{ K}$ and 0.1 MPa carried out in a column reactor with 3 impellers (vertical 4 blades) under 60 rpm and $6.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Aknowledgments

The authors thank *Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe* (FAPITEC/SE), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for financial suportar and scholarship awarded do B.C. Silva. Moreover, we are thankful to Tiradentes University for scholarship of S.A. Bomfim and financial support to A.V. Veloso.

References

- Almeida, M.R.; Passos, H.; Pereira, M.M.; Lima, A.S.; Coutinho, A.P.; Freire, M.G. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 128: 1–10, 2014.
- Aydogus, Z.; Çetin, S.M.; Ozgur, M.U. Determination of ascorbic acid in vegetables by derivative spectrophotometry. *Turk Journal Chemistry*.26: 697–704, 2002.
- Biazus, J.P.M.; Santana, J.C.C.; Souza, R.R.; Jordão, E.; Tambourgi, E.B. Continuous extraction of α - and β -amylases from Zea mays malt in a PEG4000/CaCl₂ ATPS. *Journal of Chromatography B*. 858: 227–233, 2007.
- Campos-Pinto, I.; Espitia-Saloma, E.; Rosa, S.A.S.L.; Rito-Palomares, M.; Aguilar, O.; Arévalo-Rodríguez, M.; Azevedo, A.M. Integration of cell harvest with affinity-enhanced purification of monoclonal antibodies using aqueous two-phase systems with a dual tag ligand. *Separation and Purification Technology*. 173: 129–134, 2017.
- Cardoso, G.B.; Souza, I.N.; Freire, M.G.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Novel aqueous two-phase systems composed of acetonitrile and polyols: Phase diagrams and extractive performance. *Separation and Purification Technology*. 124: 54-60, 2014.
- Cardoso, G. B.; Souza, I. N.; Pereira, M. M.; Costa, L. P.; Freire, M. G.; Soares, C. M. F.; Lima, Á. S. Poly(vinyl alcohol) as a novel constituent to form aqueous two-phase systems with acetonitrile: Phase diagrams and partitioning experiments. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 94, p. 317–323, 2015.
- Cavalcanti, M.T.H.; Carneiro-da-Cunha, M.G.; Brandi, I.V.; Porto, T.S.; Converti, A.; Lima Filho, J.L.; Porto, A.L.F.; Pessoa, A. Continuous extraction of α -toxin from a fermented broth of *Clostridium perfringens* Type A in perforated rotating disc

- contactor using aqueous two-phase PEG-phosphate system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 47: 1771–1776, 2008.
- Espitia-Saloma, E.; Velazquez-Villegas, P.; Aguilar, O.; Rito-Palomares, M. Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products. *Food and Bioproducts Processing*. 92: 101–112, 2014.
- Flieger, J., & Czajkowska-Żelazko, A., Aqueous two phase system based on ionic liquid for isolation of quinine from human plasma sample. *Food Chemistry*, 166, 150–157, 2015.
- Garza-Madrid, M.; Rito-Palomares, M.; Serna-Saldívar, S. O.; Benavides, J. Potencial of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human serum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry*. 45 (7): 1082–1087, 2010.
- Gomez, G.; Leiva, L.; Nerli, B.B. Aqueous two-phase systems: A simple methodology to obtain mixtures enriched in main toxins of *Bothrops alternatus* venom. *Protein Expression and Purification*. 124: 68–74, 2016.
- Grilo, A. L.; Aires-Barros, M.R.; Azevedo, A.M. Partitioning in aqueous two-phase systems: Fundamentals, applications and trends. *Separation & Purification Reviews*. 45 (1): 68–80, 2014.
- Gustavsson, J.; Cederberg, C.; Sonesson, U.; Van Otterdijk, R.; Meybeck, A. Global food losses and food waste: extent, causes and prevention. *FAO*, 2011.
- Hussein, A. Z. M.; Spectrophotometric determination of ascorbic acid in aqueous solutions and in pharmaceuticals formulations. *Journal of Al-Nahrain University*, v. 16, p. 65–71, 2013.
- Igarashi, L.; Kieckbusch, T.G.; Franco, T.T., Mass transfer in aqueous two-phase systems packed column. *Journal Chromatography. B*. 807: 75–80, 2004.
- Jadhav, D.; Rekha, B.N.; Gogate, P.R.; Rathod, V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*. 93 (4): 421–426, 2009.
- Jungbauer, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*. 31: 479–492, 2013.
- Kalaivani, S.; Regupathi, I. Continuous aqueous two-phase extraction of α -lactalbumin from whey in conventional rotating disc contactor. *Separation Science and Technology*. 51 (14): 2411–2419, 2016.
- Li, F.; Li, Q.; Wu, S.; Sun, D.; Tan, Z. Salting-out extraction of sinomenine from *Sinomenium acutum* by an alcohol/salt aqueous two-phase system using ionic

- liquids as additives. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 93 (7): 1925–1930, 2017.
- Lima, A.S.; Soares, C.M.F.; Paltram, R.; Halbwirth, H.; Bica, K. Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria*. 451: 68-78, 2017.
- Marques, C.F.C.; Mourão, T.; Neves, C.M.S.S.; LIMA, A.S.; Boal-Palheiros, I.; Coutinho, J.A.P.; Freire, M.G. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and sodium carbonate as enhanced routes for the extraction of tetracycline. *Biotechnology Progress*. 29: 645-654, 2013.
- Mourtzinis, I.; Konteles, S.; Kalogeropoulos, N.; Karathanos, V.T. Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chemistry*. 114 (3): 791–797, 2009.
- Noubigh, A., Mgaidi, A. and Abderrabba, M., Temperature effect on the distribution of some phenolic compounds: An experimental measurement of 1-octanol/water partition coefficients. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55, 488–491, 2010.
- Oliveira, B.S.; D'Anzicourt, C.M.S.; Soares, C.M.F.; Souza, R.L.; Lima, A.S. Liquid-liquid extraction of phenolic compounds in systems based on acetonitrile + water + polyvinylpyrrolidone at 298.15 K. *Separation and Purification Technology*. 211: 117-123, 2019.
- Pawar, P.A.; Parasu-Veera, U.; Sawant, S.B.; Joshi, J.B. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems: modified spray extraction columns. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 75: 751–758, 1997.
- Plácido, N.S.O.; Carlos, A.L.S.; Galvão, J.U.; Souza, R.L.; Soares, C.M.F.; Mattedi, S.; Fricks, A.T.; Lima, A.S. Protic ionic liquids as a constituent of biphasic systems based on acetonitrile: Phase diagram and alkaloid partitioning. *Separation And Purification Technology*. 200: 318-326, 2018.
- Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A.; Moreira, K.A.; Melo, H.J.F.; Lima-Filho, J.L.; Campos-Takaki, G.M.; Tambourgi, E.B. Recovery of ascorbic oxidoreductase from crude extract with an aqueous two-phase system in a perforated rotating disc contactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47: 821–826, 2004.
- Quental, M.V.; Passos, H.; Kurnia, K.A.; Coutinho, J.P.; Freire, M.G. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and acetate-based salts: phase diagrams, densities, and viscosities. *Journal of Chemical Engineering Data*. 60: 1674–1682,

2015.

- Rabelo, A.P.B.; Tambourgi, E.B. Performance of a pulsed-cap micro column for protein extraction. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 20: 357–362, 2003.
- Rabieenezhad, A.; Roosta, A. Experimental study and thermodynamic modelling of Penicillin-G extraction using PEG 6000 and K_2HPO_4 aqueous two-phase system. *Journal of Chemical Thermodynamics*. 120: 54–59, 2018.
- Raghavarao, K.S.M.S.; Ranganathan, T.V.; Srinivas, N.D.; Barhate, R.S. Aqueous two-phase extraction an environmentally benign technique. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 5: 136–141, 2003.
- Reis, I. A. O.; Santos, S. B.; Santos, L. A.; Oliveira, N.; Freire, M. G.; Pereira, J. F. B.; Ventura, S. P. M.; Coutinho, J. A. P.; Soares, C. M. F.; Lima, Á. S. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2453–2461, 2012.
- Rito-Palomares, M.; Benavides, J. Aqueous two-phase systems for bioprocess development for the recovery of biological products. Springer. p. 196, 2017.
- Rosa, P.A.J.; Azevedo, A.M.; Sommerfeld, S.; Bäcker, W.; Aires-Barros, M.R. Continuous aqueous two-phase extraction of human antibodies using a packed column. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 880: 148–156, 2012.
- Sankaran, R.; Show, P.L.; Yap, Y.J.; Lam, H.L.; Ling, T.C.; Pan, G.T.; Yang, T.C.K. Sustainable approach in recycling of phase components of large scale aqueous two-phase flotation for lipase recovery. *Journal of Cleaner Production*. 184: 938–948, 2018.
- Santos, S.B.; Reis, I.A.O.; Silva, C.P.C.; Campos, A.F.; Ventura, S.P.M.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Selective partition of caffeine from coffee bean and guaraná seed extracts using alcohol–salt aqueous two-phase systems. *Separation Science and Technology*. 51 (12): 2008–2019, 2016.
- Sarubbo, L. A.; Oliveira, L. A.; Porto, A. L. F.; Lima Filho, J. L.; Campos-Takaki, G. M. and Tambourgi, E. B., Performance of a perforated rotating disc contactor in the continuous extraction of a protein using the PEG-Cashew nut tree gum aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 221–227, 2003.
- Snyder, S.M.; Cole, K.D.; Szlag, D.C. Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25 degree C. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 37: 268–274, 1992.

- Soares, R.R.G.; Azevedo, A.M.; Van Alstine, J.M.; Aires-Barros, M.R. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Biotechnology Journal*. 10: 1158–1169, 2015.
- Song, C.P.; Ramanan, R.N.; Vijayaraghavan, R.; Macfarlane, D.R.; Chan, E.S.; Show, P.L.; Yong, S.T.; Ooi, C.W. Effect of salt-based adjuvant on partition behaviour of protein in aqueous two-phase systems composed of polypropylene glycol and cholinium glycinate. *Separation and Purification Technology*. 196: 281–286, 2018a.
- Song, C.P.; Yap, Q.Y.; Chong, M.Y.A.; Nagasundara, R.N.; Vijayaraghavan, R.; MacFarlane, D.R.; Chan, E.S.; Ooi, C.W. Environmentally benign and recyclable aqueous two-phase system composed of distillable CO₂-based alkyl carbamate ionic liquids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 6 (8): 10344–10354, 2018b.
- Sousa, K.M.; Maciel, G.E.L.O.; Buarque, F.S.; Santos, A.J.; Marques, M.N.; Cavalcanti, E.B.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Novel phase diagrams of aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran + carbohydrates + water: Equilibrium data and partitioning experiments. *Fluid Phase Equilibria*, 433, 1–9, 2017.
- Souza, R.L.; Lima, R.A.; Coutinho, J.A.P.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. *Separation and Purification Technology*. 155: 118–126, 2015a.
- Souza, R.L.; Ventura, S.P.M.; Coutinho, J.A.P.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Lipase purification using ionic liquids as adjuvants in aqueous two-phase systems. *Green Chemistry*. 17: 3026–3024, 2015b.
- Srinivas, N.D.; Narayan, A.V.; Raghavarao, K.S.M.S. Mass transfer in a spray column during two-phase extraction of horseradish peroxidase, *Process Biochemistry*. 38: 387–391, 2002.
- Takács-Nnovak, K., Avdeef, A., Interlaboratory study of log p determination by shake-flask and potentiometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, 1405–1413, 1996.
- Uddin, M.S.; Hawlader, M.N.; Zhu, H.J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. *Journal of Microencapsulation*. 18 (2): 199–209, 2001

Vázquez-Villegas, P.; Aguilar, O.; Rito-Palomares, M. Continuous enzyme aqueous two-phase extraction using a novel tubular mixer-settler in multi-step counter-current arrangement. *Separation and Purification Technology*. 141: 263–268, 2015.

Supporting Information

Selective and continuous recovery of added-value compounds from food waste using aqueous two-phase system

Alex Viana Veloso¹, Brenda Caroline Silva¹, Sthefany Araújo Bomfim¹, Ranyere
Lucena de Souza, Cleide Mara Faria Soares^{1,2}, Álvaro Silva Lima^{1,2,*}

¹ Universidade Tiradentes. Av. Murilo Dantas, 300. Farolândia. 49032-490. Aracaju-Sergipe, Brasil.

² Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. Prédio do ITP. Farolândia. 49032-490. Aracaju-Sergipe, Brasil.

*Corresponding authors: E-mail: aslima2001@yahoo.com.br

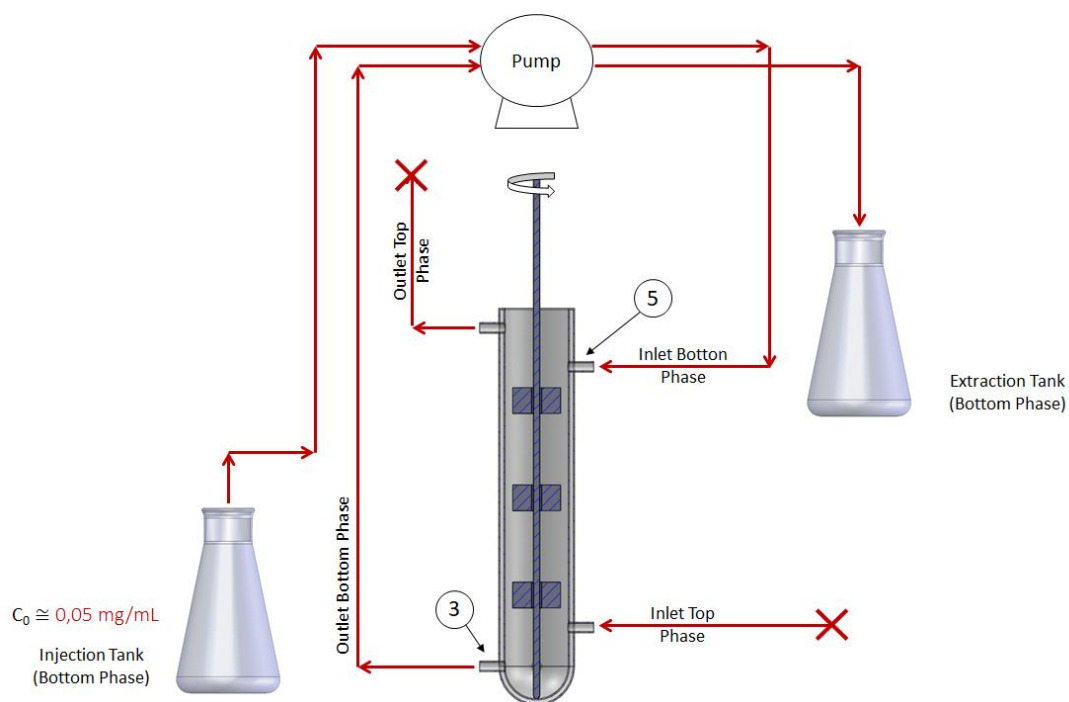


Figure S1: Scheme of reactor operation using Protocol 1 with the injection of vanillin dissolved from the bottom phase ($C_0 = 0.05 \text{ mg / mL}$) and injected by the top of the reactor. (Semi-continuous mode)

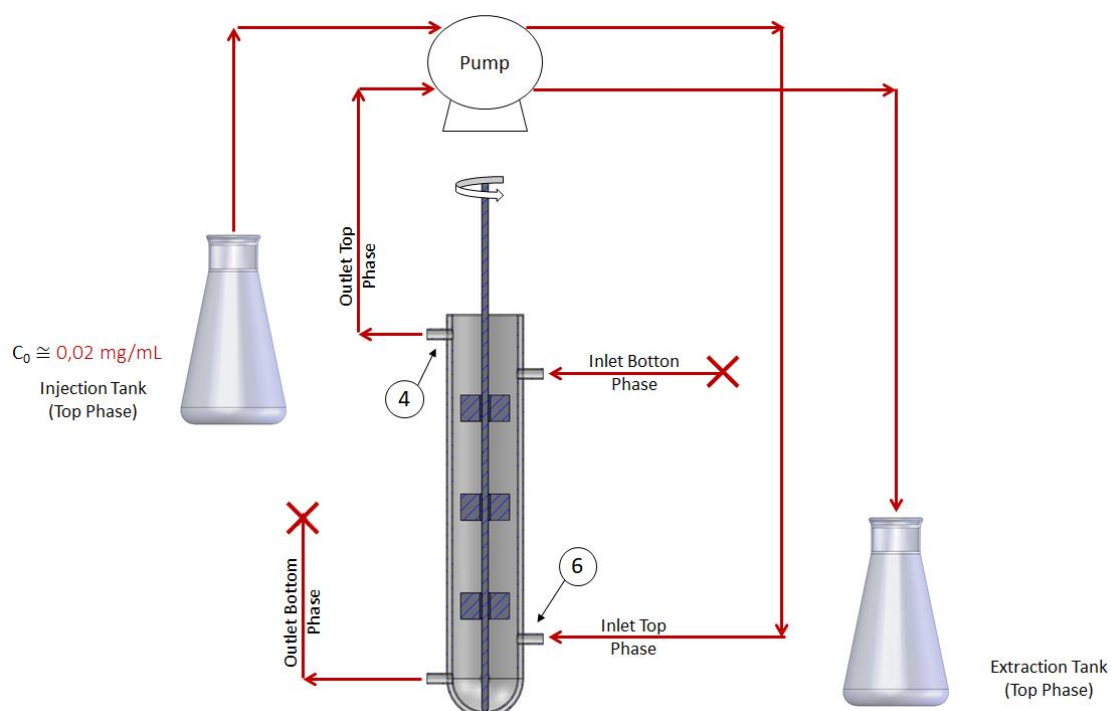


Figure S2: Schematic of reactor operation using Protocol 2 with the injection of dissolved ascorbic acid from the top phase ($C_0 = 0.02 \text{ mg / mL}$) being injected from the bottom of the reactor. (Semi-continuous mode)

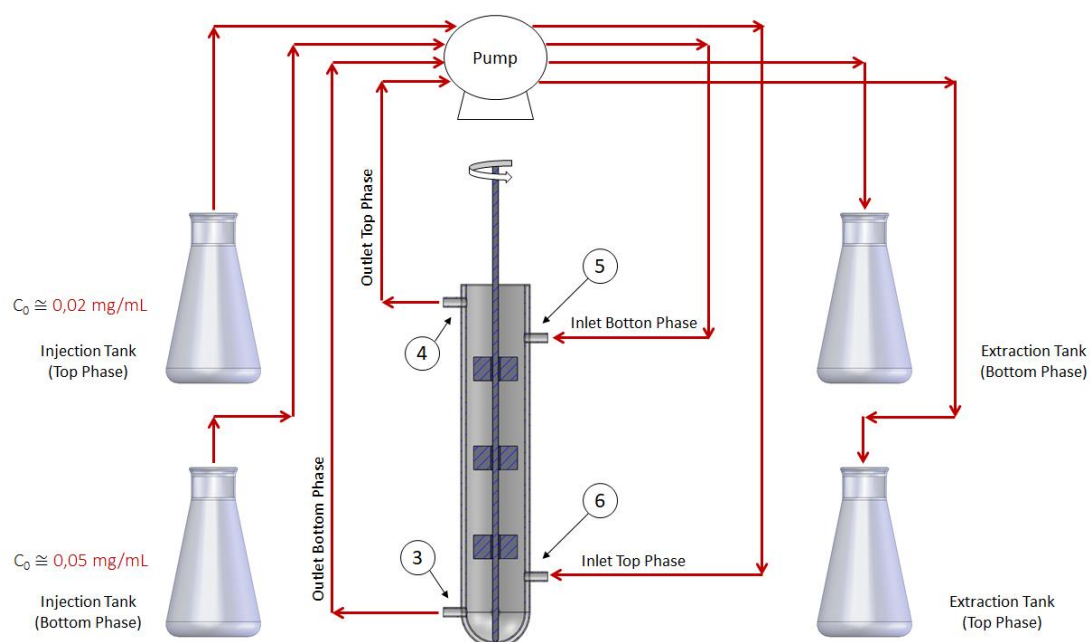


Figure S3: Scheme of reactor operation using Protocol 3 with valinine injection dissolved in the bottom phase ($C_0 = 0.05 \text{ mg / mL}$) and ascorbic acid dissolved in the top phase ($C_0 = 0.02 \text{ mg / mL}$). The phases are injected countercurrent simultaneously. (Continuous mode)

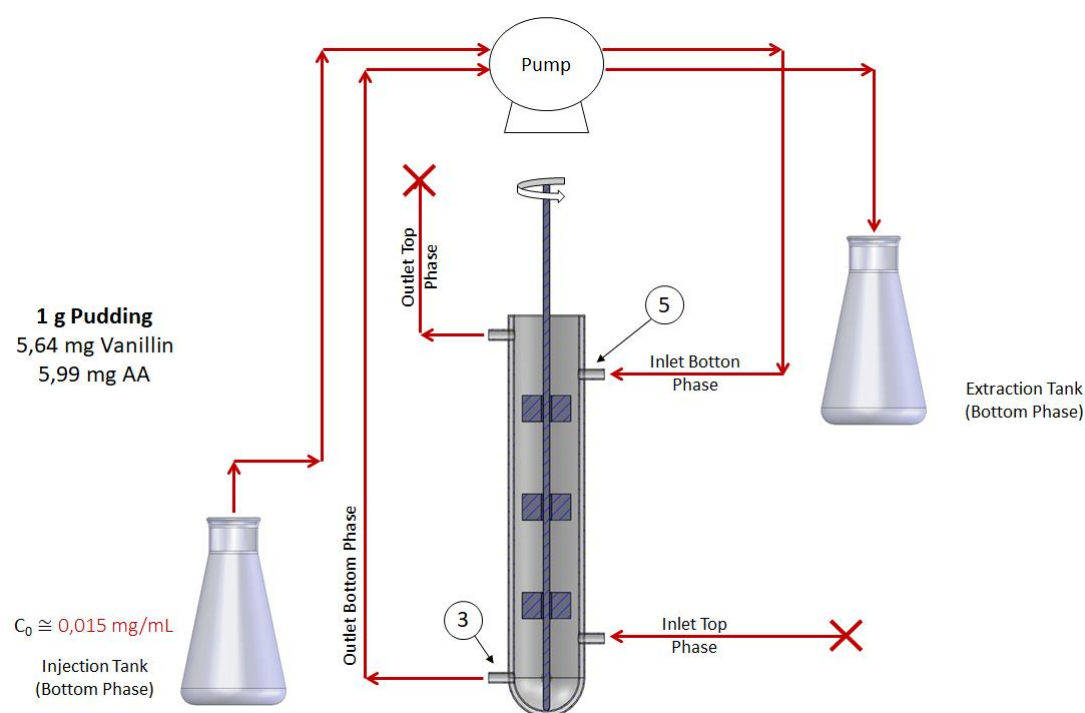


Figure S4: Scheme of reactor operation using Protocol 4 with the injection of Diet Pudding Dr. Oetker dissolved from the bottom phase ($C_0 = 0.015 \text{ mg / mL}$) and injected by the top of the reactor. (Semi-continuous mode)

Table S1. Effect of agitation speed (60 rpm; 150 rpm; 275 rpm and 360 rpm) in recovery index of vanillin in top phase using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa operated in semi-continuous mode. Dispersed phase flow rate of 3.0 mL.min⁻¹ of vanillin 0.05 mg.mL⁻¹ (dissolved in bottom phase).

Agitation speed (rpm)	Time (min)	C _{(van)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(van)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(van)T}	K _(van)
60	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.0124	0.0002	0.99	61.25
	4	0.0124	0.0003	0.99	36.88
	6	0.0124	0.0003	0.99	41.69
	8	0.0124	0.0004	0.99	32.14
	10	0.0123	0.0005	0.99	24.14
	16	0.0123	0.0005	0.99	24.82
	20	0.0123	0.0006	0.98	21.19
	24	0.0123	0.0006	0.99	21.72
	28	0.0123	0.0007	0.98	16.60
	33	0.0123	0.0007	0.98	17.99
150	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.0162	0.0000	1.00	-
	4	0.0162	0.0000	1.00	-
	6	0.0162	0.0000	1.00	-
	10	0.0162	0.0000	1.00	-
	14	0.0162	0.0000	1.00	-
	18	0.0162	0.0000	1.00	-
	22	0.0161	0.0003	0.99	50.11
	26	0.0161	0.0005	0.99	29.80
	29	0.0161	0.0004	0.99	43.45

Table S1 (cont). Effect of agitation speed (60 rpm; 150 rpm; 275 rpm and 360 rpm) in recovery index of vanillin in top phase using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa operated in semi-continuous mode. Dispersed phase flow rate of 3.0 mL.min⁻¹ of vanillin 0.05 mg.mL⁻¹ (dissolved in bottom phase).

Agitation speed (rpm)	Time (min)	C _{(van)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(van)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(van)T}	K _(van)
275	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.0168	0.0000	1.00	-
	4	0.0162	0.0018	0.97	8.87
	6	0.0160	0.0024	0.95	6.58
	10	0.0160	0.0025	0.95	6.32
	14	0.0159	0.0026	0.95	6.02
	18	0.0160	0.0025	0.95	6.46
	22	0.0160	0.0024	0.95	6.53
	26	0.0160	0.0024	0.95	6.60
	30	0.0160	0.0024	0.95	6.54
	34	0.0160	0.0024	0.95	6.69
360	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.0155	0.0017	0.97	9.18
	4	0.0153	0.0022	0.96	6.88
	6	0.0153	0.0022	0.96	7.08
	10	0.0153	0.0022	0.96	7.06
	14	0.0154	0.0021	0.96	7.30
	18	0.0154	0.0020	0.96	7.63
	22	0.0154	0.0020	0.96	7.89
	26	0.0154	0.0020	0.96	7.75
	30	0.0154	0.0019	0.96	8.31
	34	0.0154	0.0019	0.96	8.13
	36	0.0154	0.0019	0.96	8.13

Table S2. Effect of agitation speed (60 rpm; 150 rpm; 275 rpm and 360 rpm) in recovery index of ascorbic acid in bottom phase using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa operated in semi-continuous mode. Dispersed phase flow rate of 3.0 mL.min⁻¹ of ascorbic acid 0.02 mg.mL⁻¹ (dissolved in top phase).

Agitation speed (rpm)	Time (min)	C _{(AA)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(AA)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(AA)B}	K _(AA)
60	0	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	5	0.0094	0.0099	0.81	0.95
	10	0.0090	0.0115	0.78	0.79
	15	0.0087	0.0127	0.75	0.69
	20	0.0083	0.0146	0.72	0.57
	30	0.0083	0.0149	0.71	0.56
	40	0.0083	0.0145	0.72	0.57
	50	0.0083	0.0146	0.71	0.57
	65	0.0083	0.0149	0.71	0.56
	75	0.0081	0.0156	0.70	0.52
	85	0.0080	0.0161	0.68	0.49
	95	0.0080	0.0162	0.68	0.49
	110	0.0079	0.0164	0.68	0.48
	114	0.0079	0.0162	0.68	0.49
150	0	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	5	0.0107	0.0121	0.21	0.88
	10	0.0103	0.0138	0.24	0.74
	15	0.0101	0.0147	0.26	0.69
	20	0.0100	0.0151	0.26	0.66
	30	0.0097	0.0161	0.28	0.61
	40	0.0096	0.0167	0.29	0.57
	55	0.0096	0.0168	0.29	0.57
	70	0.0096	0.0166	0.29	0.58
	85	0.0096	0.0165	0.29	0.59
	100	0.0095	0.0169	0.29	0.56
	110	0.0096	0.0167	0.29	0.57

Table S2 (cont). Effect of agitation speed (60 rpm; 150 rpm; 275 rpm and 360 rpm) in recovery index of ascorbic acid in bottom phase using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa operated in semi-continuous mode. Dispersed phase flow rate of 3.0 mL.min⁻¹ of ascorbic acid 0.02 mg.mL⁻¹ (dissolved in top phase).

Agitation speed (rpm)	Time (min)	C _{(AA)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(AA)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(AA)B}	K _(AA)
275	0	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	5	0.0124	0.0130	0.21	0.96
	10	0.0122	0.0140	0.22	0.87
	15	0.0120	0.0146	0.23	0.83
	20	0.0119	0.0151	0.24	0.79
	30	0.0117	0.0161	0.25	0.73
	40	0.0114	0.0172	0.27	0.66
	50	0.0115	0.0168	0.26	0.69
	60	0.0118	0.0155	0.25	0.76
	65	0.0117	0.0161	0.25	0.72
	75	0.0117	0.0158	0.25	0.74
	85	0.0114	0.0171	0.27	0.67
	95	0.0117	0.0160	0.25	0.73
	115	0.0116	0.0162	0.26	0.72
	121	0.0116	0.0163	0.26	0.71
360	0	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	5	0.0115	0.0095	0.17	1.22
	10	0.0106	0.0132	0.23	0.80
	15	0.0106	0.0133	0.24	0.80
	20	0.0106	0.0133	0.24	0.80
	30	0.0104	0.0142	0.25	0.73
	40	0.0102	0.0149	0.27	0.68
	50	0.0102	0.0147	0.26	0.70
	60	0.0102	0.0147	0.26	0.70
	70	0.0102	0.0148	0.26	0.69
	80	0.0102	0.0148	0.26	0.69
	95	0.0102	0.0146	0.26	0.70
	110	0.0102	0.0148	0.26	0.69
	123	0.0102	0.0148	0.26	0.69

Table S3. Experimental density and viscosity for aqueous two-phase system based on 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at different temperatures (283.15 – 338.15 K) and 0.10 ± 0.01 MPa of top phase.

Temperature (K)	Viscosity Kinematic (mm ² .s ⁻¹)	Viscosity dynamic (mPa.s)	Density (g.cm ⁻³)
293	2.6408	2.2865	0.8658
298	2.3161	1.9948	0.8613
303	2.0180	1.7294	0.8570
308	1.7544	1.4958	0.8526
313	1.5468	1.3120	0.8482
318	1.3731	1.1585	0.8437
323	1.2307	1.0328	0.8392

Table S4. Experimental density and viscosity for aqueous two-phase system based on 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at different temperatures (283.15 – 338.15 K) and 0.10 ± 0.01 MPa of bottom phase.

Temperature (K)	Viscosity Kinematic (mm ² .s ⁻¹)	Viscosity dynamic (mPa.s)	Density (g.cm ⁻³)
293	7.2590	11.0600	1.5237
298	6.2154	9.4504	1.5205
303	5.3787	8.1625	1.5176
308	4.6496	7.0430	1.5147
313	4.0846	6.1752	1.5118
318	3.6247	5.4694	1.5089
323	3.2549	4.9018	1.5060

Table S5. Effect of volumetric flow rate (1.5 mg.mL⁻¹; 3.0 mg.mL⁻¹; 4.5 mg.mL⁻¹ and 6.0 mg.mL⁻¹) of vanillin 0.05 mg.mL⁻¹ (dissolved in bottom phase) in recovery index of vanillin - top phase using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa operated in semi-continuous mode. Agitation speed of 60 rpm.

Disperse flux rate (mL.min ⁻¹)	Time (min)	C _{(van)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(van)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(van)T}	K _(van)
1.5	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	3	0.0159	0.0006	0.99	28.69
	6	0.0158	0.0006	0.99	25.43
	9	0.0158	0.0007	0.99	24.06
	12	0.0158	0.0007	0.99	23.80
	16	0.0158	0.0007	0.99	21.61
	20	0.0158	0.0007	0.98	21.19
	25	0.0158	0.0008	0.98	20.32
	30	0.0158	0.0008	0.98	19.35
	35	0.0158	0.0008	0.98	19.10
	40	0.0158	0.0008	0.98	18.62
	45	0.0157	0.0009	0.98	16.91
	50	0.0158	0.0009	0.98	17.58
	55	0.0157	0.0009	0.98	16.65
	60	0.0157	0.0009	0.98	17.04
	70	0.0157	0.0010	0.98	16.34
3.0	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.0124	0.0002	0.99	61.25
	4	0.0124	0.0003	0.99	36.88
	6	0.0124	0.0003	0.99	41.69
	8	0.0124	0.0004	0.99	32.14
	10	0.0123	0.0005	0.99	24.14
	16	0.0123	0.0005	0.99	24.82
	20	0.0123	0.0006	0.98	21.19
	24	0.0123	0.0006	0.99	21.72
	28	0.0123	0.0007	0.98	16.60
	33	0.0123	0.0007	0.98	17.99

Table S5 (cont). Effect of volumetric flow rate (1.5 mg.mL^{-1} ; 3.0 mg.mL^{-1} ; 4.5 mg.mL^{-1} and 6.0 mg.mL^{-1}) of vanillin 0.05 mg.mL^{-1} (dissolved in bottom phase) in recovery index of vanillin - top phase using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K_2HPO_4 + 35 wt% water at $298.15 \pm 1 \text{ K}$ and 0.1 MPa operated in semi-continuous mode. Agitation speed of 60 rpm.

Disperse flux rate (mL.min^{-1})	Time (min)	$C_{(\text{van})\text{T}}$ (mg.mL^{-1})	$C_{(\text{van})\text{B}}$ (mg.mL^{-1})	$\text{IR}_{(\text{van})\text{T}}$	$\text{K}_{(\text{van})}$
4.5	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.0167	0.0000	1.00	-
	4	0.0167	0.0000	1.00	477.82
	6	0.0167	0.0002	1.00	93.43
	8	0.0167	0.0002	1.00	72.12
	10	0.0166	0.0004	0.99	41.61
	12	0.0166	0.0005	0.99	33.58
	14	0.0166	0.0005	0.99	30.72
	16	0.0165	0.0006	0.99	25.94
	18	0.0165	0.0006	0.99	25.94
	20	0.0165	0.0007	0.99	23.82
	21	0.0165	0.0007	0.99	23.34
6.0	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.0152	0.0000	1.00	-
	4	0.0152	0.0000	1.00	-
	6	0.0152	0.0000	1.00	-
	8	0.0152	0.0000	1.00	-
	10	0.0152	0.0000	1.00	-
	12	0.0152	0.0000	1.00	-
	14	0.0152	0.0000	1.00	-
	16	0.0152	0.0000	1.00	-
	17	0.0152	0.0000	1.00	-

Table S6. Effect of volumetric flow rate (1.5 mg.mL⁻¹; 3.0 mg.mL⁻¹; 4.5 mg.mL⁻¹ and 6.0 mg.mL⁻¹) of 0.02 mg.mL⁻¹ ascorbic acid (dissolved in top phase) in recovery index of ascorbic acid - bottom phase using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa operated in semi-continuous mode. Agitation speed of 60 rpm.

Disperse flux rate (mL.min ⁻¹)	Time (min)	C _{(AA)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(AA)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(AA)B}	K _(AA)
1.5	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	5	0.0108	0.0125	0.21	0.86
	15	0.0104	0.0140	0.24	0.74
	25	0.0103	0.0145	0.25	0.71
	35	0.0102	0.0149	0.25	0.69
	50	0.0101	0.0157	0.27	0.64
	65	0.0101	0.0156	0.26	0.65
	85	0.0099	0.0162	0.27	0.61
	115	0.0098	0.0166	0.28	0.59
	145	0.0098	0.0169	0.29	0.58
	185	0.0098	0.0169	0.29	0.58
	225	0.0097	0.0173	0.29	0.56
	238	0.0095	0.0180	0.31	0.53
3.0	0	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	5	0.0094	0.0099	0.81	0.95
	10	0.0090	0.0115	0.78	0.79
	15	0.0087	0.0127	0.75	0.69
	20	0.0083	0.0146	0.72	0.57
	30	0.0083	0.0149	0.71	0.56
	40	0.0083	0.0145	0.72	0.57
	50	0.0083	0.0146	0.71	0.57
	65	0.0083	0.0149	0.71	0.56
	75	0.0081	0.0156	0.70	0.52
	85	0.0080	0.0161	0.68	0.49
	95	0.0080	0.0162	0.68	0.49
	110	0.0079	0.0164	0.68	0.48
	114	0.0079	0.0162	0.68	0.49

Table S6 (cont). Effect of volumetric flow rate (1.5 mg.mL^{-1} ; 3.0 mg.mL^{-1} ; 4.5 mg.mL^{-1} and 6.0 mg.mL^{-1}) of 0.02 mg.mL^{-1} ascorbic acid (dissolved in top phase) in recovery index of ascorbic acid - bottom phase using aqueous two-phase system composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K_2HPO_4 + 35 wt% water at $298.15 \pm 1 \text{ K}$ and 0.1 MPa operated in semi-continuous mode. Agitation speed of 60 rpm.

Disperse flux rate (mL.min^{-1})	Time (min)	$C_{(\text{AA})\text{T}}$ (mg.mL^{-1})	$C_{(\text{AA})\text{B}}$ (mg.mL^{-1})	$\text{IR}_{(\text{AA})\text{B}}$	$K_{(\text{AA})}$
4.5	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.01190	0.00269	0.05	4.42
	4	0.0112	0.0057	0.10	1.97
	7	0.0107	0.0079	0.14	1.35
	13	0.0107	0.0078	0.14	1.37
	20	0.0106	0.0085	0.16	1.24
	25	0.0106	0.0083	0.15	1.28
	30	0.0106	0.0084	0.15	1.25
	38	0.0103	0.0095	0.17	1.09
	46	0.0101	0.0106	0.19	0.96
	54	0.0101	0.0107	0.20	0.94
	64	0.0093	0.0141	0.26	0.66
	74	0.0089	0.0157	0.29	0.57
	81	0.0086	0.0170	0.31	0.51
6.0	0	0.0000	0.0000	0.00	-
	2	0.0131	0.0009	0.01	15.17
	4	0.0124	0.0040	0.07	3.07
	6	0.0117	0.0071	0.12	1.64
	10	0.0110	0.0101	0.17	1.09
	14	0.0107	0.0114	0.19	0.94
	18	0.0105	0.0123	0.21	0.85
	24	0.0103	0.0132	0.22	0.78
	30	0.0101	0.0142	0.24	0.71
	36	0.0098	0.0154	0.26	0.64
	42	0.0096	0.0162	0.27	0.59
	48	0.0095	0.0169	0.29	0.56
	56	0.0090	0.0192	0.33	0.47

Table S7. Recovery index of vanillin in the top phase, partition coefficient vanillin, and selectivity using aqueous two-phase system (Protocol 3 – continuous mode) composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 60 rpm, 6.0 mL.min⁻¹, 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa.

Time (min)	C_{(van)T} (mg.mL⁻¹)	C_{(van)B} (mg.mL⁻¹)	IR_{(van)T}	K_(van)	S
0	0.0000	0.0000	0.00	-	-
1	0.0158	0.0003	0.99	47.16	-
3	0.0158	0.0004	0.99	41.50	-
4	0.0158	0.0003	0.99	46.19	-
5	0.0158	0.0004	0.99	37.36	-
7	0.0158	0.0006	0.99	26.35	0.36
9	0.0157	0.0007	0.99	21.20	0.55
11	0.0157	0.0008	0.99	19.01	0.69
13	0.0157	0.0009	0.98	17.86	0.95
15	0.0157	0.0010	0.98	15.87	1.08
20	0.0156	0.0011	0.98	14.27	1.97
25	0.0157	0.0008	0.99	19.10	4.39
30	0.0158	0.0007	0.99	24.07	7.21
35	0.0159	0.0001	1.00	239.46	92.20
45	0.0159	0.0000	1.00	-	-
55	0.0159	0.0000	1.00	-	-

Table S8. Recovery index of ascorbic acid in the bottom phase, partition coefficient of ascorbic acid, and selectivity using aqueous two-phase system (Protocol 3 – continuous mode) composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 60 rpm, 6.0 mL.min⁻¹, 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa.

Time (min)	C _{(AA)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(AA)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(AA)B}	K _(AA)	S
0	0.0000	0.0000	0.00	-	-
1	0.0166	0.0000	0.00	-	-
3	0.0166	0.0000	0.00	-	-
4	0.0166	0.0000	0.00	-	-
5	0.0166	0.0000	0.00	-	-
7	0.0166	0.0002	0.00	74.17	0.36
9	0.0165	0.0004	0.01	38.73	0.55
11	0.0165	0.0006	0.01	27.66	0.69
13	0.0164	0.0009	0.01	18.75	0.95
15	0.0164	0.0011	0.02	14.70	1.08
20	0.0161	0.0022	0.03	7.24	1.97
25	0.0157	0.0036	0.05	4.35	4.39
30	0.0155	0.0046	0.07	3.34	7.21
35	0.0152	0.0058	0.09	2.60	92.20
45	0.0147	0.0077	0.12	1.91	-
55	0.0145	0.0087	0.13	1.67	-

Table S9. Recovery index of vanillin in the top phase from Pudim Diet Dr. Oetker, partition coefficient of vanillin, and selectivity using aqueous two-phase system (Protocol 4 – semi-continuous mode) composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 60 rpm, 6.0 mL.min⁻¹, 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa.

Time (min)	C _{(van)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(van)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(van)T}	K _(van)	S
0.0	0.0000	0.0000	0.00	-	-
1.0	0.0027	0.0000	1.00	-	-
3.0	0.0025	0.0008	0.95	3.21	1.84
4.0	0.0024	0.0013	0.91	1.92	2.64
5.0	0.0023	0.0020	0.86	1.16	2.95
6.0	0.0022	0.0026	0.82	0.86	3.10
7.5	0.0021	0.0032	0.78	0.64	3.56
9.0	0.0018	0.0044	0.70	0.42	3.49
11.0	0.0018	0.0048	0.67	0.37	5.99
13.0	0.0017	0.0051	0.65	0.34	9.80
14.5	0.0016	0.0055	0.62	0.30	11.87

Table S10. Recovery index of ascorbic acid in the bottom phase from Pudim Diet Dr. Oetker, partition coefficient of ascorbic acid, and selectivity using aqueous two-phase system (Protocol 4 – semi-continuous mode) composed by 50 wt% ethanol + 15 wt% K₂HPO₄ + 35 wt% water at 60 rpm, 6.0 mL.min⁻¹, 298.15 ± 1 K and 0.1 MPa.

Time (min)	C _{(AA)T} (mg.mL ⁻¹)	C _{(AA)B} (mg.mL ⁻¹)	IR _{(AA)B}	K _(AA)	S
0.0	0.0000	0.0000	0.00	-	-
1.0	0.0011	0.0000	0.00	-	-
3.0	0.0011	0.0006	0.04	1.74	1.84
4.0	0.0010	0.0014	0.09	0.73	2.64
5.0	0.0010	0.0024	0.16	0.39	2.95
6.0	0.0009	0.0033	0.21	0.28	3.10
7.5	0.0008	0.0045	0.29	0.18	3.56
9.0	0.0007	0.0059	0.38	0.12	3.49
11.0	0.0005	0.0084	0.55	0.06	5.99
13.0	0.0004	0.0106	0.68	0.03	9.80
14.5	0.0003	0.0115	0.75	0.03	11.87

6. CONCLUSÕES

Existe uma tendência industrial para que maiores quantidades de processos operem de forma contínua o que pode majorar a eficiência e reduzir os custos operacionais. No entanto, para que a conversão da operação em batelada para contínua seja bem-sucedida é necessário determinar a influência dos parâmetros que norteiam a operação contínua como por exemplo, geometria do reator, vazão, velocidade de agitação e temperatura, os quais quando ajustadas corretamente podem maximizar os rendimentos dos processos.

Nesse sentido, o projeto, construção e montagem do reator proposto permitiu o estudo da recuperação de duas biomoléculas distintas, ácido ascórbico e vanilina, através de SAB contínuos analisando a interferência da vazão volumétrica e da velocidade de agitação dos impelidores. Mostrou-se que esses dois parâmetros possuem pouca influência no índice de recuperação da vanilina em função da relação volumétrica entre as fases. Entretanto a elevação vazão volumétrica e a redução da velocidade de agitação proporcionou um aumento significativo da recuperabilidade do ácido ascórbico.

Vale ressaltar que, apesar do sucesso da recuperação das biomoléculas nos processos contínuo e semi-contínuo, este último mostrou-se mais efetivo na partição e seletividade das biomoléculas nas condições operacionais utilizadas 60 rpm e 6,0 mL.min⁻¹. Por fim, o projeto do reator mostrou-se favorável a recuperação simultânea das biomoléculas, utilizando resíduos alimentícios (Pudim Diet), em diferentes fases com a vanilina sendo preferencialmente concentrada na fase rica em álcool, enquanto o ácido ascórbico tem uma tendência a migrar para a fase rica em sal.

Neste contexto, o sistema aquoso bifásico formado por 50% m/m etanol + 15% m/m K₂HPO₄ + 35% m/m de água a 298,15 ± 1 K e 0,1 MPa realizado em um reator de coluna com 3 rotores (4 lâminas verticais) pode ser considerado como um procedimento de extração inovador e alternativo para a recuperação de compostos de valor agregado de diversas matérias-primas industriais ou efluentes e os resultados obtidos neste trabalho podem ser utilizados em estudo de processo em escalas maiores.

7. TRABALHOS SUBMETIDOS



Aplicação de SAB Contínuo para Recuperação de Ácido L-Ascórbico

Alex V. Veloso^(a), Brenda C. S. Amaral^(a), Ranyere L. Souza^(a,b), Cleide Mara F. Soares^(a,b),
Álvaro S. Lima^(a,b)

^(a) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brasil

^(b) Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300, CEP: 49032-490, Aracaju-SE Brasil



ECCE12

The 12th EUROPEAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING

Florence 15-19 September 2019

Selective Partition of Added Value Compounds from Food Residues using Semi-Continuous Aqueous Two-Phase System

Alex V. Veloso¹, Brenda C. Silva¹, Sthefany A. Bomfim¹, Ranyere L. Souza^{1,2}, Cleide M.F. Soares^{1,2}, Álvaro S. Lima^{1,2,*}

¹ Tiradentes University. Av. Murilo Dantas 300, Aracaju-Sergipe, Brasil; ² Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas 300 Prédio do ITP, Aracaju-Sergipe, Brasil

*Corresponding author: aslima2001@yahoo.com.br

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, L. A. P. *et al.* Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)-sodium polyacrylate system for amyloglucosidase purification: Equilibrium diagrams and partitioning studies. *Separation and Purification Technology*, v. 118, p. 888–894, 2013.

ALMEIDA, M. R. *et al.* Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, v. 128, p. 1–10, 2014.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 350, p. 103–108, 1996.

ARRIGONI, O.; DE TULLIO, M. C. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1569, n. 1–3, p. 1–9, 2002.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 8826–8835, 2011.

BARBERO, G. F. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, v. 75, p. 1332–1337, 2008.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Bioprocess intensification: A potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 807, p. 33–38, 2004.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M.; ASENJO, J. A. Aqueous Two-Phase Systems. *Comprehensive Biotechnology*, v. 1, p. 697–713, 2011.

BERNARDO, A. F.; GRANJO, P. F. *Portal de Engenharia Química - Fundamentos*. Disponível em: <http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=63&Itemid=148>. Acesso em: 17 out. 2017.

CARDOSO, G. D. B. *et al.* Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin. *Separation and Purification Technology*, v. 104, p. 106–113, 2013.

CARDOSO, G. DE B. *et al.* Novel aqueous two-phase systems composed of acetonitrile and polyols: Phase diagrams and extractive performance. *Separation and Purification Technology*, v. 124, p. 54–60, 2014.

CARDOSO, G. DE B. *et al.* Poly(vinyl alcohol) as a novel constituent to form aqueous two-phase systems with acetonitrile: Phase diagrams and partitioning experiments. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 94, p. 317–323, 2015.

CAVALCANTI, M. T. H. *et al.* Continuous extraction of α -toxin from a fermented broth of *Clostridium perfringens* Type A in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase PEG-phosphate system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 47, p. 1771–1776, 2008.

- CERESANA. Market Study: Antioxidants. *Ceresana Market Intelligence Consulting*, p. 225, 2013.
- CHANG, S. K.; ISMAIL, A.; DAUD, Z. A. M. Ascorbic Acid: Properties, Determination and Uses. *Encyclopedia of Food and Health*, p. 275–284, 2016.
- CHEMAT, F. *et al.* Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 41, p. 357–377, 2017.
- CHEMSPIDER. *ChemSpider - The free chemical database*. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>.
- CHEN, Y. *et al.* A green separation strategy for neodymium (III) from cobalt (II) and nickel (II) using an ionic liquid-based aqueous two-phase system. *Talanta*, v. 182, p. 450–455, 2018.
- CLÁUDIO, A. F. M. *et al.* Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, v. 75, p. 39–47, 2010.
- CROUGHAN, M. S.; KONSTANTINOV, K. B.; COONEY, C. The future of industrial bioprocessing: Batch or continuous? *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, p. 648–651, 2015.
- EKEZIE, F. G. C.; SUN, D. W.; CHENG, J. H. Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. *Trends in Food Science and Technology*, v. 67, p. 160–172, 2017.
- ESPITIA-SALOMA, E. *et al.* Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products. *Food and Bioprocesses Processing*, v. 92, p. 101–112, 2014.
- ESPOSITO, L. J. *et al.* Vanillin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2000.
- FARIAS, F. O. *et al.* Study of the pseudo-ternary aqueous two-phase systems of deep eutectic solvent (choline chloride:sugars) + K₂HPO₄ + water. *Fluid Phase Equilibria*, v. 448, p. 143–151, 2017.
- FIGUEIREDO PORTO, A. L. *et al.*, Recovery of ascorbic oxidoreductase from crude extract with an aqueous two-phase system in a perforated rotating disc contactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, p. 821–826, 2004.
- FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, É. T. G. A Importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos. *Química Nova na Escola*, v. 17, p. 3–7, 2003.
- GARZA-MADRID, M. *et al.*, Potential of Aqueous Two-Phase Systems constructed on flexible devices: Human serum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1082–1087, 2010.
- GREISLER, H. P. Biomolecules. *WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research*, p. 41–60, 2003.
- GUO, X. *et al.* Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Rhododendron aganniphum*: Antioxidant activity and rheological properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 38, p. 246–255, 2017.
- GUSTAVSSON, J. *et al.* Global Food Losses and Food Waste: Extente, Causes And Prevention. *FAO*, 2011.
- HANCOCK, R. D. Recent patents on vitamin C: opportunities for crop improvement and single-step biological manufacture. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, v. 1, n. 1, p. 39–49, 2009.
- HESPAANHOL, M. C. S. *et al.* Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. *Quim. Nova*, v. 29, p. 1332–1339, 2006.

- JADHAV, D. *et al.* Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, v. 93, p. 421–426, 2009.
- JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*, v. 31, p. 479–492, 2013.
- KAYGORODOV, K. L. *et al.* Extraction of Vanillin by Aliphatic Alcohols. *Journal of Siberian Federal University*, v. 3, p. 228–233, 2010.
- KMPS. *Liquid-Liquid Extraction Column Types - Agitated and Static*. Disponível em: <<https://kochmodular.com/liquid-liquid-extraction/extraction-column-types/>>. Acesso em: 17 out. 2017.
- LIMA, Á. S.; SANTANA, C. C. Processos de Extração e Purificação de Biomoléculas - EDUNIT. p. 216, 2017.
- LOMASCOLO, A. *et al.* Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends in Biotechnology*, v. 17, p. 282–289, 1999.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA AYUSO, L. E. Environmental Applications | Soxhlet Extraction. *Encyclopedia of Separation Science*, p. 2701–2709, 2000.
- LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2383–2389, 2010.
- MANNERS, M. *Vanilla planifolia Images - Useful Tropical Plants*. Disponível em: <<http://tropical.theferns.info/image.php?id=Vanilla+planifolia>>. Acesso em: 25 abr. 2018.
- MAY, A. *et al.* Baunilha. *Instituto Agrônomo - IAC*, 2006.
- MUKHOPADHYAY, A. K. Industrial chemical cresols and downstream derivatives. p. 202, 2005.
- NOUBIGH, A.; MGAIDI, A.; ABDERRABBA, M. Temperature effect on the distribution of some phenolic compounds: An experimental measurement of 1-octanol/water partition coefficients. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 55, p. 488–491, 2010.
- OLSZOWY, P.; BURNS, A.; CIBOROWSKI, P. Biomolecules. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, p. 7–24, 2013.
- OOI, C. W. *et al.* Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1083–1087, 2009.
- PACHECO, S. M. V.; DAMASIO, F. Vanilina: Origem, Propriedades e Produção. *Química Nova na Escola*, v. 32, p. 215–219, 2010.
- PANIWNYK, L. Application of Ultrasound. *Emerging Technologies for Food Processing*, p. 271–291, 2014.
- PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 4487–4490, 1998.
- PLÓTKA-WASYLKA, J. *et al.* Extraction with environmentally friendly solvents. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 91, p. 12–25, 2017.
- RABIEENEZHAD, A.; ROOSTA, A. Experimental study and thermodynamic modelling of penicillin-G extraction using PEG 6000 and K₂HPO₄ aqueous two-phase system. *Journal of Chemical*

Thermodynamics, v. 120, p. 54–59, 2018.

RAGHAVARAO, K. S. M. S. *et al.* Aqueous two phase extraction?an environmentally benign technique. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 5, p. 136–141, 2003.

RAJA, S. *et al.* Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. *Science and Technology*, v. 1, p. 7–16, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, v. 29, p. 755–760, 2006.

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

REIS, I. A. O. *et al.* Extraction and Recovery of Rutin from Acerola Waste using Alcohol-Salt-Based Aqueous Two-Phase Systems. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, v. 49, p. 656–663, 2014.

RITO-PALOMARES, M. Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products. p. 196, 2017.

ROSA, P. A. J. *et al.* Continuous aqueous two-phase extraction of human antibodies using a packed column. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 880, p. 148–156, 2012.

SCHYVENS, C. Antioxidants. *Encyclopedia of Food Safety*, v. 53, p. 455–458, 2014.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, v. 82, p. 291–295, 1997.

SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, v. 29, p. 1345–1351, 2006.

SINHA, A. K.; SHARMA, U. K.; SHARMA, N. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 59, p. 299–326, 2008.

SMALLWOOD, I. M. Handbook of organic solvent properties. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, v. 17, p. 177, 1997.

SOARES, R. R. G. *et al.* Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Biotechnology Journal*, v. 10, p. 1158–1169, 2015.

SONG, C. P. *et al.* Effect of salt-based adjuvant on partition behaviour of protein in aqueous two-phase systems composed of polypropylene glycol and cholinium glycinate. *Separation and Purification Technology*, v. 196, p. 281–286, 2018.

STANNER, S.; WEICHSELBAUM, E. Antioxidants. *Encyclopedia of Human Nutrition*, p. 450, 2013.

TAI, A. *et al.* Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1810, p. 170–177, 2011.

TETALA, K. K. R.; VIJAYALAKSHMI, M. A. A review on recent developments for biomolecule separation at analytical scale using microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta*, v. 906, p. 7–21, 2016.

VÁZQUEZ-VILLEGAS, P.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Continuous enzyme aqueous

two-phase extraction using a novel tubular mixer-settler in multi-step counter-current arrangement. *Separation and Purification Technology*, v. 141, p. 263–268, 2015.

VIDAL, J.-P.; VIDAL; JEAN-PAUL. Vanillin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2006.

WYPYCH, G. *Handbook of solvents*. 2. ed. Toronto: ChemTec, 2014.

YARDIM-AKAYDIN, S. *et al.* The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta*, v. 338, p. 99–105, 2003.

ZYDNEY, A. L. Continuous downstream processing for high value biological products: A Review. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 113, p. 465–475, 2016.