



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**  
**CAMPUS JUVINO OLIVEIRA**

**ESTUDO DO EQUILÍBRIO DE FASES E PARTIÇÃO DA  $\alpha$ -**  
**LACTOALBUMINA E LISOZIMA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**  
**COMPOSTOS POR LÍQUIDO IÔNICO, SAL E ÁGUA**

**MICHELLE COSTA PIGNATA**

**ITAPETINGA – BA**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**ESTUDO DO EQUILÍBRIO DE FASES E PARTIÇÃO DA  $\alpha$ -**  
**LACTOALBUMINA E LISOZIMA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**  
**COMPOSTOS POR LÍQUIDO IÔNICO, SAL E ÁGUA**

**MICHELLE COSTA PIGNATA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

**Orientadora:**

Prof<sup>ª</sup>. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

**Co-Orientadoras:**

Prof<sup>ª</sup>. DSc. Cristiane Martins Veloso

Prof<sup>ª</sup>. DSc. Rita de Cássia Superbi Sousa

**ITAPETINGA – BA**

**2014**

664.022 Pignata, Michelle Costa.

P684e

Estudo do equilíbrio de fases e partição da  $\alpha$ -lactoalbumina e lisozima em sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, sal e água. / Michelle Costa Pignata. - Itapetinga: UESB, 2014. 64f.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – *Campus* Itapetinga, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”. Sob a orientação da Profa. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e co-orientação da Profa. D.Sc. Cristiane Martins Veloso e Profa. D.Sc. Rita de Cássia Superbi Sousa.

1. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) - Diagrama de fases. 2. Extração líquido-líquido. 3. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) – Temperatura - pH. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Veloso, Cristiane Martins. IV. Sousa, Rita de Cássia Superbi. V. Título.

**CDD(21): 664.22**

### **Catálogo na fonte:**

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) - Diagrama de fases
2. Extração líquido-líquido
3. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) – Temperatura - pH



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Campus de Itapetinga-BA

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “ESTUDO DO EQUILÍBRIO DE FASES E PARTIÇÃO DA  $\alpha$ -LACTOALBUMINA E LISOZIMA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR LÍQUIDO IÔNICO, SAL E ÁGUA.”

**Autor:** MICHELLE COSTA PIGNATA

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. RENATA CRISTINA FERREIRA BONOMO, DSc., UESB

**Co-Orientador:** Prof<sup>a</sup>. CRISTIANE MARTINS VELOSO, DSc., UESB

Prof<sup>a</sup>. RITA DE CÁSSIA SUPERBI DE SOUSA, DSc., UFV

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, pela Banca Examinadora.

  
Prof<sup>a</sup>. Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB

  
Prof. Rafael da Costa Ilhéu Fontan, DSc., UESB

  
Prof<sup>a</sup>. Milena Duarte Lima, DSc., UESB

Data da Realização: 27 de Fevereiro de 2014.

*Aos meus amados pais, Maria José e Carlos, às minhas irmãs Marielle e Mirelle e à minha avó Maria Isabel, que sempre torceram pela realização dos meus ideais.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e por ter me concedido à graça de estar completando mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais, Maria José e Carlos, pelo carinho, incentivo, educação, formação e amor incondicional. A minha avó Beca pelo amor dedicado em todos os momentos da minha vida e por suas orações. A Marielle e Mirelle, minhas irmãs, pela amizade, amor, carinho e companheirismo. Ao meu sobrinho Tales pelos momentos de alegria.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Renata Bonomo pela orientação, ensinamentos, confiança, paciência e motivação.

Ao Professor Rafael Fontan, pelo ensinamento e contribuições durante a realização do trabalho.

Ao Professor Leandro Soares, pelo incentivo, motivação, preocupação e amizade.

Às co-orientadoras, Prof<sup>ª</sup> Cristiane Veloso e Rita Superbi pelas contribuições e ensinamentos.

Aos professores, Vanessa Sampaio e Evaldo Cardoso pela colaboração e conhecimento.

Às amigas, Cris, Marina, Jamile, Ellen e Juliane pela amizade, carinho, confiança e por tornarem meus dias mais alegres.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP), Gleiza, Melquesedek, Elys, Juliana, Daniel, Lucas, Olga e Gabriel pelos agradáveis momentos proporcionados e conhecimentos compartilhados.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela oportunidade e condições de realização do trabalho.

À FAPESB, pela bolsa concedida.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!

*“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão... que o amor existe que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim... e que vale a pena”!*

*(Mário Quintana)*

## RESUMO

PIGNATA, M.C. **Estudo do equilíbrio de fases e partição da  $\alpha$ -lactoalbumina e lisozima em sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, sal e água.** Itapetinga – BA: UESB, 2014. 64p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).\*

Em tempos de avanços da biotecnologia, o desenvolvimento de novos e biocompatíveis métodos de extração, para a separação e purificação de enzimas e proteínas, vem ganhando importância crescente. Um método eficaz para a separação e purificação de biomoléculas é a sua partição em Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's), que são formados a partir da mistura em água de dois solutos de espécies quimicamente distintas em concentrações além das definidas pela zona de transição das fases, sob certas condições de composição e temperatura. Foram obtidos dados de equilíbrio de sistemas compostos por líquido iônico (cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio) + fosfato de potássio + água, em pH 7,5, 8,0 e 8,5 e nas temperaturas de (20, 30, 40 e 50) °C, além dos coeficientes de partição para a lisozima e  $\alpha$ -lactoalbumina nos mesmos. Verificou-se que não houve efeito da temperatura sobre a formação da região bifásica para os sistemas estudados. Houve um aumento na inclinação das linhas de amarração à medida que a temperatura diminuiu, podendo-se dizer que ocorreu a transferência de moléculas de água da fase superior para a fase inferior. Verificou-se também que o aumento do pH ocasionou um aumento da região bifásica em todas as temperaturas estudadas. O coeficiente de partição de lisozima diminuiu de 12,31 para 2,12 com o aumento da temperatura, já o coeficiente de partição de  $\alpha$ -lactoalbumina aumentou de 2,76 para 18,75 com o aumento da temperatura nas condições de temperatura e pH avaliadas neste trabalho. Os sistemas aquosos bifásicos analisados neste trabalho podem ser uma alternativa para a partição das proteínas lisozima e  $\alpha$ -lactoalbumina, que migraram preferencialmente para a fase superior, rica em líquido iônico.

Palavras-chave: extração líquido-líquido, diagrama de fases, temperatura, pH

---

\*Orientadora: Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB e Co-orientadoras: Cristiane Martins Veloso, DSc., UESB; Rita de Cássia Superbi Sousa, DSc., UFV.

## ABSTRACT

PIGNATA, M. C. **Study of the phase equilibria and partition of  $\alpha$ -lactalbumin and lysozyme in aqueous two-phase systems composed of ionic liquid, salt and water.** Itapetinga – BA: UESB, 2014, 64p. (Dissertation – Masters in Engineering and Food Science).\*

In times of advances of biotechnology, the development of new and biocompatible extraction methods, for the separation and purification of enzymes and proteins, is gaining increasing importance. An effective method for the separation and purification of biomolecules is their partition systems aqueous biphasic (ATPS), which are formed from the mixture of two solutes in water of species chemically distinct in concentrations than those defined by the transition zone phases, under certain conditions of temperature and composition. Were obtained equilibrium data for systems composed by ionic liquid (1-ethyl-3-methylimidazolium chloride) + water + potassium phosphate at pH 7,5, 8,0 and 8,5 and at temperatures (20, 30, 40 and 50 ) °C, besides the partition coefficient for lysozyme and  $\alpha$ -lactalbumin in the same. It was found that there was no effect of temperature on the formation of biphasic region for the systems studied. There was an increase in the slope of tie lines as the temperature decreased, it can be said that the transfer of water molecules from the top to the bottom phase. It was also found that the increase in pH caused a biphasic increase in area at all temperatures studied. The partition coefficient of lysozyme decreased from 12,31 to 2,12 with increasing temperature, since the ratio of  $\alpha$ -lactalbumin partition increased from 2,76 to 18,75 with increasing temperature in the temperature and pH conditions evaluated in this study. The aqueous two-phase systems analyzed in this work can be an alternative to the partition of lysozyme and  $\alpha$ -lactalbumin protein, which preferentially migrated to the upper phase rich in ionic liquid.

Keywords: liquid – liquid extraction, phase diagram, temperature, pH

---

\*Adviser: Renata Cristina Ferreira Bonomo, DSc., UESB e Co-advisers: Cristiane Martins Veloso, DSc., UESB; Rita de Cássia Superbi Sousa, DSc., UFV.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Nomes e abreviações dos ânions presentes em LI .....	28
<b>Tabela 2.</b> SAB's formados por LI e sal utilizados na separação de biomoléculas ...	29
<b>Tabela 3.</b> Composições globais para os sistemas formados por LI {[C <sub>2</sub> min]Cl} + Sulfato de Potássio + Água, expressas em porcentagem mássica (%m/m) .....	33
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , e <i>d</i> e o coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> ) obtidos para o sistemas LI-Fosfato de potássio a partir da equação de Hu et al. (2003) .....	38
<b>Tabela 5.</b> Dados das linhas de amarrações e porcentagem mássica (%m/m) dos sistemas formados por LI {[C <sub>2</sub> min]Cl} (W <sub>1</sub> ) + Fosfato de Potássio (W <sub>2</sub> ) + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.....	43
<b>Tabela 6.</b> Massa específica para os sistemas formados por LI {[C <sub>2</sub> min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.....	47
<b>Tabela 7.</b> Coeficientes de partição e recuperação teórica da lisozima e CLA nos sistemas formados por LI {[C <sub>2</sub> min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, em diferentes valores de pH e temperatura. ....	48
<b>Tabela 8.</b> Coeficientes de partição e recuperação teórica da α-lactoalbumina e CLA nos sistemas formados por LI {[C <sub>2</sub> min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.....	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares .....	22
<b>Figura 2.</b> Estruturas de cátions de LI's (R, R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> e R <sub>4</sub> = cadeias alquílicas).....	27
<b>Figura 3.</b> Diagrama de fases [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio em pH 7,5 para diferentes temperaturas. ....	37
<b>Figura 4.</b> Diagrama de fases [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio em pH 8,0 para diferentes temperaturas. ....	38
<b>Figura 5.</b> Diagrama de fases [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio em pH 8,5 para diferentes temperaturas. ....	38
<b>Figura 6.</b> Diagrama de fases [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio a 20 °C para diferentes valores de pHs.....	39
<b>Figura 7.</b> Diagrama de fases [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio a 30 °C para diferentes valores de pHs.....	39
<b>Figura 8.</b> Diagrama de fases [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio a 40 °C para diferentes valores de pHs.....	40
<b>Figura 9.</b> Diagrama de fases [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio a 50 °C para diferentes valores de pHs.....	41
<b>Figura 10.</b> Efeito da temperatura na composição das fases em equilíbrio dos sistemas LI-Fosfato, em pH 7,5.....	44
<b>Figura 11.</b> Efeito da temperatura na composição das fases em equilíbrio dos sistemas LI-Fosfato, em pH 8,0.....	45
<b>Figura 12.</b> Efeito da temperatura na composição das fases em equilíbrio dos sistemas LI-Fosfato, em pH 8,5.....	45
<b>Figura 13.</b> Efeito do pH na composição das fases em equilíbrio dos sistemas LI-Fosfato. (a) 20 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C e (d) 50 °C.....	46
<b>Figura 14.</b> Distribuição da eficiência de extração teórica da lisozima em função do coeficiente de partição.....	49
<b>Figura 15.</b> Distribuição da eficiência de extração teórica da α-la em função do coeficiente de partição.....	49
<b>Figura 16.</b> Distribuição dos coeficientes de partição da lisozima nos SAB formados por [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio, em diferentes temperaturas .....	51
<b>Figura 17.</b> Distribuição dos coeficientes de partição da α-la nos SAB formados por [C <sub>2</sub> min]Cl-Fosfato de potássio, em diferentes temperaturas .....	52

**Figura 18.** Influência do comprimento da linha de amarração e do pH no coeficiente de partição da lisozima. (a) 20 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C e (d) 50 °C.....54

**Figura 19.** Influência do comprimento da linha de amarração e do pH no coeficiente de partição da  $\alpha$ -la. (a) 20 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C e (d) 50 °C.....55

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$[\Delta LI]$	Diferença de concentração de LI entre as fases superior e inferior, %(m/m)
$[\Delta SAL]$	Diferença de concentração de sal entre as fases superior e inferior, %(m/m)
$[C]_{inf}$	Concentração de Equilíbrio da Proteína Particionada na Fase Inferior
$[C]_{sup}$	Concentração de Equilíbrio da Proteína Particionada na Fase Superior
$[C_2min]Cl$	Cloreto de 1-Etil-3-metilimidazólio
CLA	Comprimento da Linha de Amarração
ELL	Extração Líquido-Líquido
ILA	Inclinação da Linha de Amarração
K	Coefficiente de partição
LA	Linha de Amarração
LI	Líquido Iônico
Pc	Ponto crítico
PEG	Polietileno Glicol
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
SAB	Sistema Aquoso Bifásico
Y <sub>sup</sub>	Recuperação teórica da proteína na fase superior
$\alpha$ -la	Alfa-lactoalbumina
g	Força centrífuga
$\rho$	Massa específica

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. Extração Líquido-Líquido.....	19
3.2. Sistemas Aquosos Bifásicos .....	19
3.2.1. Diagrama de Equilíbrio de Fases .....	21
3.2.2. Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB.....	24
3.2.2.1. Potencial Hidrogeniônico (pH).....	24
3.2.2.2. Temperatura.....	25
3.2.3. Coeficiente de Partição .....	25
3.2.4. Constituintes das Fases .....	26
3.2.4.1. Líquido Iônico .....	26
3.2.4.2. Sal.....	28
3.2.5. Aplicação dos Sistemas Aquosos Bifásicos LI-Sal na Separação de Proteínas.....	28
3.3. Propriedades Termodinâmicas.....	29
3.4. Alfa-lactoalbumina .....	30
3.5. Lisozima.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	32
4.1. Material.....	32
4.2. Determinação dos Dados de Equilíbrio de Fases para o Sistema LI - Fosfato de potássio - Água .....	32
4.2.1. Coleta das Fases .....	34
4.2.2. Quantificação dos Componentes do Sistema .....	34
4.3. Determinação da Massa Específica .....	35
4.4. Partição das Proteínas em SAB .....	35
4.5. Quantificação da Proteína.....	35
4.6. Cálculo do Coeficiente de Partição e da Recuperação Teórica .....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Efeito da Temperatura e do pH nos Diagramas de Equilíbrio.....	37
5.2. Estudo do Comportamento das Linhas de Amarração.....	41
5.1. Massa Específica.....	46
5.2. Partição das Proteínas e Recuperação Teórica .....	48
5.2.1. Influência da Temperatura e do pH na Partição das Proteínas.....	50

6.	CONCLUSÃO .....	56
7.	REFERÊNCIAS.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Em tempos de melhoria da biotecnologia, o desenvolvimento de novos e biocompatíveis métodos de extração, para a separação e purificação de enzimas e proteínas, vem ganhando importância crescente. Um método eficaz e economicamente viável para a separação e purificação de biomoléculas é a sua partição através de Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's) (VENTURA et al., 2011). SAB's são formados a partir da mistura de dois solutos em água de espécies quimicamente distintas em concentrações além das definidas pela zona de transição das fases, sob certas condições de composição e temperatura. Solutos se distribuem entre as duas fases, dependendo da sua afinidade relativa por cada uma das fases individuais. Esta técnica é amplamente utilizada na purificação de biomoléculas, onde as suas vantagens incluem a seletividade, baixo custo e adaptabilidade para o processamento contínuo e retenção da atividade biológica dos compostos de interesse (KRONER et al., 1978; SELBER et al, 2001; DREYER et al, 2009; CLÁUDIO et al, 2010). Sistemas poliméricos aquosos de duas fases têm sido usados nas últimas décadas para separação e partição de proteínas, partículas celulares e células (ALBERTSSON, 1986; PESSOA e KILIKIAN, 2005; FARIA et al., 2009). Estes sistemas oferecem condições apropriadas para extração de proteínas devido a grande quantidade de água, e têm a vantagem de distinguir pequenas mudanças na hidrofobicidade da superfície e no tamanho da biomolécula. Os sistemas mais estudados são os formados por polietileno glicol-dextrana (PEG-dextrana) e PEG-Sal. No entanto, a maior parte dos polímeros dos SAB's possuem alta viscosidade (MEI et al, 1995; PERUMALSAMY et al, 2007). Finalmente, estes polímeros de SAB's normalmente formam soluções aquosas opacas, o que poderia interferir com a análise quantitativa e qualitativa dos compostos extraídos.

Alternativamente, os Líquidos Iônicos (LIs), ou sais fundidos formados pela combinação de um cátion assimétrico com um ânion fracamente coordenante, têm sido aplicados em processos de biopurificação e bio-extração em substituição aos polímeros na formação de SAB's, e possuem vantagens, tais como a melhoria da estabilidade de biomoléculas e maior seletividade do produto (WELTON, 1999). Além disso, os SAB's baseados em LI são substancialmente menos viscosos do que os típicos SAB's à base de polímeros (CLÁUDIO et al., 2010; LOUROS et al., 2010).

A maioria dos LIs solúveis em água à temperatura ambiente são eletrólitos indutores do efeito *salting-in* (geralmente conhecido como sais “caotrópicos”), o que

pode levar à formação de uma segunda fase aquosa na presença de sais inorgânicos indutores do efeito *salting-out* (sais “cosmotrópicos”), resultando na formação de SAB’s (GUTOWSKI et al., 2003; NEVES et al., 2009). Em sistemas aquosos compostos de LI, sal inorgânico e água, a força motriz para a separação de fases é a competição entre o LI e o sal pelas moléculas de água. A maior afinidade do sal inorgânico pela água induz a uma migração de água para longe dos íons de LI reduzindo a sua hidratação e a solubilidade (FREIRE et al., 2009; FREIRE et al., 2010).

Para otimizar o emprego dos sistemas aquosos bifásicos na partição de biocompostos é necessário o estudo do comportamento destes sistemas em diferentes composições e em variadas condições de temperatura e pH. Assim, desde 1960 diversos estudos têm sido conduzidos com objetivo de encontrar os SAB’s mais adequados e as melhores condições para a partição e/ou concentração de células animais ou vegetais, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros.

Assim, objetivou-se neste trabalho estudar o comportamento dos sistemas de duas fases constituídos por líquido iônico, fosfato de potássio e água, além de avaliar as condições para sua aplicação na partição das proteínas alfa-lactoalbumina e lisozima. Por serem homólogas e possuírem ponto isoelétrico distintos, essas proteínas foram escolhidas como compostos modelos para ajudar a entender a partição de biomoléculas nos sistemas LI-Sal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar o comportamento dos sistemas aquosos bifásicos constituídos por líquido iônico, fosfato de potássio e água, além de avaliar suas condições para sua aplicação na partição da alfa-lactoalbumina e lisozima.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- I. Determinar dados de equilíbrio dos sistemas compostos por cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio + fosfato de potássio (bibásico + monobásico) + água, nos valores de pH 7,5, 8,0 e 8,5 e nas temperaturas de (20, 30, 40 e 50) °C;
- II. Determinar dados de coeficiente de partição para a alfa-lactoalbumina e lisozima nos sistemas estudados.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Extração Líquido-Líquido**

A extração líquido-líquido (ELL) com solventes orgânicos é uma operação muito utilizada na indústria química como técnica de separação. Ela consiste na separação dos componentes de uma solução líquida pelo contato com outro líquido imiscível, ou parcialmente imiscível. A extração de biocompostos em sistemas de duas fases líquidas imiscíveis constituídas de uma fase aquosa e um solvente orgânico é utilizada há cerca de 60 anos, na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos. Para proteínas e biomoléculas, no entanto, tais sistemas não são adequados devido à sensibilidade desses componentes à desnaturação promovida pelos solventes orgânicos. Alternativamente, proteínas e outros materiais de origem biológica podem ser purificados em sistemas bifásicos constituídos por duas fases aquosas imiscíveis. A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

Uma das principais vantagens do sistema aquoso bifásico é o ambiente aquoso, que oferece condições adequadas à distribuição das biomoléculas, tais como as proteínas, nas fases, sem que ocorram mudanças na sua conformação e consequente perda de atividade biológica (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

#### **3.2. Sistemas Aquosos Bifásicos**

A formação dos SAB's foi descrita pela primeira vez no final do século XIX. Em 1896, Beijerinck, um microbiologista holandês, descobriu que soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, se separavam em duas fases aquosas, sendo a fase mais densa enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, e que a água era o componente majoritário em ambas as fases. Posteriormente, Ostwald e Hertel em 1929, continuaram os estudos sobre esses sistemas e verificaram que amidos provenientes de origens distintas (arroz, milho, etc), isto é, possuindo diferentes frações de amilose e amilopectina, produziam diferentes diagramas de fase. Esses resultados mostravam a grande influência que pequenas variações nas interações intermoleculares têm sobre as composições das fases em equilíbrio. Com o objetivo de verificar uma possível generalidade do fenômeno de separação de fase em sistemas contendo macromoléculas, Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 40, estudaram a miscibilidade de um

grande número de diferentes pares de polímeros, dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Estes autores constataram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, e puderam concluir que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno geral (DA SILVA e LOH, 2006; DIAMOND e HSU, 1992).

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

SAB's comumente empregado, geralmente, são formados por polietileno glicol (PEG) porque esta forma sistemas bifásicos facilmente com sais inorgânicos e polímeros neutros. Na separação das fases, no caso de sistemas poliméricos, as mesmas coexistem em equilíbrio, com cada fase predominantemente contendo água e majoritariamente um dos polímeros. A água misturada com os polímeros pode estabelecer interações não-covalentes com eles. Estas interações aumentam com a massa molar dos polímeros e a separação de fases pode ocorrer em concentrações muito baixas de polímero (BASKIR et al., 1989; WALTER et al., 1985). Por outro lado, a presença de um sal inorgânico em concentrações críticas em um sistema único polímero-água também pode levar à formação de duas fases aquosas distintas, onde a fase inferior é rica em sal inorgânico, enquanto a fase superior é rica em polímero. A separação das fases ocorre mais rapidamente em virtude da maior densidade da fase salina em relação à fase polimérica (SALABAT, 2001).

A separação de fases certamente depende do tipo de sal inorgânico e da respectiva concentração destes (por exemplo, fosfato de potássio, carbonato de potássio, fosfato de sódio e sulfato de sódio são os sais inorgânicos típicos empregados) (WALTER et al., 1985; ALBERTSSON, 1986). Em geral, ambas as fases são compostas por cerca de (40-90)% de água, o que significa que biomoléculas não são facilmente desnaturadas, constituindo, por conseguinte, uma vantagem importante quando o objetivo é extrair proteínas e/ou enzimas (HATTI-KAUL, 2000; LI et al., 2005). O particionamento de uma biomolécula em SAB pode variar dependendo do tamanho da biomolécula, propriedades de superfície, peso molecular, temperatura, pH, carga líquida, entre outros (LIMA et al., 2002).

Para melhorar a eficiência de extração, a substituição dos polímeros comuns por LIs tem sido sugerida como uma alternativa promissora. Polímeros podem ser substituídos diretamente usando LIs hidrofóbicos como uma fase líquida imiscível em meios aquosos (TOMÉ et al., 2010) ou pelo uso de SAB's incorporando LIs hidrofílicos (GUTOWSKI et al., 2003; LOUROS et al., 2010). A segunda abordagem é mais usada porque os SAB's contendo LIs hidrofílicos mostraram-se mais eficazes na extração de biomoléculas (TOMÉ et al., 2010; VENTURA et al., 2009).

Gutowski et al. (2003) foram os primeiros a mostrar que soluções aquosas de LIs à base de nitrogênio podem formar SAB na presença de soluções aquosas de alguns sais inorgânicos, tais como fosfato de potássio. Desde então, foram investigadas as propriedades de equilíbrio de sistemas compostos por LIs, para o desenvolvimento de procedimentos de isolamento e extração específica (LOUROS et al., 2010; FREIRE et al., 2010). Já foi demonstrado que SAB's formados por fosfato de potássio e LIs são extremamente vantajosos para o particionamento de várias biomoléculas, gerando coeficientes de partição maiores do que aqueles obtidos convencionalmente com sais inorgânicos e polímeros ou polímeros e polímeros em SAB's (LOUROS et al., 2010; VENTURA et al., 2009; NEVES et al., 2009).

Esses novos SAB's também têm muitas vantagens oferecidas pelo uso de LIs, tais como baixa viscosidade, pouca formação de emulsão, separação de fases rápida, extração de alta eficiência e suave ambiente biocompatível. Os LIs têm sido explorados, principalmente, para aplicações em síntese (FUKUSHIMA et al., 2003), eletroquímica (ZHAO et al., 2004), catálise (DUPONT et al., 2002; WELTON, 1999), separação cromatográfica (DING et al., 2004; VAHER e KOEL, 2005), processos de extração (LUO et al., 2004; LIU et al., 2005) e análise de espectrometria de massa (MANK et al., 2004).

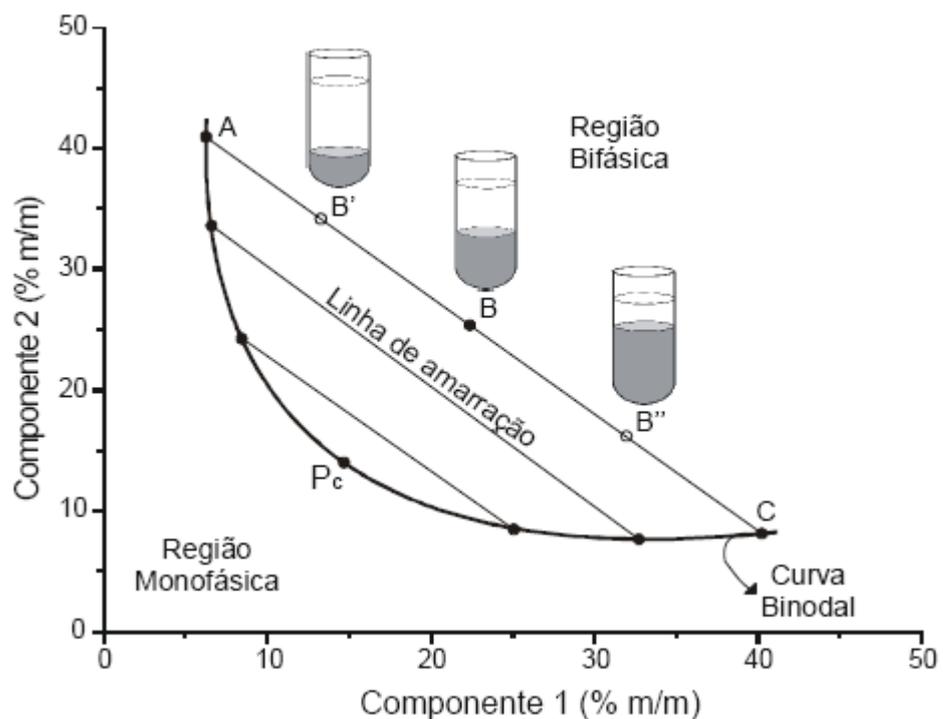
Para que se possa aplicar os sistemas aquosos bifásicos ao estudo de partição de biomoléculas é importante que se conheça previamente seus diagramas de fases. Esses diagramas representam graficamente a composição na qual se formam duas fases líquidas em equilíbrio termodinâmico.

### **3.2.1. Diagrama de Equilíbrio de Fases**

Entende-se como diagrama de equilíbrio uma representação gráfica utilizada para expressar as concentrações de um sistema de fases. Os dados de equilíbrio são representados a temperatura e pressão fixas. Para a utilização de um SAB é necessário o

conhecimento do comportamento das fases no sistema. Para isto são obtidos os diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. A representação gráfica dos dados de composição de fases do SAB é importante para os estudos de separação de biomoléculas, já que são usados como ferramenta básica de ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração (KABIRI-BADR e CABEZAS JR., 1996). Na Figura 1 é apresentado um exemplo de diagrama de fases, mostrando a composição das fases em equilíbrio em coordenadas retangulares.

**Figura 1:** Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.



Fonte: CARVALHO, 2004.

Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A curva que divide a região em duas fases é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio e informa em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo.

As linhas são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração (LA) e ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Um conjunto de pontos que se situa na região bifásica e que esteja em uma mesma linha de amarração

fornece as fases que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.) e as propriedades extensivas diferentes (massa, volume, etc.).

Em sistemas aquosos ternários, a mudança na composição das fases é resultado de uma alteração do ponto de mistura (composição global do sistema); portanto, uma maneira simples de construção de um diagrama de fases é a determinação da composição das fases em equilíbrio para pontos de mistura e linhas de amarração diferentes (ZASLAVSKY, 1995).

Para se estudar a separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência para a composição das fases. O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como CLA, é um valor empírico adequado para a utilização como tal medida. O comprimento da linha de amarração, CLA, é um importante parâmetro termodinâmico, geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição dos solutos em SAB's formados por diferentes componentes e é calculado pela Equação 1:

$$CLA = \sqrt{[\Delta LI]^2 + [\Delta SAL]^2} \quad (1)$$

onde  $[\Delta LI]$  e  $[\Delta SAL]$  correspondem à diferença de concentração de LI e sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa, respectivamente. Com o aumento do valor do parâmetro CLA, aumenta-se a diferença entre a fase superior e a inferior, em termos de propriedades termodinâmicas intensivas, como índice de refração, composição das fases e densidade. Outra característica importante dos diagramas de fases é a inclinação da linha de amarração (ILA). Ela é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade termodinâmica, como a temperatura e a massa molar dos constituintes, por exemplo (CARVALHO, 2004). O valor da inclinação pode ser calculado pela Equação 2:

$$ILA = [\Delta LI] / [\Delta SAL] \quad (2)$$

Outra informação importante obtida a partir de um diagrama de fases é o ponto crítico (Pc), no qual as propriedades termodinâmicas (composição e volume, entre outras) das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986). Quanto mais a

composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases são teoricamente iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas podem provocar mudanças relevantes, como levar o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

### **3.2.2. Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB**

A influência das variáveis na partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificados como variáveis inerentes ao próprio sistema (como tipo e concentração dos constituintes das fases, pH e temperatura) (ALBERTSSON, 1986), ou à proteína alvo (por exemplo: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (COSTA et al., 1998; COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; TUBIO et al., 2004). Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo, mas sabe-se que o coeficiente de partição pode ser resultante de forças de van de Waals, interações hidrofóbicas, interações de hidrogênio, interações entre cargas e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (ALBERTSSON, 1986; GÜNDÜZ e KORKMAZ, 2000).

#### **3.2.2.1. Potencial Hidrogeniônico (pH)**

Em geral, quando se diminui o valor do pH nos sistemas formados por LI-Sal, as concentrações necessárias dos constituintes das fases aumentam, deslocando a curva binodal para a direita. Esse fato pode ser explicado pelo aumento da razão  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , para o caso do fosfato, com a diminuição do pH, pois como o ânion monovalente é menos efetivo no efeito *salting-out* no LI (fenômeno de expulsão devido ao tamanho do LI), será necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico (YU et al., 2011). Em relação à partição de proteínas, o pH vai alterar as cargas da superfície das proteínas. Um exemplo clássico é a desnaturação de proteínas devido à redução de pH. Proteínas desnaturadas se distribuem de forma diferente em soluções líquidas daquela obtida em seu estado natural, por apresentarem área superficial significativamente maior que na forma nativa, e pelo fato desta possuir área superficial muito mais hidrofóbica (ALBERTSSON, 1986). Entretanto, a influência da carga da biomolécula vai depender muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na

estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em baixos valores de pH ocorre o aumento da carga positiva e em valores altos de pH, da carga negativa. Como regra geral as proteínas carregadas negativamente (nos casos em que o pH é superior ao pI) tem maior afinidade pela fase superior (FORCINITI et al, 1991).

### **3.2.2.2. Temperatura**

Em geral, os efeitos da temperatura sobre o fracionamento de proteínas em SAB podem ser de natureza variada. A temperatura pode alterar a forma da curva binodal, conduzir a alterações na estrutura da proteína ou mesmo resultar na desnaturação da proteína (BASKIR et al., 1989). Geralmente para baixas temperaturas (menores que 20 °C) a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. Os sistemas de fases próximos do ponto crítico podem ser influenciados pela mudança de temperatura devido a sua instabilidade, quando a curva binodal é então deslocada, podendo assim o sistema passar facilmente para a região monofásica (BAMBERGER et al, 1985).

Para sistemas formados por PEG e sal, foi constatado que o aumento da temperatura facilita a separação das fases. Já para sistemas formados por LI (combinado com o cátion imidazólio) e sal, ocorre o contrário, pois em temperaturas próximas à ambiente ou menores favorece a separação das fases do sistema. Foi observado também para o sistema LI e sal, que a diminuição da temperatura favorece o aumento da concentração de LI na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre a redução da concentração do LI na fase inferior (ZASLAVSKY, 1995; YU et al., 2011).

### **3.2.3. Coeficiente de Partição**

Quando materiais biológicos são adicionados em SAB, estes distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. A relação entre as concentrações de certa biomolécula nas fases superior e inferior do SAB define o coeficiente de partição ( $K_p$ ) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986):

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (3)$$

onde  $[C]_{sup}$  e  $[C]_{inf}$  são concentrações de equilíbrio da proteína particionada na fase superior e inferior, respectivamente.

O  $K_p$  é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse, pois mostra a sua distribuição nas duas fases aquosas. Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores. O que se deseja é que os dois coeficientes tenham uma ordem de grandeza bem distinta entre si. Como os sistemas em duas fases aquosas são aplicados aos processos de separação em biotecnologia, geralmente as substâncias de interesse são produtos biotecnológicos, principalmente proteínas e enzimas, às quais normalmente o  $K_p$  está associado.

Diversas variáveis podem influenciar na partição, a temperatura, por exemplo, pode influenciar, já que a sua variação pode levar a alterações na curva binodal. Em casos extremos, alterações na temperatura podem levar a mudanças estruturais, como desnaturação de proteínas. Neste caso, a partição é alterada porque proteínas precipitadas se comportam de maneira diferente das proteínas em seu estado nativo (BERNARDO, 2000). O tamanho da molécula a ser particionada também influencia o coeficiente de partição. De uma forma geral, quanto maior a biomolécula, mais desigual a sua partição. Se o tamanho da molécula for excessivamente grande, ela tende a migrar para a interface, podendo, em alguns casos ser coletada integralmente nessa região. (ALBERTSSON, 1986). O comportamento dos componentes em SAB's está também intimamente relacionado com suas propriedades interfaciais. Proteínas, por exemplo, são polímeros de aminoácidos que possuem diferentes características de carga e hidrofobicidade. A posição destes aminoácidos na molécula determina suas propriedades superficiais, assim como define por qual fase a molécula terá mais afinidade (FORCINITI et al., 1991).

### **3.2.4. Constituintes das Fases**

#### **3.2.4.1. Líquido Iônico**

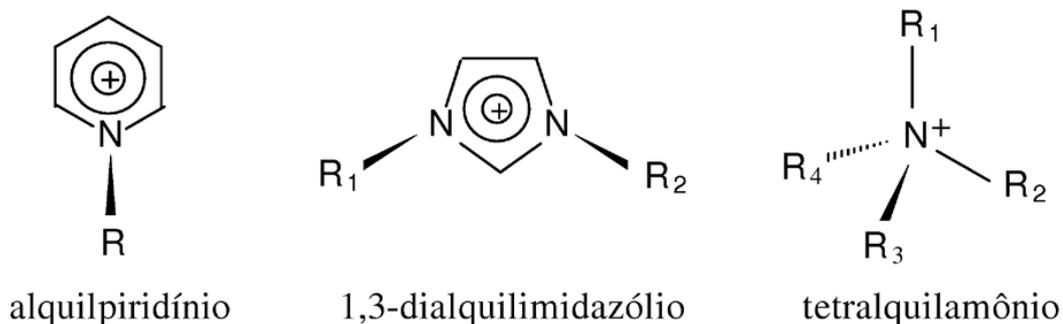
Os líquidos iônicos (LIs), ou sais fundidos, são eletrólitos formados pela combinação de um cátion assimétrico volumoso com um ânion fracamente coordenante, pertencentes a uma classe de solventes com pontos de fusão abaixo de 100 °C e reúnem um conjunto de características interessantes, tais como, líquidos sob uma ampla faixa de temperatura, pressão de vapor negligenciável, inflamabilidade desprezível, baixa

toxicidade (“solvente verde”), boa estabilidade química e térmica, habilidade catalítica e alta condutividade iônica (WEI e IVASKA, 2008). Nas Figura 2 e Tabela 1 são apresentados alguns cátions e ânions comumente utilizados na formação dos LI.

Devido a não-volatilidade dos LIs, a sua alta estabilidade, grande variedade e boa solvatação, eles são atraentes como solventes para reações químicas e separações. Com esses recursos exclusivos, LIs ganharam maior atenção na investigação em meios acadêmicos e industriais, e hoje em dia são sugeridos como alternativas interessantes para solventes orgânicos voláteis e polímeros (ZHAO et al., 2005; JORK et al., 2004). Eles têm sido estudados em processos de extração líquido-líquido, pois a substituição de solventes voláteis por LIs oferece vantagens devido a sua baixa volatilidade e facilidade de reciclagem. Vários estudos sobre LIs já foram publicados nos últimos anos na recuperação de acetona, antibióticos, etanol e butanol de caldos de fermentação, na eliminação dos contaminantes orgânicos de fluxos de resíduos aquosos e na partição de proteínas, como albumina de soro bovino e lisozima (HUDDLESTON et al., 1998; FADEEV et al., 2001; DU et al., 2007; DREYER et al., 2009).

Além disso, a seleção independente do cátion e do ânion permite que a afinidade e o desempenho de solvatação e extração de LIs seja uma característica extremamente importante em relação à separação líquido-líquido em processos biotecnológicos. No entanto, para a concepção correta e otimização dos processos de extração, fazendo uso de LIs, além das investigações de extração de biomoléculas, uma compreensão detalhada de LIs, água e comportamento de fase de sais ou hidratos de carbono inorgânico é de extrema importância (LOUROS et al., 2010).

**Figura 2.** Estruturas de cátions de LI's (R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> = cadeias alquílicas).



**Tabela 1.** Nomes e abreviações dos ânions presentes em LI.

Ânions	Nome	Abreviação
$\text{Cl}^-$	Cloreto	.Cl
$\text{Br}^-$	Brometo	.Br
$\text{BF}_4^-$	Tetrafluorborato	.BF <sub>4</sub>
$\text{PF}_6^-$	Hexafluorborato	.PF <sub>6</sub>
$\text{NO}_3^-$	Nitrato	.NO <sub>3</sub>
$\text{AlCl}_4^- / \text{Al}_2\text{Cl}_7^-$	Cloroaluminato	.AlCl <sub>4</sub> / .Al <sub>2</sub> Cl <sub>7</sub>
$\text{CH}_3\text{CO}_2^-$	Acetato	.Ac
$\text{CF}_3\text{CO}_2^-$	Trifluoracetato	.TfA
$\text{CH}_3\text{SO}_4^-$	Metilsulfato	.MeSO <sub>4</sub>
$\text{CF}_3\text{SO}_3^-$	Trifluormetilsulfonato	.TfO
$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	Bis(trifluormetilsulfonil)imida	.NTf <sub>2</sub>
$(\text{CF}_5\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	Bis(perfluormetilsulfonil)imida	.Pf <sub>2</sub> N

Fonte: FRANZOI et al., 2011.

#### 3.2.4.2. Sal

O fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) é branco e granulado. Apresenta solubilidade em água igual a 22,2 g/100 mL a 20 °C. É insolúvel em álcool. Possui o pH entre 4,4 e 4,7 quando em solução de 50 g/L de água. (SIGMA-ALDRICH, 2001).

O fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) também possui a cor branca, é higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina (pH entre 8,7 e 9,3 quando em solução de 50 g/L de água). Possui solubilidade em água a 160 g/100 mL a 20 °C (SIGMA-ALDRICH, 2001).

#### 3.2.5. Aplicação dos Sistemas Aquosos Bifásicos LI-Sal na Separação de Proteínas

Os SAB's vêm sendo empregados com muito sucesso na separação de diversas biomoléculas. SAB's formados por LIs e sais inorgânicos mostrou recuperações mais elevadas para proteínas modelo do que os métodos que empregam sistemas com PEG e sal (PEI et al., 2009; DU et al., 2007). A separação de biomoléculas em SAB's baseado em LI foi relatada por alguns grupos de pesquisa, e os resultados estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2.** SAB formados por LI e sal utilizados na separação de biomoléculas.

Biomoléculas	SAB	Eficiência de extração (%)	Referência
BSA	[C <sub>4</sub> mim]Cl + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	90	DU et al., 2007
Penicilina G	[C <sub>4</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]/NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	90,8	LIU et al., 2005
Testosterona e epitestosterona	[C <sub>4</sub> mim]Cl/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80-90	HE et al., 2005
Citrocomo c	[C <sub>4</sub> mim]Br/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	>90	PEI et al., 2009
Tripsina, lisozima e mioglobina	Ammoeng <sup>TM</sup> 110 + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- <sup>a</sup>	DREYER et al., 2009

<sup>a</sup> Eficiência de extração não foi informada.

### 3.3. Propriedades Termodinâmicas

Sistemas aquosos bifásicos têm sido extensivamente estudados para separação de biomoléculas. Dentre os sistemas utilizados, destacam o uso do sistema PEG/Dextrana (ALBERTSSON, 1986), PEG/Sais (FARIA et al., 2009), gelatina/Dextrana (DING et al., 2002) , PEG/APA (JOHANSSON et al., 2008) e, mais recentemente, o sistema LI/Sais (LOUROS, 2010) . Devido à sua baixa tensão interfacial, aliada ao alto conteúdo de água, os SAB's promovem uma separação suave de forma a preservar as propriedades biológicas de biocompostos, como proteínas, enzimas, células, etc. Consequentemente, a tensão interfacial entre as fases, a densidade e a viscosidade têm uma influência decisiva nos mecanismos de separação e partição de biomoléculas, assim como nos processos de dispersão, emulsificação, floculação e solubilização (ZUNIGA et al., 2006).

As características de separação de fases dependem das propriedades do fluido (diferença de densidade, tensão interfacial e viscosidade da fase contínua) e da intensidade de mistura. Em tanques agitados em modo descontínuo, a separação de fases ocorre quando a agitação é interrompida. Em colunas contínuas, há uma seção para separação das fases que pode ser parte da coluna ou um dispositivo separado da mesma. Dados de tensão interfacial, reologia e densidade tornam possível a predição da velocidade de formação e separação de fases. Sendo assim, um melhor conhecimento das relações entre a composição das fases em equilíbrio e a tensão interfacial é crucial

para o entendimento da estabilização do sistema bifásico, assim como no projeto de equipamentos de extração (NAN et al., 2006).

### **3.4. Alfa-lactoalbumina**

A alfa-lactoalbumina ( $\alpha$ -la) constitui cerca de 15% - 25% das proteínas presentes no soro do leite bovino, é considerada de rápida digestão, por ser uma proteína pequena, com massa molecular em torno de 14 kDa, sendo composta por 123 resíduos de aminoácidos, possui a capacidade de se ligar ao cálcio e ao zinco, sendo o cálcio o estabilizador de sua estrutura. É rica em aminoácidos essenciais e contém maior abundância de triptofano, quando comparada a todas as outras fontes alimentares (HARAGUCHI et al., 2006). É apropriada para a preparação e fortificação nutricional de alimentos e possui um custo relativamente baixo (BRAMAUD et al., 1997). O seu ponto isoelétrico (pI) é 4,8 e é facilmente desnaturada em pH 6,7 à temperatura de 65,2 °C (FOX e MCSWEENEY, 1998). Representa a principal proteína no soro do leite humano e é fonte de peptídeos que apresentam atividade contra algumas bactérias patogênicas como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (HARAGUCHI et al., 2006).

### **3.5. Lisozima**

A lisozima é uma proteína globular, compactamente enrolada e que tem a maioria de seus grupos R hidrofóbicos voltados para o interior da macromolécula, protegidos da água, e a maioria dos seus grupos hidrofílicos voltados para a superfície de contato com o exterior (QASBA e KUMAR, 1997). Possui cadeia única, com massa molar em torno de 14300 Da, sendo composta por 129 resíduos de aminoácidos (CANFIELD, 1963). Entre os resíduos de aminoácidos estão seis lisinas e nove argininas, o que lhe conferem um caráter básico (DISMER e HUBBUCH, 2007), sendo seu ponto isoelétrico em torno de 11,3 (WETTER e DEUTSCH, 1951). Apresenta atividade antimicrobiana, hidrolisando as  $\beta$ -ligações entre o ácido murâmico e a N-acetil-glicosamina existente no mucopolissacarídeo das paredes celulares de bactérias (BASAR et al., 2007).

A fonte comercial mais significativa da lisozima é a clara de ovo de galinha (CUNNINGHAM et al., 1991). Aplicação crescente da lisozima à indústria de alimentos tem sido descrita na literatura (PADGETT et al., 1998), por ser uma fonte segura para o consumo humano, além de não causar problemas de poluição ambiental.

A lisozima destrói a parede celular de certas bactérias e formas vegetativas de bactérias, especificamente *Clostridium tyrobutyricum*. Por isso tem sido utilizada na indústria de alimentos na prevenção do crescimento de microrganismos patogênicos por atuar como agente bacteriostático, especialmente em carnes e laticínios (GUCHTE et al., 1992; e FUGLSANG et al., 1995). Pesquisas mostram que essa enzima pode ter aplicação em veterinária, alimentação infantil e animal, além de possuir atividade contra infecção por HIV-1 (LEE-HUANG et al., 1999).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga.

### 4.1. Material

As proteínas utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Sigma-Aldrich. Os reagentes utilizados na condução deste trabalho foram: cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio ([C<sub>2</sub>min]Cl) da Sigma-aldrich (USA) com grau de pureza  $\geq 95\%$  e fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), adquiridos da Vetec (Brasil) e Cinética (Brasil), respectivamente. Nos experimentos foram empregados água destilada e todos os reagentes usados foram de grau analítico.

Soluções estoques dos reagentes foram preparadas, com concentrações iguais a 60% m/m para o LI e 40% m/m para o sal (fosfato) nos valores de pH 7,5, 8,0 e 8,5, pela mistura do fosfato de potássio monobásico e bibásico, conferidos em pHmetro e ajustados quando necessários.

### 4.2. Determinação dos Dados de Equilíbrio de Fases para o Sistema LI - Fosfato de potássio - Água

Diagramas de equilíbrio para o SAB LI {[C<sub>2</sub>min]Cl}-fosfato de potássio foram obtidos experimentalmente. Nas temperaturas de (20, 30, 40 e 50) °C e nos valores de pH 7,5, 8,0 e 8,5. As curvas binodais foram determinadas pelo método turbidimétrico (ALBERTSSON, 1986). O procedimento consistiu em pesar aproximadamente 2,5 g da solução estoque do LI em tubos de ensaio em balança analítica (GEHAKA, modelo AG-200). O tubo contendo a solução do LI foi levado a um banho termostático, onde foi deixado por 3 minutos para atingir o equilíbrio térmico na temperatura experimental desejada. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 20 µL da solução estoque de sal com uma pipeta automática, mantendo-se a agitação manual do tubo dentro do banho, até que o sistema se turvasse. O aparecimento da turbidez indica que o sistema passou de monofásico para bifásico. Conhecendo-se as massas adicionadas ao tubo de ensaio calculavam-se as concentrações de LI e de fosfato de potássio necessárias para a mudança de fase. Obtinha-se, com isso, o primeiro ponto da curva binodal. Os pontos adicionais foram obtidos pela adição de pequenas quantidades de água para que o sistema ficasse homogêneo (límpido) e, na sequência, sal até promover uma nova turvação. O processo foi repetido até se obterem os pontos suficientes para a construção

da curva. A equação empírica (Equação 4) sugerida por Hu et al. (2003) foi ajustada aos dados das curvas binodais experimentais.

$$X_{LI} = \exp(a + b (X_{SAL})^{0,5} + cX_{SAL} + d(X_{SAL})^2) \quad (4)$$

Em que  $X_{LI}$  e  $X_{SAL}$  são as composições em fração mássica do LI e sal, respectivamente, e a, b, c e d são parâmetros de ajuste da equação.

As linhas de amarração foram obtidas utilizando o método gravimétrico descrito por Merchuk et al. (1998), que consiste em selecionar primeiro um ponto dentro da região bifásica, através da qual a LA vai passar. Foram utilizados três pontos globais para cada sistema LI-Sal, os quais estão apresentados na Tabela 3. Os pontos que deram origem a linha de amarração foram obtidos para cada condição de pH e temperatura, com composições conhecidas em tubos de centrífuga graduados de fundo cônico, a partir da massa das soluções-estoque de LI, sal e água para uma massa total do sistema de 40 g. A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada com temperatura controlada (SP LABOR, modelo Sp-701) a uma força centrífuga de 1169 g por 10 minutos, para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, durante 12 horas em estufa B.O.D (LONGEN SCIENTIFC, modelo LG340 FT220), nas temperaturas estudadas, para se alcançar o equilíbrio das fases. Todas as soluções e diluições foram preparadas cuidadosamente, usando uma balança analítica (GEHAKA, modelo AG-200) na pesagem dos reagentes para que o balanço de massa fosse feito corretamente.

**Tabela 3.** Composições globais para os sistemas formados por LI {[C<sub>2</sub>min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, expressas em porcentagem mássica (%m/m).

Ponto Global	20 °C		30 °C		40 °C		50 °C	
	LI	Sal	LI	Sal	LI	Sal	LI	Sal
pH 7,5								
1	22	21	20	22	22	22	22	22
2	23	22	21	23	23	23	23	23
3	24	23	22	24	24	24	24	24
pH 8,0								
1	22	18	20	21	21	20	22	20
2	23	19	21	22	22	21	23	21
3	24	20	22	23	23	22	24	22

*Continuação.* **Tabela 3.** Composições globais para os sistemas formados por LI {[C2min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, expressas em porcentagem mássica (%m/m).

pH 8,5								
1	20	20	20	21	21	21	21	18
2	21	21	21	22	22	22	22	19
3	22	22	22	23	23	23	23	20

#### 4.2.1. Coleta das Fases

Após 12 horas, na temperatura de interesse, verificou-se o equilíbrio entre as fases apresentando-se límpidas, uma alíquota de cada uma das fases resultantes foi coletada com o auxílio de uma seringa de 5 mL com agulhas longas. Primeiramente, coletou-se a fase superior até que restasse uma camada de aproximadamente 5 mm desta fase acima da interface. Este procedimento visou garantir que a interface não fosse perturbada. Em seguida, após a coleta da fase superior, uma seringa foi introduzida cuidadosamente na célula de equilíbrio para a retirada da fase inferior, evitando que a interface fosse perturbada. As fases foram coletadas em recipientes com tampa e armazenadas sob refrigeração até que todas as análises fossem realizadas.

#### 4.2.2. Quantificação dos Componentes do Sistema

Depois das fases terem sido separadas, elas foram pesadas, afim quantificar os componentes em cada fase. A concentração de cada componente nas fases coletadas foi estimada pela aplicação da regra da alavanca, na relação entre a composição em massa da fase superior e a composição total do sistema (Merchuk et al., 1998).

Para determinação dos componentes da LA o seguinte sistema de quatro equações (Equações 5-8) e quatro valores desconhecidos ( $X_{LI}^s$ ,  $X_{LI}^i$ ,  $X_{SAL}^s$ ,  $X_{SAL}^i$ ) foram resolvidos por SOLVER (HU et al., 2003).

$$X_{LI}^s = \exp(a + b (X_{SAL}^s)^{0,5} + cX_{SAL}^s + d(X_{SAL}^s)^2) \quad (5)$$

$$X_{LI}^i = \exp(a + b (X_{SAL}^i)^{0,5} + cX_{SAL}^i + d(X_{SAL}^i)^2) \quad (6)$$

$$\frac{X_{LI^s} - X_{LI^M}}{X_{LI^M} - X_{LI^i}} = \frac{m_i}{m_s} \quad (7)$$

$$\frac{X_{SAL^M} - X_{SAL^s}}{X_{SAL^i} - X_{SAL^M}} = \frac{m_i}{m_s} \quad (8)$$

Onde  $X_{LI^s}$ ,  $X_{SAL^s}$ ,  $X_{LI^i}$ ,  $X_{SAL^i}$ ,  $X_{LI^M}$ ,  $X_{SAL^M}$  são as composições em fração mássica do LI e do sal na fase superior, inferior e na mistura, respectivamente,  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  foram ajustados da binodal. E  $m_i$  e  $m_s$  é a massa da fase inferior e superior, respectivamente.

### 4.3. Determinação da Massa Específica

A massa específica das fases foi determinada nas mesmas temperaturas de equilíbrio, utilizando-se um densímetro digital de bancada Anton Paar DMA-5000 (Anton-Paar, Graz, Áustria) com uma precisão de  $\pm 5 \times 10^{-6} \text{ g.cm}^{-3}$  e repetibilidade de  $+ 1 \times 10^{-6} \text{ g.cm}^{-3}$  na faixa de operação 0 a  $3 \text{ g.cm}^{-3}$ . A faixa de temperatura do equipamento é de 273,15 K a 363,15 K com uma precisão de  $+ 0,01 \text{ K}$  e repetibilidade de  $+ 0,001 \text{ K}$ .

### 4.4. Partição das Proteínas em SAB

Os experimentos de partição foram realizados em tubos de centrifuga graduados, utilizando-se 7,0 mL de cada uma das fases superior e inferior dos SAB's pré-equilibrados, de acordo com cada condição experimental definida.

Adicionou-se aos tubos um volume de 360  $\mu\text{L}$  de uma solução de proteína (5 mg/mL), os quais foram agitados em agitador tipo vortex (PHOENIX, modelo AP56). Em seguida, os sistemas foram centrifugados a 1164 g por 15 minutos e os tubos foram mantidos em repouso em estufa B.O.D por 12 horas em temperatura controlada. Após a partição da proteína, as fases superiores e inferiores foram coletadas com seringas de 5 mL, para posterior quantificação da proteína

### 4.5. Quantificação da Proteína

A concentração da proteína na fase inferior foi determinada por leitura direta em espectrofotômetro (BIOCHROM, modelo 570 Libra) em  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Já a concentração da proteína na fase superior foi determinada utilizando o método de BRADFORD

(1976), por meio da leitura da absorvância no comprimento de onda de 595 nm, em espectrofotômetro. As curvas analíticas foram construídas usando-se como padrão as proteínas  $\alpha$ -lactoalbumina e lisozima, variando a concentração de 0 a 1 mg/mL.

#### **4.6. Cálculo do Coeficiente de Partição e da Recuperação Teórica**

A distribuição da proteína entre as fases do sistema foi determinada a partir do coeficiente de partição, descrito na Equação 3, na seção 2.2.3. O coeficiente de partição foi utilizado para quantificar o grau de separação alcançado em um processo de extração. Para que se possa selecionar o SAB com melhor capacidade de extração das proteínas estudadas, foi calculada também a recuperação teórica ( $y$ , %) do sistema, utilizando-se a Equação 9 (PICÓ, 2006):

$$y(\%) = \frac{100}{1 + (1 / RK)} \quad (9)$$

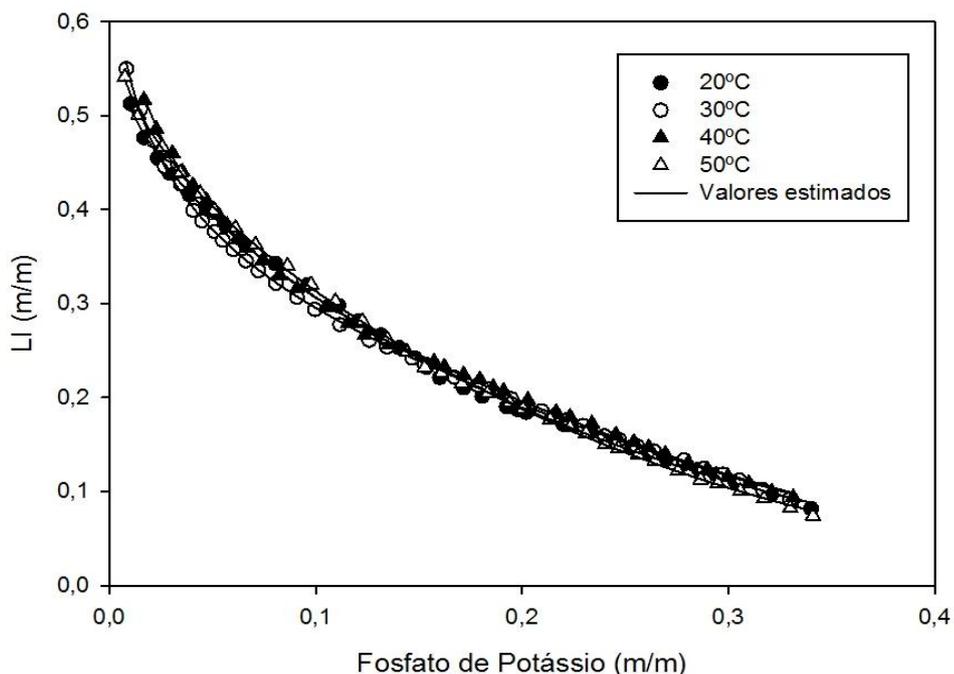
em que R corresponde a razão entre os volumes da fase superior e inferior e K corresponde ao coeficiente de partição.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

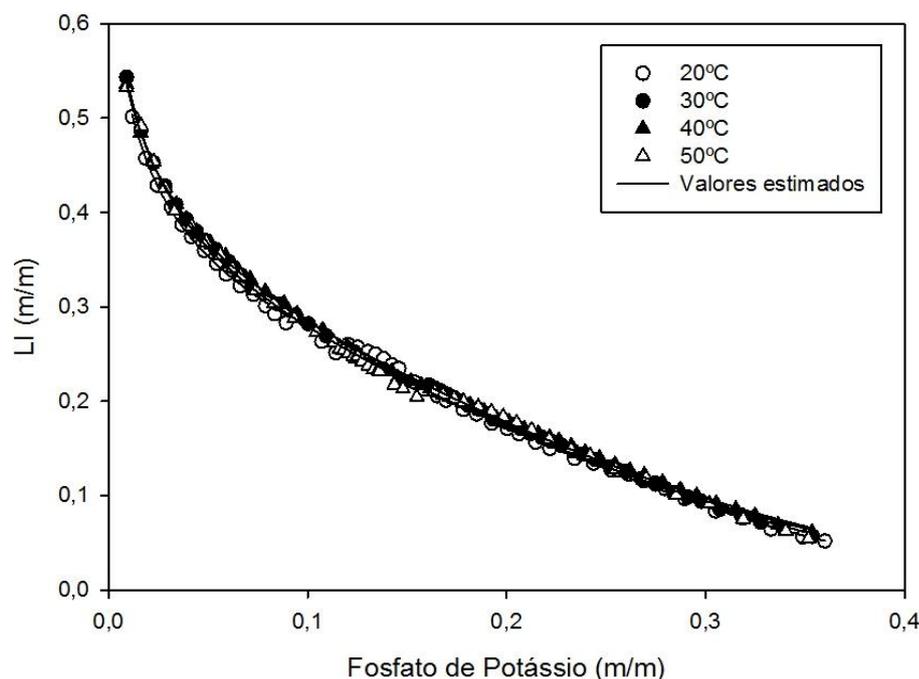
### 5.1. Efeito da Temperatura e do pH nos Diagramas de Equilíbrio

Foram obtidos diagramas de equilíbrio de fases para os SAB's estudados em função da temperatura e dos valores de pH. Os diagramas para os sistemas LI-fosfato-água são apresentados nas Figuras 3 a 5 (em função da temperatura); e Figuras 6 a 9 (em função do pH). Na região abaixo das curvas obtidas para cada temperatura ou pH, encontram-se soluções homogêneas e acima das curvas verifica-se a formação de duas fases. Os dados obtidos experimentalmente por turbidimetria na obtenção das curvas binodais dos sistemas foram correlacionados pela equação não linear (Equação 4) proposta por Hu et al. (2003), a qual tem sido utilizada por outros pesquisadores (WANG et al., 2010; YU et al., 2011; HAN et al., 2012). Os valores obtidos para os parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  da Equação 4 com os seus correspondentes desvios padrão e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das equações ajustadas para os sistemas investigados estão apresentados na Tabela 4. Com base nos valores de  $R^2$  e nos desvios padrões obtidos, pode-se concluir que a equação se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais. As Figuras 3 a 9 apresentam a comparação entre as curvas binodais experimentais e correlacionadas, mostrando o bom ajuste da equação.

**Figura 3.** Diagrama de fases [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio em pH 7,5 para diferentes temperaturas.



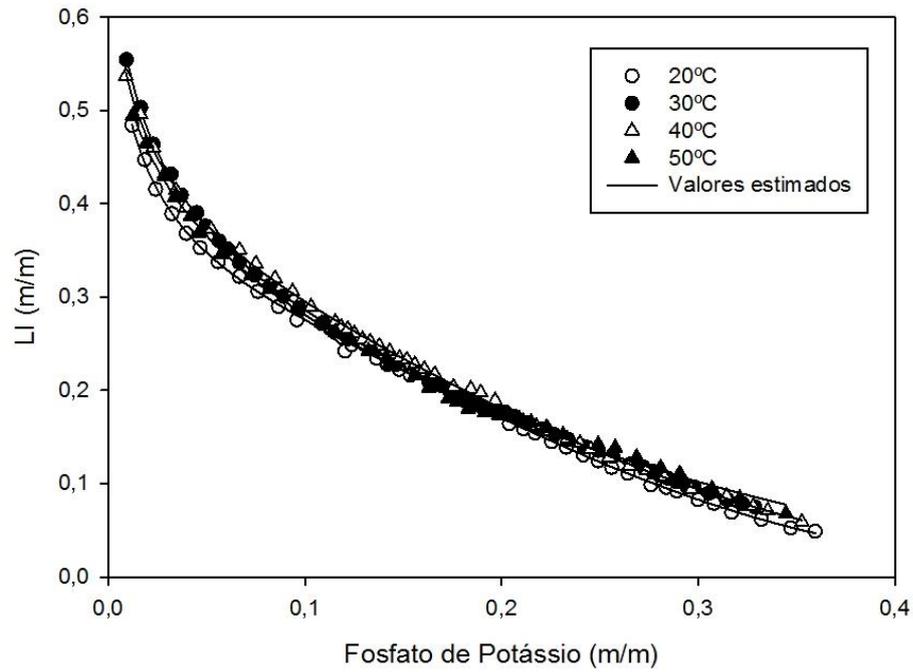
**Figura 4.** Diagrama de fases [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio em pH 8,0 para diferentes temperaturas.



**Tabela 4.** Parâmetros  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , e  $d$  e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos para o sistemas LI-Fosfato de potássio pela equação de Hu et al. (2003).

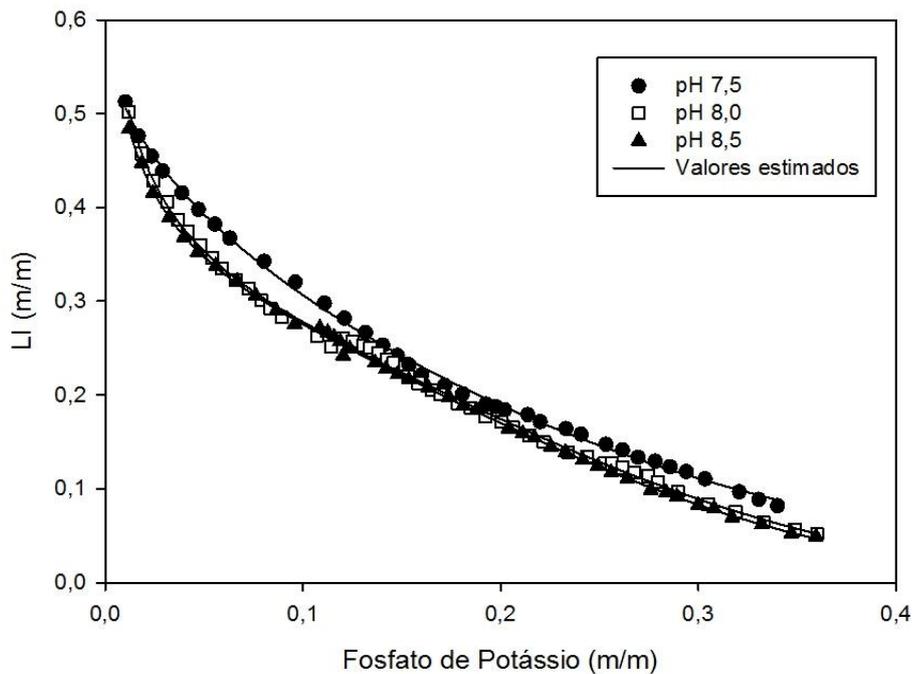
pH	$a$	$b$	$c$	$d$	$R^2$
20 °C					
7,5	$-0,5108 \pm 0,0278$	$-1,5229 \pm 0,2868$	$-1,4142 \pm 0,7331$	$-4,7410 \pm 1,1036$	0,9986
8,0	$-0,1964 \pm 0,0298$	$-5,3142 \pm 0,2975$	$7,8084 \pm 0,7541$	$-18,3799 \pm 1,1469$	0,9984
8,5	$-0,2572 \pm 0,0197$	$-5,0839 \pm 0,2014$	$7,7165 \pm 0,5130$	$-19,5849 \pm 0,7717$	0,9994
30 °C					
7,5	$-0,2677 \pm 0,0132$	$-3,8454 \pm 0,1411$	$3,5835 \pm 0,3807$	$-9,4653 \pm 0,6220$	0,9995
8,0	$-0,2079 \pm 0,0119$	$-4,7822 \pm 0,1238$	$6,1876 \pm 0,3235$	$-15,6435 \pm 0,5172$	0,9996
8,5	$-0,2149 \pm 0,0108$	$-4,2535 \pm 0,1130$	$4,2910 \pm 0,2988$	$-12,0931 \pm 0,4797$	0,9997
40 °C					
7,5	$-0,2147 \pm 0,0143$	$-3,7667 \pm 0,2740$	$3,1060 \pm 0,6713$	$-8,7924 \pm 0,9704$	0,9991
8,0	$-0,2747 \pm 0,0143$	$-4,0833 \pm 0,1480$	$4,3996 \pm 0,3845$	$-12,5254 \pm 0,6061$	0,9994
8,5	$-0,2827 \pm 0,0164$	$-3,4917 \pm 0,1740$	$4,5091 \pm 0,4532$	$-14,1878 \pm 0,7086$	0,9993
50 °C					
7,5	$-0,4657 \pm 0,0155$	$-1,7077 \pm 0,1695$	$-0,8957 \pm 0,4573$	$-6,5975 \pm 0,7398$	0,9994
8,0	$-0,2407 \pm 0,0314$	$-4,4036 \pm 0,3308$	$4,8628 \pm 0,8670$	$-12,9329 \pm 1,3893$	0,9971
8,5	$-0,3653 \pm 0,0373$	$-3,1762 \pm 0,3759$	$1,7832 \pm 0,9499$	$-7,9150 \pm 1,4307$	0,9980

**Figura 5.** Diagrama de fases [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio em pH 8,5 para diferentes temperaturas.

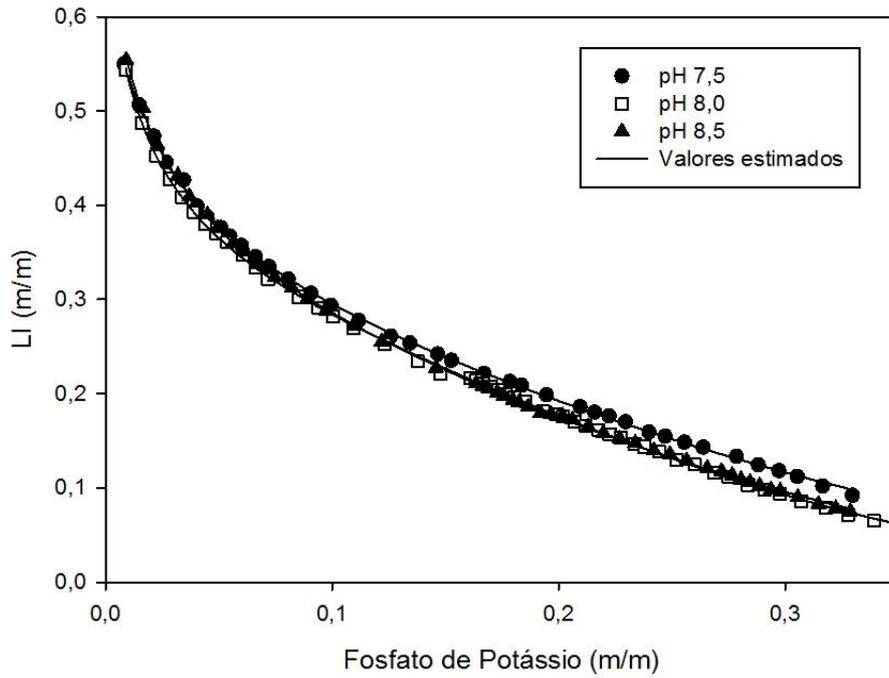


Observando-se as Figuras 3, 4 e 5, pode-se notar que os sistemas não sofreram variação da região bifásica com o aumento da temperatura. Isto indica que há uma variação insignificante da capacidade calorífica das fases.

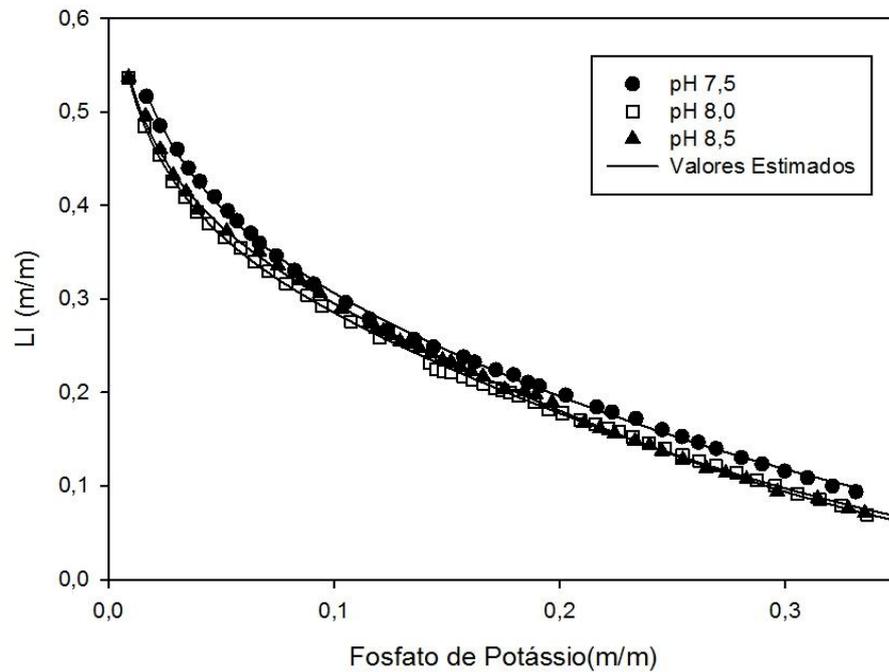
**Figura 6.** Diagrama de fases [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio a 20 °C para diferentes valores de pHs.



**Figura 7.** Diagrama de fases [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio a 30 °C para diferentes valores de pH.



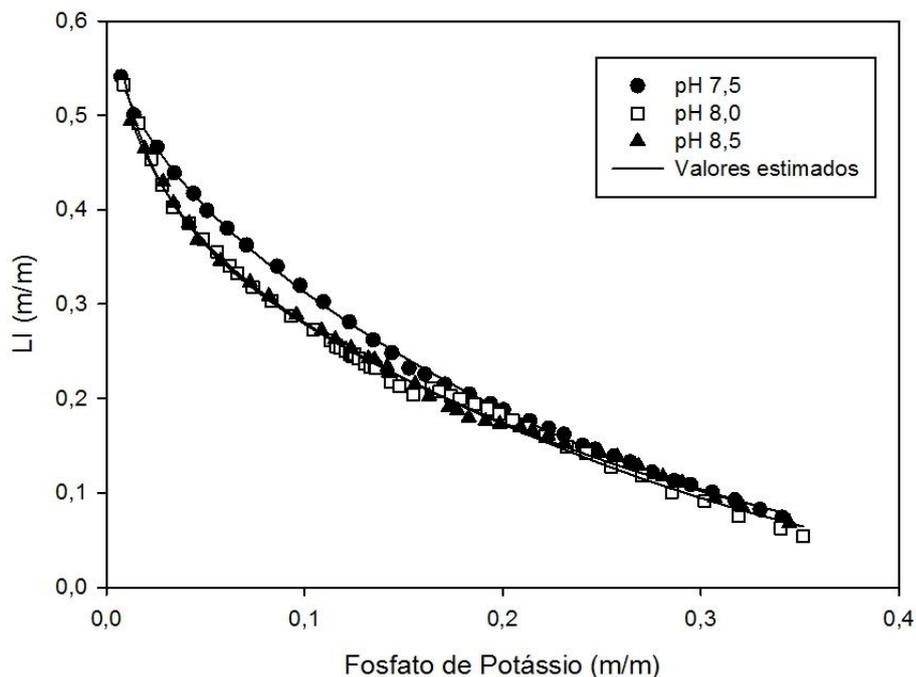
**Figura 8.** Diagrama de fases [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio a 40 °C para diferentes valores de pH.



Para os diferentes valores de pH estudados o formato das curvas binodais se manteve constante. Com a diminuição do pH para 7,5, a curva é deslocada em direção a concentrações maiores de LI e sal, diminuindo assim, a região de separação de fases.

Esse efeito é mais pronunciado nas temperaturas de 20 °C e 50 °C, como pode ser observado nas Figuras 6 e 9, respectivamente. Ananthapadmanabhan e Goddard (1987) postularam que ânions com uma maior valência são melhores agentes *salting-out* do que ânions de valência mais baixa, pois quanto maior a valência, o ânion torna-se mais hidratado e, assim, diminui a quantidade disponível de água para hidratar o LI. Portanto, pode-se dizer que com a diminuição do pH, a razão  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  aumenta, pois há uma quantidade maior do fosfato monobásico, diminuindo o efeito *salting-out* do LI (fenômeno de expulsão devido ao tamanho do LI), sendo necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico. Essa mesma tendência foi observada por Mourão et al. (2012) ao investigar o efeito dos sais  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na formação de fases com diferentes LIs em curvas binodais.

**Figura 9.** Diagrama de fases [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio a 50 °C para diferentes valores de pH.



## 5.2. Estudo do Comportamento das Linhas de Amarração

A partir da caracterização dos diagramas de fases foram obtidas as linhas de amarração pelo método gravimétrico descrito por Merchuck et al. (1998) para posterior partição da  $\alpha$ -lactoalbumina e lisozima. As composições de equilíbrio para os sistemas estudados nas diferentes condições de temperatura e pH estão apresentadas na Tabela 5,

em que os dados referentes aos componentes das fases estão expressos em termos de porcentagem mássica. Três linhas de amarração foram determinadas para cada sistema estudado. Os dados de equilíbrio de composição de fase estão representados nas Figuras 10 a 13. O comprimento da linha de amarração (CLA) representa a diferença entre a concentração de sal inorgânico e de LI nas fases superior e inferior, quanto maior o CLA, maior é a concentração de LI na fase superior e a concentração do sal na fase inferior.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, pode-se observar que a concentração de LI na fase inferior para a maioria dos sistemas, é muito baixa, e em alguns casos, o LI é quase totalmente excluído dessa fase, enquanto que o comportamento contrário é observado na fase superior. A exclusão é mais pronunciada com a diminuição do valor de pH, nas temperaturas de 20 °C e 40 °C e na temperatura de 50 °C ao reduzir o pH de 7,5 pra 8,0. Este comportamento de exclusão é comum à maioria dos SAB's formados por LI-Sal, sendo que a fase superior é composta majoritariamente por LI e água, e a fase inferior é composta principalmente por sal e água. O fenômeno de exclusão do LI na fase inferior foi observado para SAB's formado por tetrafluorborato de 1-etil-3metilimidazólio {[Emin]BF<sub>4</sub>} + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + água e tetrafosfoborato de 1-etil-3metilimidazólio {[Pmin]BF<sub>4</sub>} + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + água (YU et al., 2011). A composição total do sistema não tem efeito significativo sobre a inclinação das linhas de amarrações, o que implica que as LAs são paralelas entre si.

Os valores do comprimento da linha de amarração (CLA) para cada sistema estudado também estão na Tabela 5. Segundo Da Silva e Loh (2006), o CLA está associado à seletividade do sistema. Quanto menor o CLA, associada a uma dada composição global do sistema, mais próximo da unidade será o valor do coeficiente de partição da biomolécula de interesse, tornando-se menos seletiva a extração. No entanto, com o aumento do CLA, a biomolécula de interesse tende a migrar mais para uma das fases, isto é, o valor do coeficiente de partição torna-se cada vez mais distante de 1, para mais ou para menos, aumentando a eficiência de extração. Esse comportamento é resultante do aumento da diferença de composição entre as fases, gerando, conseqüentemente, o incremento das contribuições entálpicas e entrópicas na transferência da biomolécula para uma das fases. Neste estudo, pode-se observar que à medida que aumenta o valor de pH o CLA também aumenta, com o aumento do pH a razão  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  diminui, aumentando o efeito *salting-out* no LI, e conseqüentemente, aumentando a diferença de composição entre fases.

A partir dos dados apresentados nas Figuras 10 a 12 e na Tabela 5, observa-se que a temperatura influencia no comprimento e na inclinação das linhas de amarração dos sistemas. Esse comportamento é observado em todos os valores de pH estudados. Os valores absolutos da inclinação das linhas de amarração tendem a diminuir com o aumento da temperatura. Pode-se dizer que a redução da temperatura aumenta a afinidade do fosfato de potássio pela água induzindo a uma migração de água para longe dos íons de LI reduzindo a sua hidratação e solubilidade (FREIRE et al., 2010), ou seja, a água da fase rica em LI foi expulsa para a fase rica em sal com a diminuição da temperatura, diminuindo a concentração de sal na fase inferior e, como consequência, um aumento da ILA. No entanto, ao comparar as temperaturas de 40 °C e 50 °C, observa-se que tanto o CLA quanto a ILA foram bem próximas para todos os valores de pH. Ao estudar a interferência do pH na composição das fases, nota-se que a variação de pH não interferiu na inclinação da linha de amarração (Figura 13).

**Tabela 5.** Dados das linhas de amarrações e porcentagem mássica (%m/m) dos sistemas formados por LI {[C<sub>2</sub>min]Cl} (W<sub>1</sub>) + Fosfato de Potássio (W<sub>2</sub>) + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.

pH	LA	Composição Global		Fase Superior		Fase Inferior		CLA	ILA
		W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>		
20 °C									
	1	22,00	21,00	31,58	9,38	5,87	40,54	40,40	-0,83
7,5	2	23,02	21,98	35,63	6,91	4,71	43,88	48,20	-0,84
	3	24,00	23,00	38,76	5,25	3,70	47,41	54,83	-0,83
	1	21,99	18,01	29,75	8,44	2,83	41,67	42,77	-0,81
8,0	2	23,01	19,00	34,02	5,67	2,04	44,36	50,20	-0,83
	3	24,04	19,97	37,46	4,08	1,52	46,65	55,71	-0,84
	1	20,00	20,00	27,41	10,12	1,69	44,41	42,86	-0,75
8,5	2	21,01	20,99	31,50	6,94	1,06	47,73	50,90	-0,75
	3	21,98	22,03	34,66	5,05	0,69	50,53	56,77	-0,75
30 °C									
	1	19,99	22,01	27,43	11,72	5,21	42,45	37,92	-0,72
7,5	2	21,00	23,00	30,95	8,95	3,42	47,82	47,63	-0,71
	3	22,01	23,99	34,07	6,93	2,47	51,64	54,75	-0,71

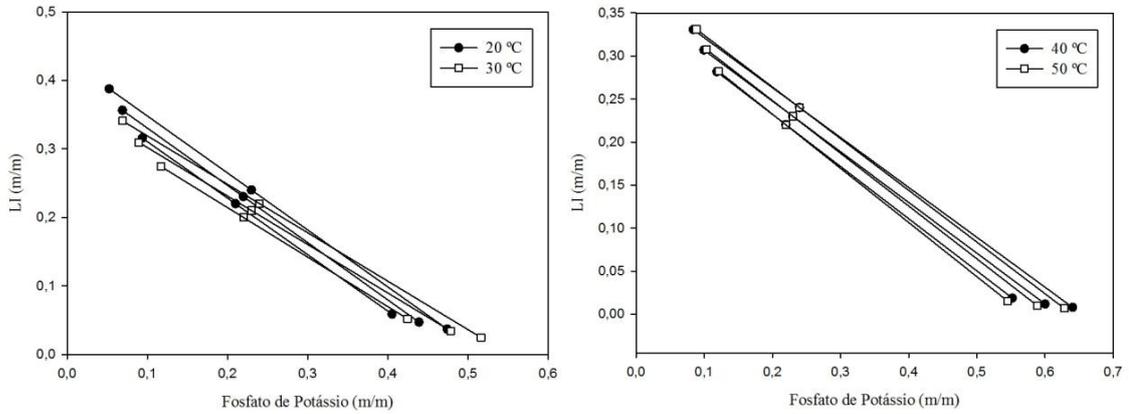
*Continuação. Tabela 5.* Dados das linhas de amarrações e porcentagem mássica (%m/m) dos sistemas formados por LI {[C<sub>2</sub>min]Cl} (W<sub>1</sub>) + Fosfato de Potássio (W<sub>2</sub>) + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.

	1	20,04	20,98	28,29	10,11	2,48	44,11	42,69	-0,76
8,0	2	20,99	22,00	31,85	7,56	1,60	47,83	50,37	-0,75
	3	22,00	23,00	35,10	5,68	1,13	50,58	56,30	-0,76
	1	19,99	21,00	28,67	9,95	3,80	41,64	40,28	-0,78
8,5	2	21,01	21,99	32,35	7,55	2,68	45,34	48,05	-0,79
	3	22,00	22,99	35,92	5,68	2,10	47,75	53,98	-0,80
40 °C									
	1	22,02	21,98	28,17	11,86	1,87	55,22	50,71	-0,61
7,5	2	23,00	22,99	30,69	9,96	1,19	60,01	58,10	-0,59
	3	24,02	23,99	33,07	8,38	0,79	64,04	64,34	-0,58
	1	21,00	20,00	25,68	12,32	1,24	52,48	47,01	-0,61
8,0	2	21,99	21,00	28,34	10,14	0,68	57,47	54,82	-0,58
	3	22,90	22,07	30,59	8,51	0,38	61,84	61,29	-0,57
	1	20,97	21,03	26,61	12,27	0,98	52,07	47,34	-0,64
8,5	2	21,99	22,00	29,35	10,12	0,53	56,62	54,71	-0,62
	3	23,00	23,00	32,25	8,09	0,35	59,50	60,50	-0,62
50 °C									
	1	21,99	22,00	28,23	12,10	1,54	54,49	50,09	-0,63
7,5	2	23,01	22,99	30,75	10,37	1,02	58,84	56,86	-0,61
	3	24,01	23,99	33,10	8,87	0,68	62,80	62,92	-0,60
	1	22,00	19,99	27,68	10,17	0,69	56,86	53,93	-0,58
8,0	2	22,99	21,00	30,44	8,19	0,47	59,73	59,62	-0,58
	3	24,00	22,00	33,10	6,57	0,34	62,08	64,46	-0,59
	1	22,00	19,00	27,46	10,45	2,63	49,30	46,11	-0,64
8,5	2	23,00	19,99	30,26	8,47	1,81	53,61	53,36	-0,63
	3	24,00	21,00	33,21	6,68	1,46	56,03	58,68	-0,64

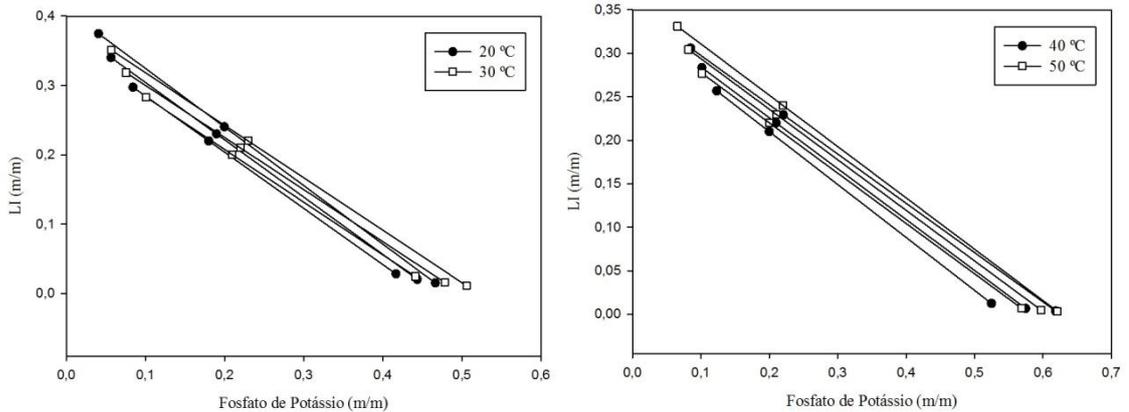
De acordo com Carvalho (2004) a ILA é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade termodinâmica, como a temperatura. O valor da inclinação é calculado pela relação entre a variação da

quantidade do LI e a variação da quantidade do fosfato de potássio nas duas fases em equilíbrio ( $\Delta LI/\Delta SAL$ ).

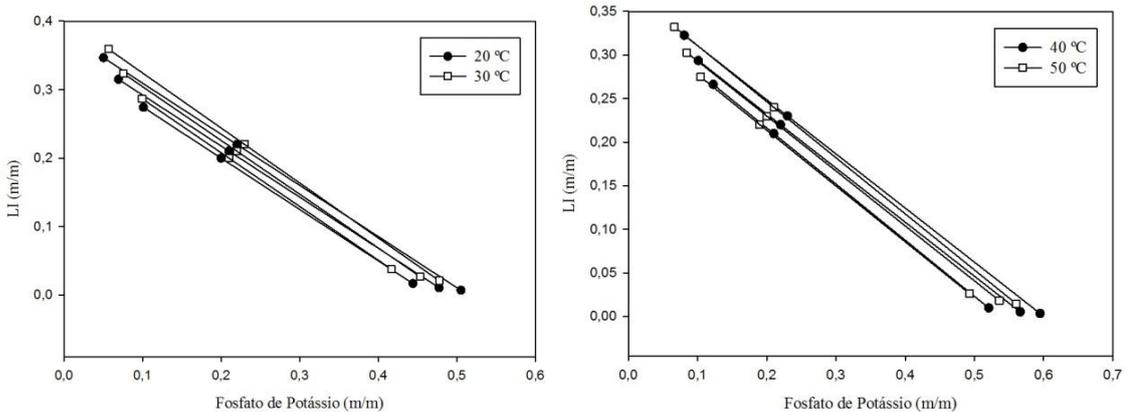
**Figura 10.** Efeito da temperatura na composição das fases em equilíbrio dos sistemas LI-Fosfato, em pH 7,5.



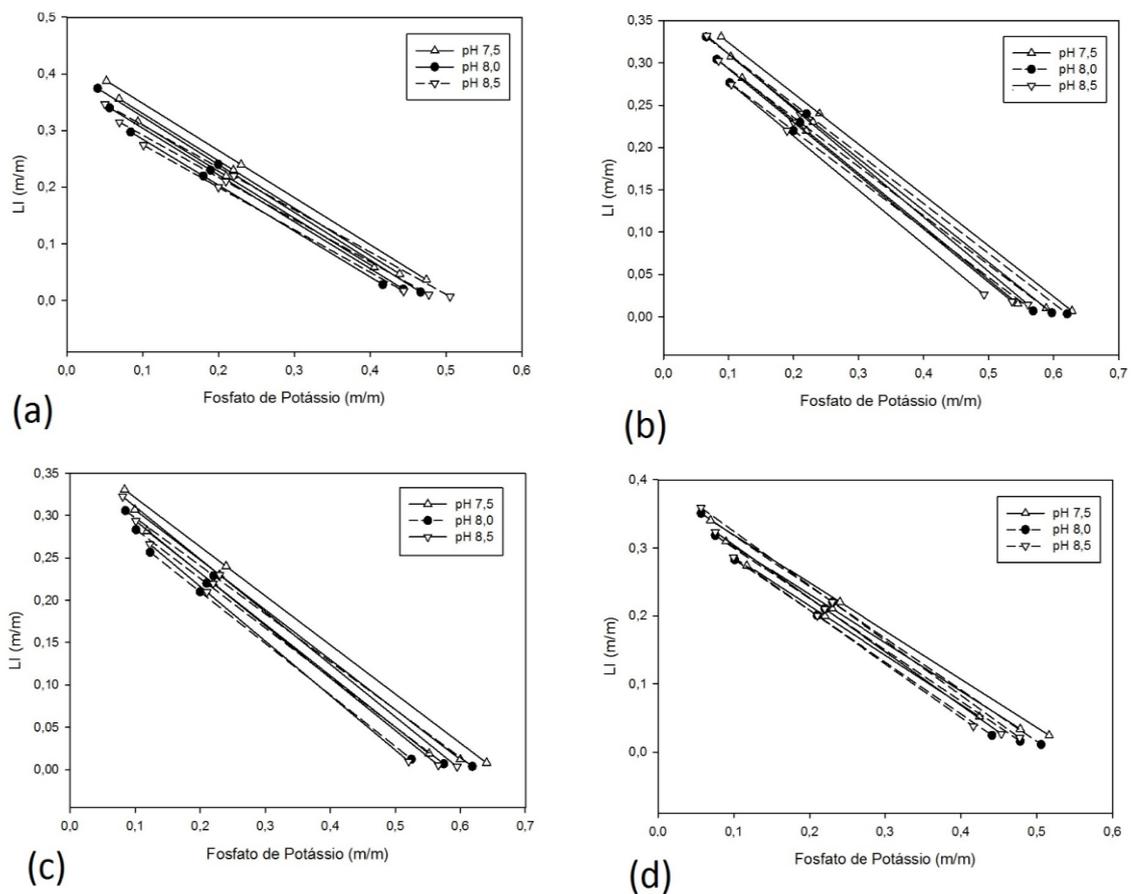
**Figura 11.** Efeito da temperatura na composição das fases em equilíbrio dos sistemas LI-Fosfato, em pH 8,0.



**Figura 12.** Efeito da temperatura na composição das fases em equilíbrio dos sistemas LI-Fosfato, em pH 8,5.



**Figura 13.** Efeito do pH na composição das fases em equilíbrio dos sistemas LI-Fosfato. (a) 20 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C e (d) 50 °C.



### 5.1. Massa Específica

As propriedades termofísicas, como a massa específica, da fase superior e inferior em sistemas ternários apresentam características distintas em relação à composição e temperatura. Essas informações tornam possível a predição da velocidade de formação e separação de fases, sendo necessárias para a concepção e aumento de escala de produção de processos de extração. Sendo assim, na Tabela 6 são apresentados os dados obtidos experimentalmente para a massa específica ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) da fase superior e inferior para os sistemas formados por LI {[C2min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, na temperatura de (20, 30, 40 e 50) °C e nos valores de pH 7,5, 8,0 e 8,5.

**Tabela 6.** Massa específica para os sistemas formados por LI {[C2min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.

pH	LA	20 °C		30 °C	
		$\rho$ (g.cm <sup>-3</sup> )		$\rho$ (g.cm <sup>-3</sup> )	
		Fase Superior	Fase Inferior	Fase Superior	Fase Inferior
7,5	1	1,0915	1,4271	1,0849	1,5289
	2	1,0867	1,4585	1,0848	1,5655
	3	1,0852	1,4912	1,0848	1,5953
8,0	1	1,0960	1,3654	1,0881	1,5356
	2	1,0903	1,4002	1,0879	1,5573
	3	1,0860	1,4364	1,0860	1,5734
8,5	1	1,0951	1,3740	1,0876	1,5426
	2	1,0891	1,4057	1,0860	1,5603
	3	1,0862	1,4402	1,0859	1,5822
		40 °C		50 °C	
7,5	1	1,0797	1,5849	1,0794	1,5939
	2	1,0795	1,6195	1,0782	1,6283
	3	1,0789	1,6504	1,0772	1,6602
8,0	1	1,0824	1,5903	1,0801	1,6051
	2	1,0817	1,6144	1,0796	1,6234
	3	1,0803	1,6557	1,0785	1,6651
8,5	1	1,0814	1,5971	1,0821	1,4413
	2	1,0810	1,6182	1,0817	1,4827
	3	1,0801	1,6658	1,0795	1,5344

Observa-se na Tabela 6 que as massas específicas das fases superior e inferior dos sistemas estudados variaram de 1,0772 g.cm<sup>-3</sup> a 1,0960 g.cm<sup>-3</sup> e 1,3654 g.cm<sup>-3</sup> a 1,6658 g.cm<sup>-3</sup>, respectivamente. Nota-se que há um aumento da massa específica da fase inferior com a elevação das concentrações dos constituintes dos sistemas, no entanto os valores de massa específica da fase superior permanecem próximos ou diminuem ligeiramente com o aumento das concentrações dos constituintes dos sistemas. Na Tabela 6, também é possível observar que a fase inferior, composta majoritariamente por sal e água, é muito mais densa que a fase superior, rica em LI e água, por conseguinte, a formação de fase será mais rápida em razão da grande diferença de densidade entre as fases.

## 5.2. Partição das Proteínas e Recuperação Teórica

Nas Tabelas 7 e 8, são apresentados os valores dos coeficientes de partição e os valores de recuperação teórica (%) da lisozima e da  $\alpha$ -lactoalbumina na fase superior, para os sistemas aquosos formados por LI {[C<sub>2</sub>min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, nos diferentes valores de pH e temperatura. Observa-se que os valores de recuperação teórica são elevados para todos os sistemas avaliados. Sendo que a eficiência de extração está intimamente ligada ao coeficiente de partição, assim quanto maior o K<sub>P</sub>, maior será a recuperação teórica das proteínas na fase superior. Nas Figuras 14 e 15 verifica-se que à medida que o K<sub>P</sub> da lisozima e da  $\alpha$ -la aumentam a recuperação teórica também aumenta. Assim, pode-se dizer que os sistemas formados por LI e fosfato de potássio avaliados neste trabalho são adequados para a concentração da lisozima e da  $\alpha$ -la na fase superior, uma vez que os coeficientes de partição são maiores que a unidade.

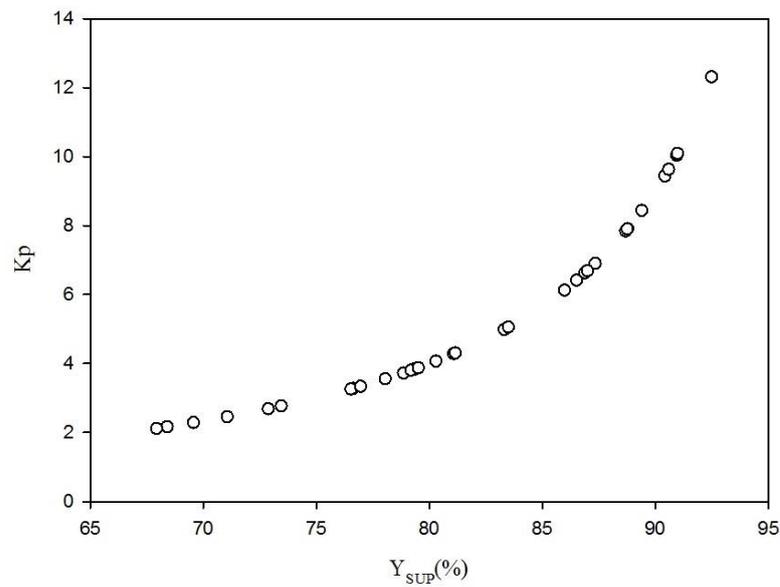
**Tabela 7.** Coeficiente de partição e recuperação teórica da lisozima e CLA nos sistemas formados por LI {[C<sub>2</sub>min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.

pH	LA	20°C			30°C		
		CLA	K <sub>P</sub>	Y <sub>SUP</sub> (%)	CLA	K <sub>P</sub>	Y <sub>SUP</sub> (%)
7,5	1	40,40	3,28	76,63	37,92	6,42	86,52
	2	48,20	3,56	78,05	47,63	7,84	88,69
	3	54,83	4,30	81,13	54,75	7,91	88,78
8,0	1	42,77	6,13	85,98	42,69	3,73	78,86
	2	50,20	9,44	90,42	50,37	7,90	88,76
	3	55,71	12,31	92,49	56,30	10,09	90,98
8,5	1	42,86	6,63	86,89	40,28	4,29	81,08
	2	50,90	8,44	89,40	48,05	6,90	87,34
	3	56,77	10,04	90,94	53,98	9,63	90,59
		40°C			50°C		
7,5	1	50,71	2,77	73,45	54,49	2,17	68,41
	2	58,10	6,69	87,00	58,84	2,29	69,57
	3	64,34	7,90	88,76	62,80	2,46	71,06
8,0	1	47,01	3,26	76,54	56,86	2,12	67,94
	2	54,82	4,07	80,29	59,73	2,69	72,88

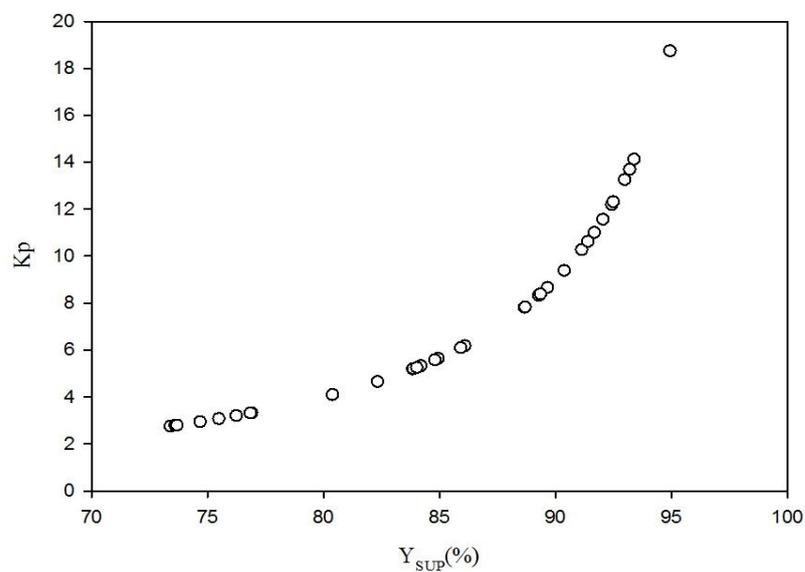
*Continuação. Tabela 7.* Coeficiente de partição e recuperação teórica da lisozima e CLA nos sistemas formados por LI {[C<sub>2</sub>min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.

8,0	3	61,29	4,99	83,31	62,08	3,83	79,30
	1	47,34	3,34	76,96	49,30	3,81	79,19
8,5	2	54,71	3,85	79,37	53,61	3,88	79,51
	3	60,50	5,06	83,50	56,03	4,31	81,15

**Figura 14.** Distribuição da eficiência de extração teórica da lisozima em função do coeficiente de partição.



**Figura 15.** Distribuição da eficiência de extração teórica da  $\alpha$ -la em função do coeficiente de partição.



**Tabela 8.** Coeficiente de partição e recuperação teórica da  $\alpha$ -la e CLA nos sistemas formados por LI {[C<sub>2</sub>min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, em diferentes valores de pH e temperatura.

Ph	LA	20°C			30°C		
		CLA	K <sub>P</sub>	Y <sub>SUP</sub> (%)	CLA	K <sub>P</sub>	Y <sub>SUP</sub> (%)
7,5	1	40,40	2,76	73,40	37,92	2,95	74,69
	2	48,20	5,31	84,15	47,63	5,33	84,21
	3	54,83	5,64	84,93	54,75	6,19	86,10
8,0	1	42,77	2,79	73,59	42,69	3,32	76,85
	2	50,20	5,19	83,85	50,37	5,58	84,80
	3	55,71	8,67	89,66	56,30	6,10	85,91
8,5	1	42,86	2,80	73,71	40,28	3,08	75,51
	2	50,90	3,33	76,93	48,05	3,21	76,24
	3	56,77	4,66	82,32	53,98	4,66	82,32
		40°C			50°C		
7,5	1	50,71	8,33	89,29	54,49	8,39	89,35
	2	58,10	11,57	92,05	58,84	11,01	91,67
	3	64,34	12,20	92,43	62,80	12,32	92,49
8,0	1	47,01	4,10	80,41	56,86	10,27	91,13
	2	54,82	5,20	83,88	59,73	13,26	92,99
	3	61,29	5,26	84,02	62,08	13,70	93,20
8,5	1	47,34	7,82	88,67	49,30	10,63	91,40
	2	54,71	7,84	88,69	53,61	14,13	93,39
	3	60,50	9,39	90,37	56,03	18,75	94,94

### 5.2.1. Influência da Temperatura e do pH na Partição das Proteínas

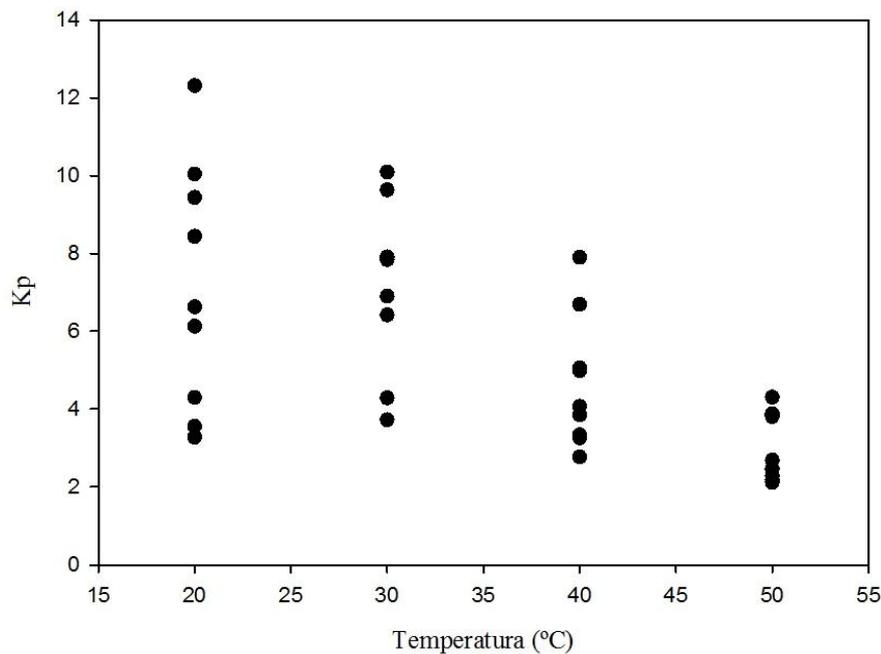
Em geral, os efeitos da temperatura sobre o fracionamento de proteínas em SAB podem ser bastante complexos. A temperatura pode alterar a forma da curva binodal, conduzir a mudanças conformacionais na estrutura da proteína ou mesmo resultar na desnaturação da mesma (BASKIR et al., 1989). Portanto, o efeito da temperatura sobre a partição de lisozima e  $\alpha$ -la baseadas no SAB com LI foi investigado. Um aumento da temperatura pode resultar numa alteração da estrutura da proteína ou mesmo resultar na desnaturação da proteína. Proteínas desnaturadas, geralmente, particionam de modo

diferente em SAB do que em seu estado nativo, devido à área da superfície exposta ser significativamente maior e mais hidrofóbica (ALBERTSSON, 1986).

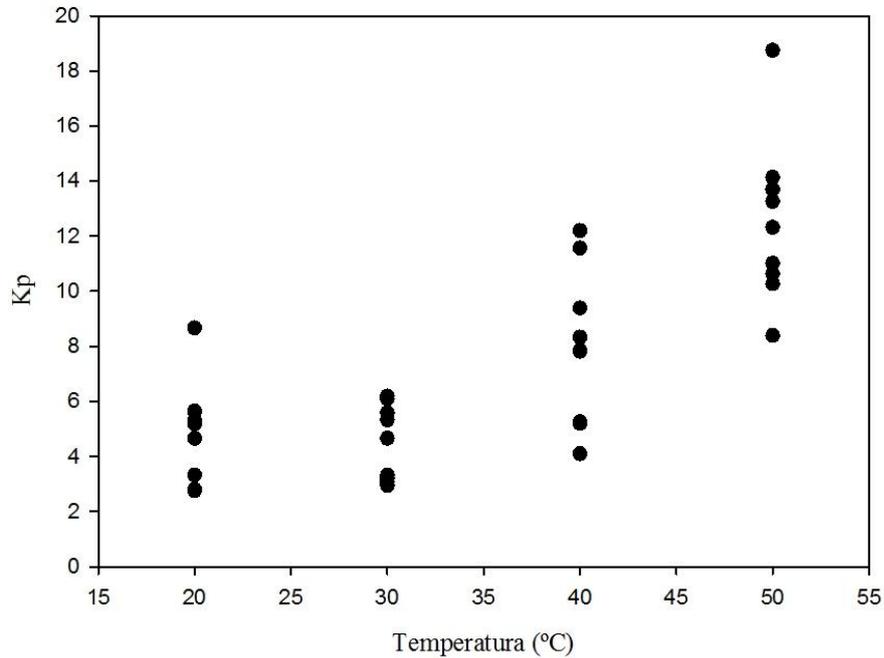
De acordo com a Figura 16, pode-se observar que o coeficiente de partição da lisozima diminui com o aumento da temperatura, sendo as temperaturas de 20 °C e 30 °C as mais adequadas para extraí-la nos sistemas [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio. Dreyer et al. (2009) ao particionar lisozima no SAB composto por LI Ammoeng<sup>TM</sup> 110 e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, também observaram uma diminuição da extração com o acréscimo da temperatura. Já para a α-la o aumento da temperatura favorece a sua partição na fase superior, ou seja, o coeficiente de partição aumenta (Figura 17).

O efeito do comprimento da linha de amarração no coeficiente de partição das proteínas nos sistemas estudados é apresentado nas Figuras 18 e 19. Com o aumento do CLA, houve uma maior partição da lisozima e da α-la para a fase superior para todos os sistemas estudados. À medida em que se aumenta a concentração de LI e sal, o número de interações envolvidas entre o LI e a proteína aumenta, resultando em um maior coeficiente de partição, ou seja, uma maior transferência de proteína para a fase rica em LI devido à interação hidrofóbica entre a proteína e o LI.

**Figura 16.** Distribuição dos coeficientes de partição da lisozima nos SAB formados por [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio, em diferentes temperaturas.



**Figura 17.** Distribuição dos coeficientes de partição da  $\alpha$ -la nos SAB formados por [C<sub>2</sub>min]Cl-Fosfato de potássio, em diferentes temperaturas.

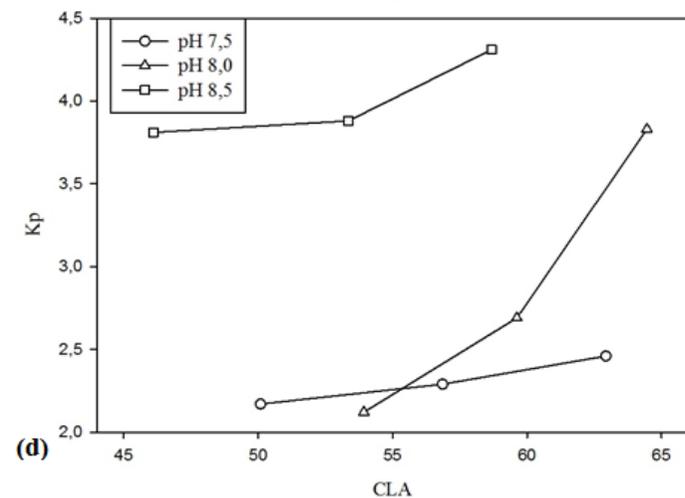
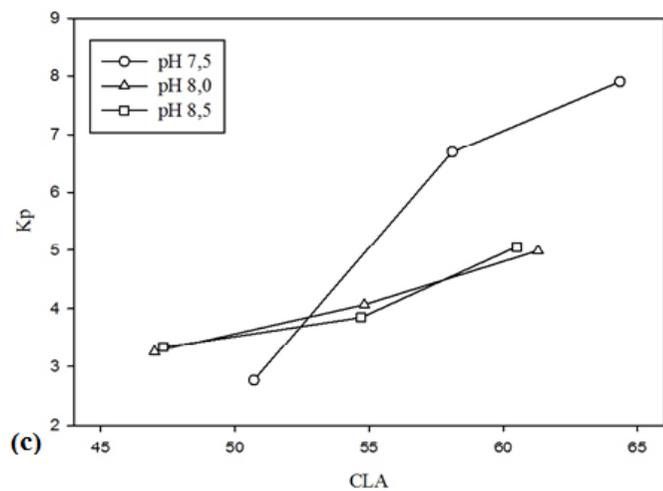
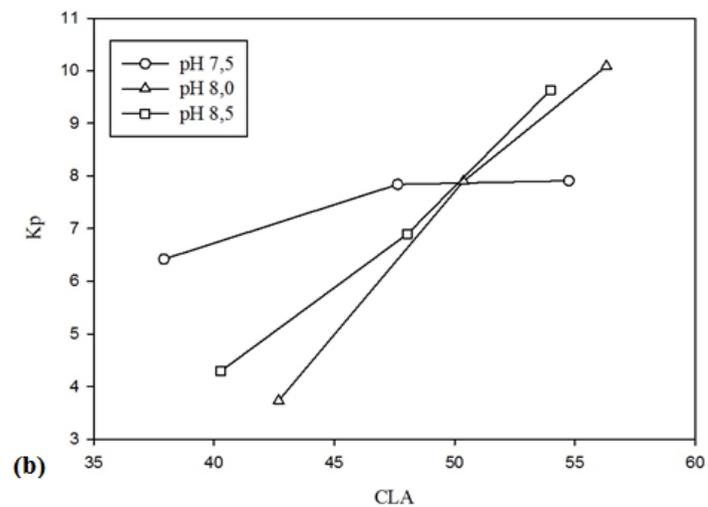
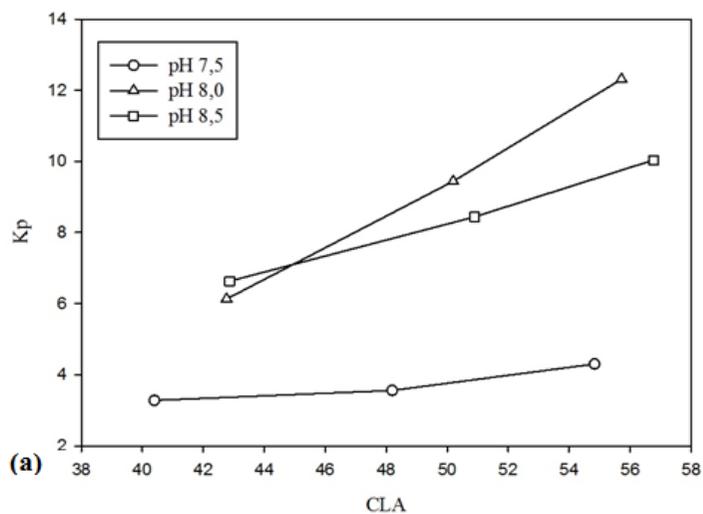


O valor de pH é outro fator importante que afeta a separação de proteínas em SAB's à base de LI, uma vez que a carga líquida das proteínas pode ser afetado pelo valor de pH das fases aquosas (Dreyer et al., 2009). De acordo com a Figura 18, pode-se observar que nas temperaturas de 20 °C (Figura 18a) e 50 °C (Figura 18d) à medida em que se aumenta o valor do pH, o coeficiente de partição da lisozima aumenta. No entanto, na temperatura de 40 °C (Figura 18c) o comportamento oposto foi observado. Já para a temperatura de 30 °C, não há um comportamento definido, podendo-se dizer que a variação do pH nessa temperatura, não interfere no coeficiente de partição da lisozima e sim a concentração dos constituintes das fases associado à temperatura de 30 °C.

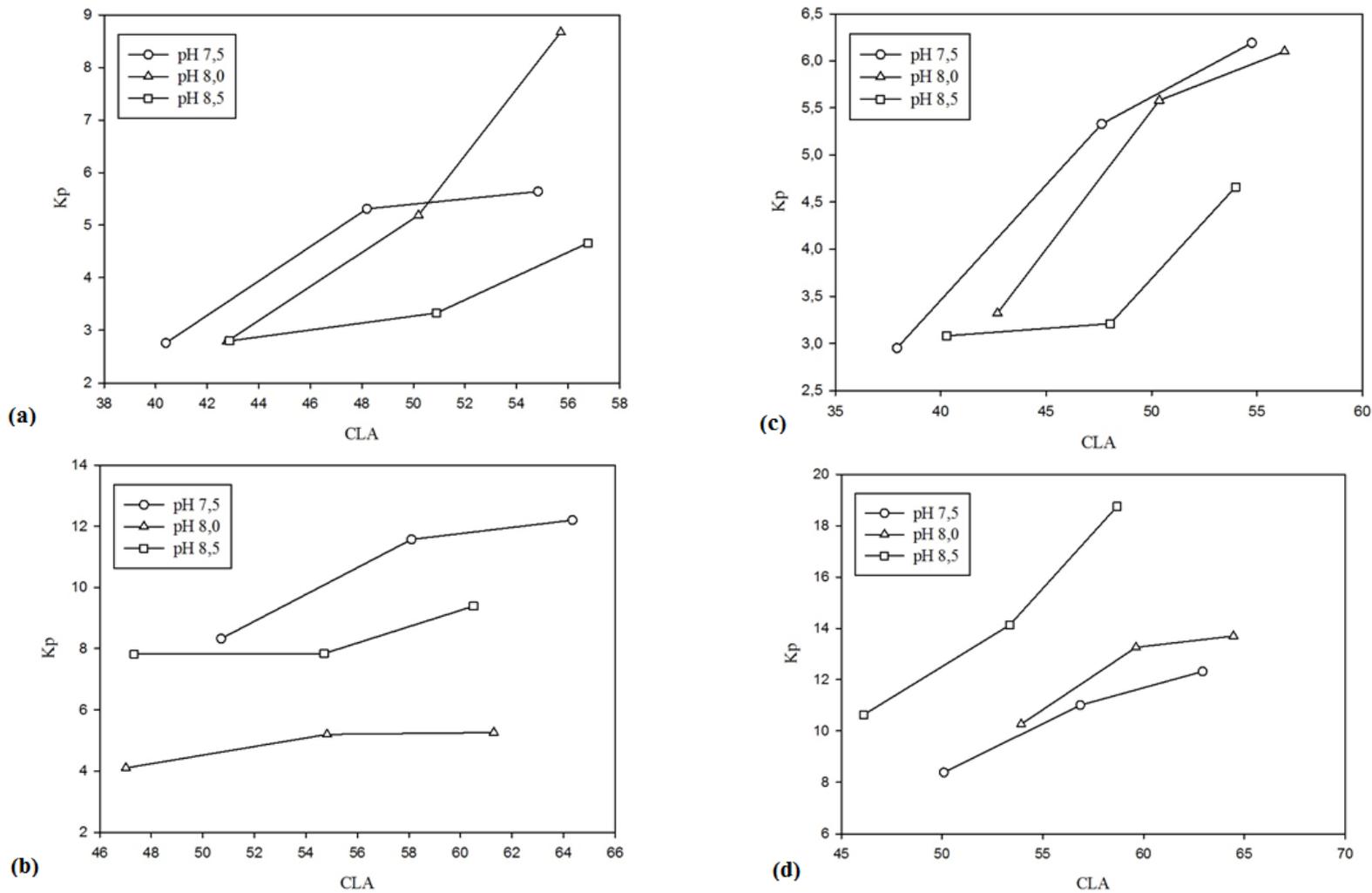
Ao se estudar a influência do pH no coeficiente de partição da  $\alpha$ -la, nota-se que nas temperaturas de (20, 30 e 40) °C (Figura 19a, b e c) o coeficiente de partição quase sempre aumenta com a diminuição dos valores de pH, semelhante ao comportamento observado para a lisozima na temperatura de 40 °C. No entanto, na temperatura de 30 °C quando diminui o pH de 8,5 para 8,0, há uma redução do Kp ao invés de aumentar. Já na temperatura de 50 °C (Figura 19d) o Kp da  $\alpha$ -la se comporta de forma diferente, tendo o seu valor aumentado com o aumento dos valores de pH, sendo que os maiores coeficientes de partição da  $\alpha$ -la nos sistemas estudados foram nessa temperatura.

Para que se possa entender melhor o comportamento de partição de solutos em SAB, devem-se compreender as interações intermoleculares que ocorrem no processo de transferência entre as fases. Seria necessário um estudo mais aprofundado, para que se possa discutir o fator que rege a partição da lisozima e da  $\alpha$ -la, na fase rica em LI. A diferença de potencial eletrostático entre as fases coexistentes, efeito *salting-out*, pH, e interações hidrofóbicas são fatores que afetam o particionamento de proteína em SAB's.

**Figura 18.** Influência do comprimento da linha de amarração e do pH no coeficiente de partição da lisozima. (a) 20 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C e (d) 50 °C.



**Figura 19.** Influência do comprimento da linha de amarração e do pH no coeficiente de partição da  $\alpha$ -lactoalbumina. (a) 20 °C, (b) 30 °C, (c) 40 °C e (d) 50 °C.



## 6. CONCLUSÃO

Foram determinados dados de equilíbrio para sistemas aquosos formados por LI {[C<sub>2</sub>min]Cl} + Fosfato de Potássio + Água, nas temperaturas de (20, 30, 40, 50) °C nos valores de pH 7,5, 8,0 e 8,5. Constatou-se que o efeito da temperatura sobre os sistemas não apresentou variações na região bifásica. Houve um aumento na inclinação da linha de amarração à medida que a temperatura diminuía, podendo dizer que ocorreu transferência das moléculas de água da fase superior para a fase inferior. Pôde-se também constatar que o aumento do pH ocasionou um aumento da região bifásica em todas as temperaturas de estudo.

Os sistemas aquosos bifásicos analisados neste trabalho podem ser uma alternativa para a partição das proteínas lisozima e  $\alpha$ -lactoalbumina. Particionando preferencialmente para a fase superior, rica em LI.

O coeficiente de partição de lisozima diminui com o aumento da temperatura, enquanto o da  $\alpha$ -la aumenta. Ao fixar a temperatura, observou-se que nas temperaturas de 20 °C e 50 °C o K<sub>p</sub> da lisozima aumenta à medida em que se aumenta os valores de pH; já para a temperatura de 40 °C o comportamento oposto foi observado. No entanto, o K<sub>p</sub> da  $\alpha$ -la nas temperaturas de (20, 30 e 40) °C quase sempre aumenta com a diminuição dos valores de pH; enquanto na temperatura de 30 °C quando diminui o pH de 8,5 para 8,0, há uma redução do K<sub>p</sub> ao invés de aumentar. Já na temperatura de 50 °C o K<sub>p</sub> da  $\alpha$ -la se comporta de forma diferente, tendo o seu valor aumentado com o aumento dos valores de pH, sendo que os maiores coeficientes de partição da  $\alpha$ -la nos sistemas estudados foram nessa temperatura.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. **Aqueous Polymer-phase Systems Partition of Cell Particles and Macromolecules**, 3rd edition, Wiley, New York, 1986.
- ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; GODDARD, E. D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. **Langmuir**, v.3, p.25-31, 1987.
- BAMBERGER, S. *et al.* Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties. In; BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISCHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase system**. Academic Press, Orlando, 1985.
- BASAR, N. *et al.* Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.41, p.234-242, 2007.
- BASKIR, J. N.; HATTON, T. A.; SUTER, U. W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, n.4, p. 541-558, 1989.
- BERNARDO, R.A. *et al.* Rapid determination of lactulose in milk by microdialysis and biosensors. **Analyst**, v.124, p.325–329, 2000.
- BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem.**, n.72, p.248, 1976.
- BRAMAUD, C.; AIMAR, P.; DAVEEE, G. Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.56, p.391-397, 1997.
- CARVALHO, C. **Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol, Sais e Água**. Viçosa, 2004. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- CANFIELD, R. E. The amino acid sequence of egg white lysozyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.238, n.8, p.2698-2707, 1963.
- 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.
- COIMBRA, J. S. R.; TEIXEIRA, J. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**. Boca-Raton, CRC Press, 2009.

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Xylanase Recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental desing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 629, p.70-72, 1998.

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Partitionig of xylanolitic complex from *Penicillium janthinellum* by na aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.339-348, 2000.

CUNNINGHAM, F. E.; PROCTOR, V. A.; GOETSCH, S. J. Egg white lysozyme as a food preservative: an overview. **World's Poultry Science Journal**, v.47, p.141-163, 1991.

DA 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.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. **Aqueous Two Phase Systems for Biomolecule Separation. Advances in Biochemical Engineering**, Fiechter, A. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, v.47, p.89-135, 1992.

DING, P. *et al.* Interfacial Tension in Phase-Separated Gelatin/Dextran Aqueous Mixtures. **Journal Colloid Interface Science**, v.253, p.367-372, 2002.

DING, J.; WELTON, T.; ARMSTRONG, D.W. Chiral ionic liquids as stationary phases in gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v.76, p.6819-6822, 2004.

DISMER, F.; HUBBUCH, J. A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins. **Journal of Chromatography A**, v.1149, 312-320, 2007.

DREYER, S.; SALIM, P.; KRAGL, U. Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v.46, p.176-185, 2009.

DU, Z.; YU, Y. L.; WANG, J. H. Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two-phase system. **Chemistry-a European Journal**, v.13, n.7, p. 2130-2137, 2007.

DUPONT, J.; DE SOUZA, R. F.; SUAREZ, P. A. Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis [J]. **Chemical Reviews.**, v.102, p. 36-67, 2002.

FADEEV, A. G.; MEAGHER, M. M. Opportunities for ionic liquids in recovery of bifuels. **Chemical Commun.**, p. 295-296, 2001 .

- FARIA, J. T. *et al.* Use of response surface methodology to evaluate the extraction of *Debaryomyces hansenii* xylose reductase by aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v.877, n.27, p.3031-3037, 2009.
- FREIRE, M. G. *et al.* Ion Specific Effects on the Mutual Solubilities of Water and Hydrophobic Ionic Liquids. **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, p.202–211, 2009.
- FREIRE, M. G. *et al.* H-1 NMR and Molecular Dynamics Evidence for an Unexpected Interaction on the Origin of Salting-In/Salting-Out Phenomena. **Journal of Physical Chemistry B**, v.114, n.5, p. 2004-2014, 2010.
- FORCINITI, D.; HALL, C. K.; KULA, M. R. Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v.61, p.243-262, 1991.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Ireland: Blackie Academic & Professional, 1998, 478p.
- FRANZOI, A.C. *et al.* Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1042-1050, 2011.
- FUGLSANG, C.C. *et al.* Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.390-396, 1995.
- FUKUSHIMA, T. *et al.* Molecular Ordering of Organic Molten Salts Triggered by Single-Walled Carbon Nanotubes. **Science**, v.300, p.2072-2074, 2003.
- GUCHTE, M. *et al.* Lysozyme expression in *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.216-224, 1992.
- GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.255-258, 2000.
- GUTOWSKI, K.E. *et al.* Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, n.22, p.6632-6633, 2003.
- HAN, J. *et al.* (Liquid + liquid) equilibrium of (imidazolium ionic liquids + organic salts) aqueous two-phase systems at T = 298.15 K and the influence of

salts and ionic liquids on the phase separation. **Journal Chemical Thermodynamics**, v. 45, p.59-67, 2012.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteína do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.479-488, 2006.

HATTI-KAUL, R. **Aqueous Two-Phase Systems Methods and Protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000.

HATTI-KAUL, R. Aqueous Two-phase Systems: A General Overview. **Molecular Biotechnology**, v.19, p.269-277, 2001.

HE, C. *et al.* Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **Journal Chromatography A**, v.1082, p.143, 2005.

HU, M. *et al.* Liquid-Liquid and Solid-Liquid Equilibrium of the Ternary System Ethanol + Cesium Sulfate + Water at (10, 30, and 50) °C. **Journal Chemical and Engineering Data**, v.48, n.6, p.1561-1564, 2003.

HUDDLESTON, J. G. *et al.* Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid-liquid extraction. **Chemical Communications**, n.16, p.1765-1766, 1998.

JOHANSSON, H-O. *et al.* Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-poly(acrylate) aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v.62, n.1, p.166-174, 2008.

JORK, C. *et al.* Influence of ionic liquids on the phase behavior of aqueous azeotropic systems. **Journal Chemical and Engineering Data**, v.49, n.4, p. 852-857, 2004.

KABIRI-BADR, M.; CABEZAS JR., H. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v.115, n.2, p. 39-58, 1996.

KRONER, K. H. *et al.* Technical aspects of separation using aqueous two-phase systems in enzyme isolation processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1967-1988, 1978.

LEE-HUANG, S. *et al.* Lysozyme and RNAses as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v.96, p.2.678-2.681, 1999.

- LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v.50, n.1, p. 63-68, 2002.
- LI, S.H. *et al.* Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.826, n.1-2, p.58-62, 2005.
- LIU, J. *et al.* Disposable ionic liquid coating for headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in paints followed by gas chromatography–flame ionization detection. **Journal Chromatography A**, v.1066, p.27-32, 2005.
- LOUROS, C. L. S. *et al.* Extraction of Biomolecules Using Phosphonium-Based Ionic Liquids + K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Aqueous Biphasic Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n.4, p.1777-1791, 2010.
- LUO, H. M.; DAI, S.; BONNESEN, P. V. Solvent extraction of Sr<sup>2+</sup> and Cs<sup>+</sup> based on room-temperature ionic liquids containing monoaza-substituted crown ethers. **Analytical Chemistry**, v.76, p.2773-2779, 2004.
- MANK, M.; STAHL, B.; BOEHM, G. 2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine and other ionic liquid matrixes for enhanced MALDI-MS analysis of biomolecules. **Analytical Chemistry**, v.76, p.2938-2950, 2004.
- MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation. Studies on phase inversion. **Journal Chromatography B**, v.711, p.285-293, 1998.
- MEI, L.H. *et al.* Densities and viscosities of polyethylene glycol + salt + water systems at 20 °C. **Journal Chemical Engineering Data**, v.40, p.1168-1171, 1995.
- MOURÃO, T. *et al.* Evaluation of the impact of phosphate salts on the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. **Journal Chemical Thermodynamics**, v.54, p.398-405, 2012.
- NAN, Y. Q.; LIU, H. L.; HU, Y. Interfacial tension in phase-separated aqueous cationic/anionic surfactant mixtures. **Journal Colloid and Interface Sci.**, v.293, p.464–474, 2006.

- NEVES, C. *et al.* Evaluation of Cation Influence on the Formation and Extraction Capability of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems. **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.15, p.5194-5199, 2009.
- OLIVEIRA, L.A. *et al.* Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.766, p.27-36, 2001.
- OLIVEIRA, G. G. G. *et al.* Partition behavior and partial purification of hexoquinase in aqueous twophase polyethylene glicol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105-108, p.787-797, 2003.
- PADGETT, T.; HAN, I. Y.; DAWSON, P. L. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **Journal of Food Protection**, v.61, p.1.330-1.335, 1998.
- PEI, Y. *et al.* Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. **Separation Purification Technology**, v.64, n.3, p.288-295, 2009.
- PERUMALSAMY, M.; BATHMALAKSHMI, A.; MURUGESAN, T. Experiment and Correlation of Liquid-Liquid Equilibria of an Aqueous Salt Polymer System Containing PEG6000 + Sodium Citrate. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.52, p.1186-1188, 2007.
- PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Editora Manole Ltda, São Paulo, 2005.
- PICÓ, A. *et al.* Poly (ethylene glycol) molar mass and polydispersivity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.830, p.286-292, 2008.
- QASBA, P. K.; KUMAR, S. Molecular divergence of lysozymes and alphasalactalbumin. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, n.4, p.255-306, 1997.
- SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 48, p.187-188, 2001.
- SELBER, K. *et al.* Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, v.10, p.229-236, 2001.
- SIGMA-ALDRICH. Catálogo de 2001.

- TOMÉ, L. I. N. *et al.* Tryptophan extraction using hydrophobic ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, v.72, n.2, p.167-173, 2010.
- TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v.799, p.293-301, 2004.
- VENTURA, S. P. M. *et al.* Design of ionic liquids for lipase purification. **Journal of Chromatography B**, v.879, p.2679-2687, 2011.
- WALTER, H.; BROOKS, D. E.; FISHER, D. **Partition in Aqueous Two-Phase Systems**. Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology. Orlando, FL: Academic, 1985.
- WANG, Y.; MAO, Y.; HAN, J.; LIU, Y.; YAN, Y. Liquid-Liquid Equilibrium of Potassium Phosphate/Potassium Citrate/Sodium Citrate + Ethanol Aqueous Two-Phase Systems at (298.15 and 313.15) K and Correlation. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.55, p. 5621-5626, 2010.
- WELTON, T. Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. **Chemical Rev.**, v.99, p. 2071-2084, 1999.
- WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Analytica Chimica Acta**, v.607, n.2, p.126-135, 2008.
- WETTER, L. R.; DEUTSCH, H. F. Immunological studies on egg white proteins. IV. Immunochemical and physical studies of lysozyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.192, n.1, 237-242, 1951.
- YU, C. *et al.* Liquid-liquid equilibrium composed of imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids + sodium carbonate aqueous two-phase systems and correlation at(288.15, 298.15, and 308.15) K. **Thermochimica Acta**, v.523, p.221-226, 2011.
- VAHER, M.; KOEL, M. Specific background electrolytes for nonaqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.1068, p.83-88, 2005.
- VENTURA, S. P. M. *et al.* Evaluation of Anion Influence on the Formation and Extraction Capacity of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems. **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.27, p.9304-9310, 2009.
- ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical chemistry and bioanalytical**. Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.

ZHAO, F. *et al.* **Anal. Chemical**, v.76, p.49-60, 2004.

ZHAO, H.; XIA, S. Q.; MA, P. S. Use of ionic liquids as 'green' solvents for extractions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.80, n.10, p.1089-1096, 2005.

ZUNIGA, A. D. Z. *et al.* Interfacial Tension and Viscosity for Poly(ethylene glycol) + Maltodextrin Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.51, p.1144-1147, 2006.