



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

DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS COMPOSTOS POR PEG (1500 E 4000), CITRATO DE SÓDIO E
ÁGUA E APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO DA α -AMILASE

MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO

ITAPETINGA – BA
FEVEREIRO 2017

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

DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS COMPOSTOS POR PEG (1500 E 4000), CITRATO DE SÓDIO E
ÁGUA E APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO DA α -AMILASE

MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO

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^a. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

CO-ORIENTADORES:

Prof^a. DSc. Cristiane Martins Veloso

Prof. DSc. Sérgio de Souza Castro

ITAPETINGA-BA
FEVEREIRO 2017

634.7 Nascimento, Manuela Barreto do
N196d Dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG (1500 e 4000), citrato de sódio e água e aplicação na partição da α -amilase. / Manuela Barreto do Nascimento. - Itapetinga: UESB, 2017.
82p.

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. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e coorientação da Prof^a. D.Sc. Cristiane Martins Veloso e Prof. D.Sc. Sérgio de Souza Castro.

1. Enzima. 2. Sistemas aquosos bifásicos - Dados de equilíbrio. 3. Sistemas aquosos bifásicos - Temperatura. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Veloso, Cristiane Martins. IV. Castro, Sérgio de Souza. V. Título.

CDD(21): **634.7**

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

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Enzima.
2. Sistemas aquosos bifásicos - Dados de equilíbrio
3. Sistemas aquosos bifásicos - Temperatura



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: DADOS DE EQUILIBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR PEG (1500 E 4000), CITRATO DE SÓDIO E ÁGUA E APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO DE α -AMILASE.

Autor (a): MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo

Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

Prof.^o Dr. Sérgio de Souza Castro

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo (UESB)

Prof.^o Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan (UESB)

Prof.^a Dr.^a Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo (UFLA)

Itapetinga-BA, 21 de fevereiro de 2017.

“Coisas boas nos acontecem quando a gente acredita, quando a gente tem fé, quando a gente coloca Deus a frente da nossa vida. Dificuldades todos nós temos, a diferença é que uns assumem, uns desistem de lutar e outros lutam por ainda acreditar” Cecilia Sfalsin

Aos meus pais que fizeram tudo para que o meu sonho se realizasse, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por dar-me fortaleza e fé em todo momento para que eu pudesse vencer mais uma etapa.

Aos meus pais, Carlinhos e Cida, pela confiança depositada nesses anos distante de casa, pelas orações, amor e força, obrigada! Sem vocês nada disso seria possível!

À minha irmã, Mayana e a toda minha família pela torcida e compreensão nos momentos de ausência.

A Tony, pelo amor, compreensão e companheirismo.

À Laís pela amizade, companhia e cuidados nesse último ano.

À Renata Bonomo pela orientação, paciência, pelos conhecimentos compartilhados e, além de tudo, por ter influenciado no meu crescimento pessoal e profissional.

À Cristiane Veloso pela coorientação.

A Sérgio Castro pelas inúmeras contribuições nesse trabalho e pela excelente coorientação.

Aos professores Rafael Fontan, Vanessa Sampaio e Evaldo Cardoso, por toda ajuda e sugestões.

Aos colegas do LEP agradeço pela amizade e carinho, em especial à Olga.

Aos companheiros de mestrado pela amizade e momentos de descontrações vividos, em especial a Michelle, Rui e Ivonéia.

À “turma dos SAB’s”: Dani, Izabella, Raquel e Annie pela grande ajuda e amizade.

Aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite em contribuir com esse trabalho.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela oportunidade e condições de realização do experimento.

À FAPESB pela bolsa concedida, possibilitando a dedicação exclusiva para a execução do projeto de pesquisa.

E a todos que não foram citados mas que, direta ou indiretamente, fizeram parte desse trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

NASCIMENTO, M. B. **Dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG (1500 e 4000), citrato de sódio e água e aplicação na partição da α -amilase.** Itapetinga – BA: UESB, 2017. 82 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). *

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol (1500 ou 4000) + citrato de sódio + água nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0, nas temperaturas de 30 °C e 40 °C e aplicá-los para a partição da α -amilase, além da, obtenção de parâmetros termodinâmicos. As curvas binodais dos sistemas aquosos bifásicos contendo PEG (1500 ou 4000) + citrato de sódio + água nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0, nas temperaturas de 30 °C e 40 °C foram obtidas mediante a técnica turbidimétrica e as linhas de amarração foram determinadas por meio da regra da alavanca. Os resultados indicam que não há efeito da temperatura na formação da região bifásica. No entanto, quanto maior o valor do pH e a massa molar do polímero, maior a região bifásica. Em relação às linhas de amarração, para sistemas formados por PEG 1500, não se observou efeito da temperatura sobre a inclinação da linha de amarração (ILA), enquanto que para sistemas formados por PEG 4000 os valores da ILA tenderam a aumentar com o aumento da temperatura. Utilizou-se os dados experimentais das linhas de amarração para estimar os parâmetros de interação de grupo para o modelo UNIFAC. Em pH 4,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C notou-se os menores desvios. Observou-se também que com o aumento dos valores de pH o volume de exclusão apresentou uma tendência a aumentar, esses valores foram comprovados com base nos resultados da energia de interação. Posteriormente foi realizada a partição da α -amilase e constatou-se ao observar que em pH 4,0 a α -amilase possuía uma forte tendência em se transferir para a fase rica em polímero. Em pH 5,0 α -amilase teve afinidade com a fase inferior rica em sal. Ao avaliar o valor de pH 6,0 o coeficiente de partição da enzima aumentou com a redução da temperatura a 30 °C. Já em pH 7,0 pôde-se verificar que o coeficiente de partição aumentou com a temperatura. A partir dos valores estimados para a energia livre de Gibbs ($\Delta_r G$) para a partição da α -amilase observou-se que a transferência das proteínas para a fase polimérica em pH 4,0, em ambas as temperaturas, é um processo espontâneo. Já em pH 5,0 é um processo não espontâneo. Ao determinar a variação da entalpia e da entropia da partição da α -amilase, verificou-se que, tanto em pH 4,0 quanto em pH 7,0 a partição foi entropicamente dirigida para a fase superior. Assim sendo, conclui-se que os SAB's em estudo pode ser uma alternativa para a pré-concentração da enzima α -amilase, uma vez que estes proporcionam a separação da mesma.

Palavras chaves: Enzima; dados de equilíbrio; temperatura e UNIFAC.

* Orientador: DSc. UESB. Renata Cristina Ferreira Bonomo; Co-orientadores: DSc. UESB. Cristiane Martins Veloso; DSc. UESB, Sérgio de Souza Castro.

ABSTRACT

NASCIMENTO, M. B. **Liquid-liquid equilibrium data of biphasic aqueous systems composed of PEG (1500 and 4000), sodium citrate and water and application to the α -amylase partition.** Itapetinga – BA: UESB, 2017. 82 p. (Dissertation – Master's in Engineering and Food Science).*

The present work had the objective of obtaining equilibrium data of aqueous two phase systems composed by polyethylene glycol (1500 or 4000) + sodium citrate + water at pH values 4,0, 5,0, 6,0 and 7,0, at temperatures of 30 °C and 40 °C and apply them to the α -amylase partition, and thermodynamic studies. The biphasic biphasic curves containing PEG (1500 or 4000) + sodium citrate + water at pH 4,0, 5,0, 6,0 and 7,0 at temperatures of 30 °C and 40 °C were obtained using the turbidimetric technique and the mooring lines were determined by means of the lever rule. The results indicate that there is no effect of temperature on the formation of the biphasic region. However, the higher the pH value and the molar mass of the polymer, the greater the biphasic region. In relation to the mooring lines, for systems formed by PEG 1500, no effect of the temperature on the slope of the mooring line (STL) was observed, whereas for systems formed by PEG 4000 the STL values tended to increase with increasing temperature. The experimental data from the mooring lines were used to estimate the group interaction parameters for the UNIFAC model. At pH 4,0 at temperatures of 30 °C and 40 °C, the smallest deviations were noted. It was also observed that with increasing pH values the exclusion volume showed a tendency to increase, these values were proved based on the results of the interaction energy. Subsequently, α -amylase partition was performed and it was observed that at pH 4,0 α -amylase had a strong tendency to transfer to the polymer rich phase. At pH 5,0 α -amylase it had affinity for the salt-rich lower phase. When the pH value 6,0 was evaluated, the partition coefficient of the enzyme increased with the reduction of the temperature to 30 °C. At pH 7,0 it was possible to verify that the partition coefficient increased with temperature. From the estimated values for the Gibbs free energy ($\Delta_{tr}G$) for the α -amylase partition, it was observed that the transfer of the proteins to the polymer phase at pH 4,0 at both temperatures is a spontaneous process. Already at pH 5,0 is a non-spontaneous process. When determining the enthalpy and entropy variation of the α -amylase partition, it was found that at both pH 4,0 and pH 7,0 the partition was entropically directed to the upper phase. Thus, it is concluded that the SAB's under study may be an alternative for the pre-concentration of the α -amylase enzyme, since they provide the separation of the same.

Keywords: Enzyme; equilibrium data; temperature and UNIFAC.

* Advisor(a): **DSc.** UESB. Renata Cristina Ferreira Bonomo; Co-advisors: **DSc.** UESB. Cristiane Martins Veloso; **DSc.** UESB, Sérgio de Souza Castro.

ÍNDICE

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Sistemas Aquosos Bifásicos	14
2.2 Diagrama de Equilíbrio de Fases	15
2.3 Coeficiente de Partição	17
2.4 Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB	18
2.4.1 Efeito da Temperatura	18
2.4.2 Efeito do pH	18
2.4.3 Efeito da massa molar.....	19
2.5 Componentes dos Sistemas.....	19
2.5.1 PEG.....	19
2.5.2 Sal.....	20
2.6 Aplicação dos sistemas aquosos bifásicos na separação de enzimas.....	21
2.7 Enzimas.....	21
2.8 Enzimas amilolíticas	22
2.9 Aplicação das α -Amilases na Indústria.....	22
2.10 Métodos de Purificação da Amilase	23
2.11 Modelos Termodinâmicos	24
2.11.1 Métodos de contribuição de grupos.....	24
2.11.2 UNIFAC	24
2.12 Microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC)	27
3 OBJETIVO GERAL.....	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Materiais	30
4.2 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos	30
4.2.1 Determinação das Curvas Binodais.....	30
4.2.2 Determinação das Linhas de Amarração	31
4.2.3 Determinação dos Componentes do Sistema.....	32

4.2.4	Determinação da Massa Específica	33
4.2.5	Modelagem termodinâmica	33
4.2.6	Partição da α -amilase em Sab's	34
4.2.7	Eletrofore em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS - PAGE).....	36
4.2.8	Estudo microcalorimétrico do sistema	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Diagramas de Equilíbrio	38
5.1.1	Efeito da Temperatura nos Diagramas de Equilíbrio	39
5.1.2	Efeito do pH nos Diagramas de Equilíbrio.....	41
5.1.3	Efeito da Massa Molar nos Diagramas de Equilíbrio.....	42
5.1.4	Estudo do Comportamento das Linhas de Amarração	45
5.2	Estimativa de parâmetros	55
5.3	Volume de exclusão	59
5.4	Partição da α -amilase	60
5.5	Análise termodinâmica da partição.....	63
5.5.1	Determinação da variação da Entalpia e da Entropia da partição da α -amilase.....	65
6	CONCLUSÃO.....	67
7	REFERÊNCIAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema para formação de um SAB composto por polímero e sal.....	14
Figura 2. Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.....	16
Figura 3. Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.....	20
Figura 4. Microcalorímetro de titulação isotérmica (ITC).	28
Figura 5. Gráfico de potência em função do tempo referente a transferência da α -amilase.	28
Figura 6. Diagrama de fases do sistema PEG 1500 + Citrato de Sódio + água, a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d), em diferentes temperaturas.	39
Figura 7. Diagrama de fases do sistema PEG 4000 + Citrato de Sódio + água, a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d), em diferentes temperaturas.	40
Figura 8. Diagrama de fases para sistemas formados por PEG + Citrato de sódio + Água, para o PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b), na temperatura de 30 °C.....	42
Figura 9. Diagrama de fases para sistemas formados por PEG + Citrato de sódio + Água, para o PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b), na temperatura de 40 °C.....	42
Figura 10. Diagrama de fases do sistema PEG + Citrato de Sódio + água, em pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d), na temperatura de 30 °C em diferentes massas molares do polímero.....	43
Figura 11. Diagrama de fases do sistema PEG + Citrato de Sódio + água, em pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d), na temperatura de 40 °C em diferentes massas molares do polímero.....	44
Figura 12. Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração formado por PEG 1500 + Citrato de Sódio + Água a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d).	50
Figura 13. Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração formado por PEG 4000 + Citrato de Sódio + Água a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d).	51
Figura 14. Efeito do pH no CLA e ILA nos sistemas de PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b) na temperatura de 30 °C.	52
Figura 15. Efeito do pH no CLA e ILA nos sistemas de PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b) na temperatura de 40 °C.	52
Figura 16. Efeito da massa molar no CLA e ILA dos sistemas formados por PEG 1500 e PEG 4000 a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d) na temperatura de 40 °C.	53

Figura 17. Efeito da massa molar no CLA e ILA dos sistemas formados por PEG 1500 e PEG 4000 a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d) na temperatura de 30 °C.53

Figura 18. Dados experimentais e preditos pelo modelo UNIFAC para o sistema PEG1500 + citrato de sódio+ água, pH 4,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. SAB's utilizados na separação de biomoléculas.....	21
Tabela 2. Composições globais dos sistemas formados por PEG 1500 + Citrato de Sódio + Água, expressas em porcentagem mássica (%m/m).	31
Tabela 3. Composições globais dos sistemas formados por PEG 4000 + Citrato de Sódio + Água, expressas em porcentagem mássica (%m/m).	32
Tabela 4. Parâmetros Q_k e R_k utilizados nesse trabalho.....	33
Tabela 5. Parâmetros a, b, c, e d e o coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o sistemas PEG- Citrato de Sódio pela equação de HU et al. (2003).	38
Tabela 6. Dados das linhas de amarração em porcentagem mássica (%m/m) dos sistemas formados por PEG 1500 (W_1) + Citrato de Sódio (W_2) + Água, valores da densidade das fases ($\rho/g.cm^{-3}$) e razão de volume das fases (R), em diferentes valores de pH e diferentes temperaturas.....	46
Tabela 7. Dados das linhas de amarração em porcentagem mássica (%m/m) dos sistemas formados por PEG 4000 (W_1) + Citrato de Sódio (W_2) + Água, valores da densidade das fases ($\rho/g.cm^{-3}$) e razão de volume das fases (R), em diferentes valores de pH e diferentes temperaturas.....	47
Tabela 8. Parâmetros de interação de grupo da literatura, parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio, pH 4,0 em temperatura de 30 °C.	55
Tabela 9. Parâmetros de interação de grupo da literatura, parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio, pH 5,0 em temperatura de 30 °C.	56
Tabela 10. Parâmetros de interação de grupo da literatura, parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio, pH 6,0 em temperatura de 30 °C.	56
Tabela 11. Parâmetros de interação de grupo da literatura, parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio, pH 7,0 em temperatura de 30 °C.	57
Tabela 12. Desvios nas composições (UNIFAC) para o PEG 1500.....	58
Tabela 13. Valores calculados do volume de exclusão de sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água, nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 a 30 °C e 40 °C..	59

Tabela 14. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e) e recuperação teórica (% Y) nos sistemas formados por citrato de sódio + PEG 1500 + água no valor de pH 4,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.	60
Tabela 15. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e) e recuperação teórica (% Y) nos sistemas formados por citrato de sódio + PEG 1500 + água no valor de pH 5,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.	62
Tabela 16. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e) e recuperação teórica (% Y) nos sistemas formados por citrato de sódio + PEG 1500 + água no valor de pH 6,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.	62
Tabela 17. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e) e recuperação teórica (% Y) nos sistemas formados por citrato de sódio + PEG 1500 + água no valor de pH 7,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.	63
Tabela 18. Energia livre de transferência $\Delta_{tr}G$ da α -amilase em SAB's formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 a 30 °C e 40 °C...	64
Tabela 19. Propriedades termodinâmicas de transferência da α -amilase em sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água na temperatura de 40 °C.....	65

1 INTRODUÇÃO

Existe uma grande necessidade de técnicas de biosseparações eficientes, efetivas e econômicas em larga escala, que permitam atingir elevado grau de pureza e rendimento de recuperação, mantendo a atividade biológica da molécula, visto que a maior parte dos custos de produção para um produto biológico reside na estratégia de purificação (COSTA *et al.*, 2015).

Os (SAB's) são uma alternativa para a separação, concentração e purificação de moléculas biologicamente ativas, tais como enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros. Apresenta inúmeras vantagens tais como baixa viscosidade, tempo de processo curto, baixo consumo de energia, seletividade favorável, dentre outras (BARRUETO *et al.*, 2015). São compostos de duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente micíveis, que coexistem em equilíbrio promovido pela adição de sólidos solúveis em água, que podem ser dois polímeros, um polímero e um sal, ou dois sais. Além do mais, o elevado conteúdo de água nas fases evita a desnaturação das enzimas (ALBERTSON, 1990; ASENJO *et al.*, 2012).

Contudo, para aperfeiçoar 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. Para cada sistema existe um diagrama de fases que define as proporções entre os componentes formadores das fases. Um modelo termodinâmico que vem sendo utilizado para prever dados de equilíbrio líquido-líquido utilizando métodos de contribuição de grupo é o modelo UNIFAC (UNIQUAC Functional-group Activity Coefficient) e não admite que uma substância consista de moléculas, mas sim de grupos funcionais. Para que o modelo UNIFAC possa ser implementado, é necessário que seja efetuada correlações satisfatórias de dados de atividade obtidos experimentalmente para obter parâmetros que caracterizam interações entre pares de grupos estruturais nos sistemas. Posteriormente, estes parâmetros podem ser utilizados para prever atividades em outros sistemas que não foram estudados experimentalmente mas que contêm os mesmos grupos funcionais (OISHI e PRAUSNITZ, 1978).

Muitos dos SAB's estão sendo utilizados para a concentração e purificação de enzimas, e um grupo de enzimas que tem merecido destaque são as amilases, devido ao seu elevado valor tecnológico. As amilases, uma classe de hidrolases, são vastamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, animais e microrganismos, sendo que, as de origem microbiana são predominantes para aplicação comercial (SINDHU *et al.*, 2017). Estas agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido. Atuam na digestão, como as amilases salivar e pancreática, na germinação de grãos e no crescimento microbiano (KUMARI *et al.*, 2010). Existem diversos tipos de enzimas amilolíticas e elas têm utilizações em vários

tipos de indústrias como a de papel, têxtil, panificação, produção de xaropes, álcool, bebidas, dentre outras.

No entanto, para poder propor uma nova metodologia de extração utilizando SABs, é importante estudar e compreender como acontece a distribuição da α -amilase nestes sistemas e que interações intermoleculares estão presentes durante seu processo de transferência. Isto significa analisar o comportamento dos parâmetros termodinâmicos de transferência (variação de energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{tr}G$), variação de entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H$) e variação de entropia de transferência ($\Delta_{tr}S$) como uma função das propriedades termodinâmicas do sistema (RENGIFO, 2015).

São poucas as pesquisas reportadas na literatura que determinam os processos de purificação da α -amilase utilizando sistemas aquosos bifásicos. Desse modo, objetivou-se neste trabalho obter dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol 1500 g.mol⁻¹ + citrato de sódio + água e polietilenoglicol 4000 g.mol⁻¹ + citrato de sódio + água, nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0, nas temperaturas de 30 °C e 40 °C e aplicá-los para a partição da α -amilase, além de obter propriedades termodinâmicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

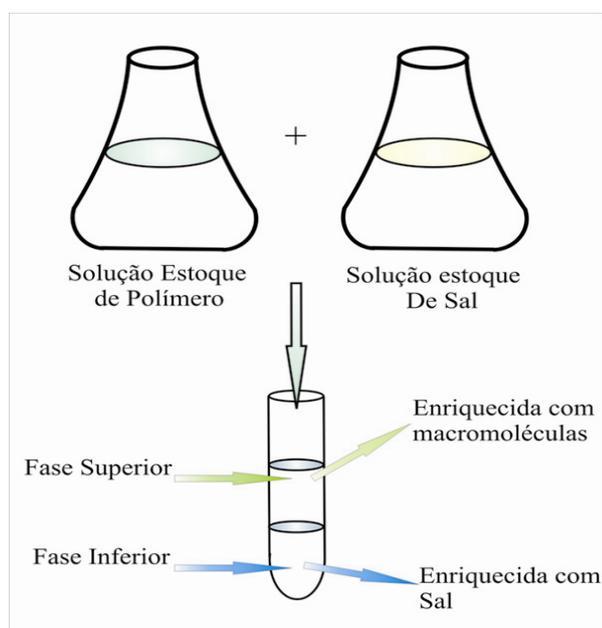
2.1 Sistemas Aquosos Bifásicos

A extração líquido-líquido (ELL) é uma operação muito utilizada na indústria química como técnica de separação. 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 70 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, além destes normalmente serem tóxicos, cancerígenos e inflamáveis (PESSOA e KILIKIAN, 2005).

Assim, uma variante da extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a purificação utilizando sistemas aquosos bifásicos, os quais vem sendo usados com sucesso no isolamento de proteínas e de outras biomoléculas (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009). A técnica de separação por SAB é adequada para purificação de proteínas porque possibilita a separação seletiva, a uma baixa tensão interfacial, boa biocompatibilidade e boa relação custo-benefício.

Sistemas de duas fases aquosas são formados pela combinação de soluções aquosas de polímero-polímero, sal-sal e polímero-sal, que são denominados de sistemas aquosos bifásicos (SAB's). Como mostrado na Figura 1.

Figura 1. Esquema para formação de um SAB composto por polímero e sal.



Fonte: (MARTINS, 2008).

Estes sistemas foram descritos pela primeira vez no final do século 19. Em 1896, Beijerinck, 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. Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 1940, estudaram a miscibilidade de pares de polímeros solúveis em água ou em solventes orgânicos e a ocorrência ou não de separação de fases. No entanto, apenas na década de 1950, Albertsson descreveu SAB's com profundidade, investigando suas propriedades (DA SILVA e LOH, 2006; DIAMOND e HSU, 1992; PATRÌCIO *et al.*, 2011).

A partir destes estudos aprofundaram-se muito as pesquisas nesta área, tornando importante a utilização dos SAB's como ferramenta na partição e/ou concentração de compostos 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).

Segundo Silva e Meirelles (2000), o sistema polímero-polímero mais comum é composto de dextrana e PEG, no entanto, o custo elevado da dextrana inviabiliza o sua utilização em larga escala. Portanto, os sistemas PEG + sais são mais atrativos devido ao baixo custo, rápida separação de fases e baixa viscosidade e assim, ganharam interesse de estudo.

Em geral, ambas as fases são compostas em sua maioria por água, o que explica o porquê das biomoléculas não serem facilmente desnaturadas, constituindo, por conseguinte, uma vantagem importante quando o objetivo é extrair proteínas e/ou enzimas (HATTI-KAUL, 2000; LI *et al.*, 2005). A separação de fases certamente depende do tipo de sal e da respectiva concentração destes, do tamanho da biomolécula, propriedades de superfície, massa molecular, temperatura, pH, carga líquida, entre outros, tendo como princípio básico de estudo os diagramas de fases (LIMA *et al.*, 2002).

2.2 Diagrama de Equilíbrio de Fases

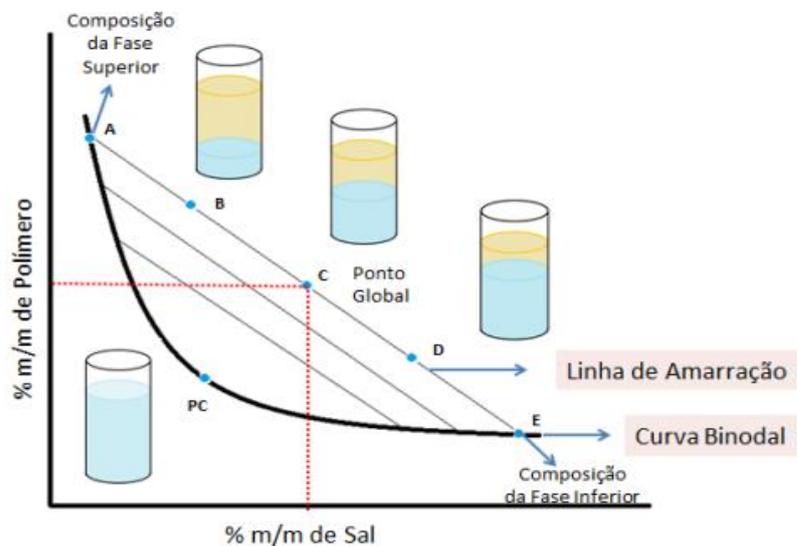
O diagrama de equilíbrio de fases é uma representação gráfica das composições de cada uma das fases dos SAB's, podendo ser de forma triangular ou retangular, sob temperatura e pressão constantes. Segundo Kabiri-Badr e Cabezas JR (1996) estes diagramas são muito importantes para os estudos de separação de biomoléculas, pois são usados como ferramenta básica para o início e desenvolvimento de um processo de extração.

Na Figura 2 está representado um exemplo de um diagrama de fases, mostrando a composição das fases em equilíbrio em coordenadas retangulares.

A curva que divide a região em duas fases é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio, a partir dela pode-se verificar em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo. Os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e

superior, exceto a água, são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença. A posição da binodal varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio. As linhas são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração (LA), ligam pontos no diagrama e representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer ponto global que esteja em uma mesma linha de amarração fornecerão fases que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.) e as propriedades extensivas diferentes (massa, volume, etc.).

Figura 2. Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.



Fonte: (JUNQUEIRA, 2014).

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 (CLA), é um importante parâmetro termodinâmico, utilizado como variável determinante dos processos de partição dos solutos em SAB's formados por diferentes componentes. CLA é a raiz quadrada da soma do quadrado da diferença das concentrações dos componentes formadores do sistema, exceto água, nas fases superior e inferior (NANDINI e RASTOGI, 2011). Sendo assim, o CLA é o tamanho da linha que liga os pontos de diagrama que representa a composição das duas fases em equilíbrio termodinâmico (ALVARENGA *et al.*, 2015). O CLA de sistema de duas fases aquosa é calculado a partir de o seu diagrama de fase, como mostrado na Equação 1.

$$CLA = \sqrt{[\Delta C_1]^2 + [\Delta C_2]^2} \quad (1)$$

Onde: $[\Delta C_1]$ e $[\Delta C_2]$ correspondem a diferença de concentração de componente 1 (C_1) e componente 2 (C_2) nas fases superior e inferior expressa em %m/m, respectivamente. Comumente, o CLA é usado para expressar o efeito da composição do sistema na partição de uma biomolécula e medir as propriedades intensivas entre as fases, quanto maior o valor do CLA maior será a diferença entre essas propriedades.

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 termofísica, como a temperatura e a massa molar dos constituintes, por exemplo (CARVALHO, 2004). O valor da inclinação pode ser calculado pela Equação 2:

$$ILA = (\Delta C_2)/(\Delta C_1) \quad (2)$$

Onde, ΔC_1 são as concentrações do componente 1 na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto, ΔC_2 são as concentrações do componente 2 na fase superior e inferior, respectivamente.

Outro ponto importante de um diagrama de fases é o ponto crítico (P_c), no qual as propriedades dos sistemas são teoricamente iguais. Nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas podem provocar mudanças drásticas, como levar o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986). Segundo Rodrigues (2001), este ponto pode ser obtido pela intersecção de uma linha que passa pelo ponto médio de várias linhas de amarração, com a binodal.

2.3 Coeficiente de Partição

Quando os compostos são adicionados aos SAB's, estes distribuem-se seletivamente entre as duas fases, sendo este processo caracterizado pelo coeficiente de partição (K). O coeficiente de partição é definido pela relação entre a concentração da biomolécula na fase superior e inferior, sendo obtido pela Equação 3 (SOUZA JR. *et al.*, 2014).

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

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

Inúmeras propriedades termodinâmicas do sistema e dos biocompostos influenciam o valor de K . Os fatores associados à biomolécula são o tamanho, a conformação (estrutura

secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade. Além disto, propriedades importantes das fases também contribuem nesta distribuição, como a natureza química dos componentes formadores do SAB, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína, o pH, a temperatura e a adição de sais inorgânicos (CHAIWUT *et al.*, 2010).

2.4 Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB

São diversas as variáveis que influenciam no processo de separação de fases em sistemas aquosos bifásicos, como temperatura, massa molar do polímero, pH, tipo de eletrólito, hidrofobicidade, entre outros. Nessa seção serão abordados os efeitos da temperatura, massa molar do polímero e pH, pois foram as propriedades variadas no presente estudo.

2.4.1 Efeito da Temperatura

Estudos apontam que o aumento da temperatura pode provocar o aumento da região bifásica em diagramas do tipo PEG + sal (AMARESH *et al.*, 2008; REGUPATHI *et al.*, 2009; ZAFARANI-MOATTAR *et al.* 2004). A relação entre o aumento da temperatura e o aumento da região bifásica está associada ao fato de que o processo de separação é endotérmico. Contudo, diversos artigos mostram que a temperatura pode ter um resultado tão pequeno que não há diferença entre as curvas binodais (MARTINS *et al.*, 2008).

Foi observado também para o sistema PEG e sal, que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema (FORCINITI *et al.*, 1991; ZASLAVSKY, 1995). A atração entre as moléculas de PEG aumenta com o aumento da temperatura, enquanto a interação entre as moléculas de PEG e as moléculas de água diminui, isto é, as moléculas de PEG tornam-se mais hidrofóbicas com o aumento da temperatura. Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON *et al.*, 1984; ZASLAVSKY, 1994); outros que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD *et al.*, 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

2.4.2 Efeito do pH

Diminuindo o valor do pH, as concentrações necessárias de polímero e sal de um sistema PEG/sal aumentam, deslocando a curva binodal para a direita. Em relação à partição de proteínas, o pH altera as cargas da superfície das proteínas e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (DA SILVA e LOH, 2006). Dessa maneira, mudanças nos valores de pH podem produzir alterações conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudanças

em seu comportamento de separação. As vezes, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (ALBERTSSON, 1986).

2.4.3 Efeito da massa molar

Os polímeros são conhecidos por terem a capacidade de estabilizar estruturas particuladas e com atividades biológicas. Estudos mostram que o número de monômeros da macromolécula afeta diretamente a área em que o sistema permanece com duas fases. O aumento da massa molar do polímero promove a ampliação da área bifásica, o que foi observado inicialmente por Albertsson (1960). Em relação à formação do SAB, quanto maior a massa molar do polímero, menor será a concentração de sal (ou do outro componente constituinte do sistema) requerida para que ocorra a separação de fases.

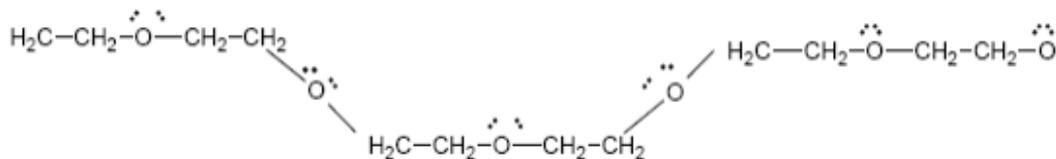
Essa tendência está de acordo com os resultados encontrados na literatura e nesse trabalho. Sampaio *et al.* (2016), ao estudar o efeito da massa molecular de PEG 400, PEG 4000 e PEG 6000 e sulfato de sódio em diferentes temperaturas (20 °C, 40 °C e 60 °C) e PADILHA *et al.* (2011), para sistemas aquosos contendo PEG/Fosfato, constataram o mesmo comportamento.

2.5 Componentes dos Sistemas

2.5.1 PEG

O PEG é um poliéter sintético neutro, de cadeia linear ou ramificada, produzido pela polimerização do óxido de etileno com um catalisador solúvel em meio ácido ou básico. Os PEG's com massas molares menores que 1000 g mol⁻¹ são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1000 g mol⁻¹, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. PEG's são higroscópicos e absorvem quantidades significativas de água quando expostos a alta umidade (LU, 2000). Na Figura 3 está apresentada a estrutura plana parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com outras substâncias.

Figura 3. Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.



Fonte: (BARBOSA, 2013).

A utilização do PEG é de grande interesse devido à sua alta biodegradabilidade, baixo custo e atoxidade, sendo portanto o seu descarte não problemático para o meio ambiente (SILVA, 2007). Estas características têm permitido a larga utilização de PEG e seus derivados em cosméticos, sabões e medicamentos. É importante destacar que, na indústria de alimentos, é regulamentada a sua utilização como veículo em adoçantes de mesa e em suplementos vitamínicos ou minerais (BRASIL, 2005). Logo, essas propriedades podem explicar o porquê da sua utilização na purificação de biomoléculas com sistemas aquosos bifásicos.

2.5.2 Sal

O citrato de sódio é um sal de sódio proveniente do ácido cítrico. Também chamado de citrato trissódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \text{Na}_3$), o citrato de sódio apresenta-se na forma de cristais brancos, inodoros e estáveis em ar. É comumente comercializado na forma de citrato trissódico dihidratado, com massa molar de $294,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Possui solubilidade de $42,5 \text{ g}/100\text{mL}$ em água a 25°C . É usado na indústria de alimentos principalmente como um aditivo alimentar ou como um conservante (CARVALHO, 2004). O citrato de sódio é biodegradável, atóxico e pode ser descarregado em plantas de tratamento biológico de águas residuárias (ZAFARANI-MOATTAR, 2013). Em substituição aos sais de sulfato e fosfato, o citrato de sódio tem sido usado em sistemas aquosos bifásicos com o PEG, como uma alternativa para sistemas ambientalmente seguros, e muito adequados para extração de materiais biológicos como proteínas (DA SILVA *et al.*, 2009; VERNAU e KULA, 1990; ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI, 2001).

O ânion citrato é uma espécie trivalente. À medida que se adiciona uma solução de ácido cítrico a uma solução de citrato de sódio, aumenta-se a quantidade de íons H^+ no meio, reduzindo-se o pH, formando um novos tipos de ânions, os divalentes e os monovalentes. Os íons trivalentes por possuírem valências mais elevadas são mais eficientes do que os íons

divalentes que possuem valências mais baixas na formação de duas fases e aumento da região bifásica (CHAKRABORTY e SEN, 2016).

2.6 Aplicação dos sistemas aquosos bifásicos na separação de enzimas

Os SAB's vem sendo empregados com muito sucesso na separação de diversas biomoléculas, devido à manutenção da atividade biológica das mesmas. A separação de biomoléculas em SAB's baseado em sistemas formados por PEG/sal foi relatado por alguns grupos de pesquisa, e os resultados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. SAB's utilizados na separação de biomoléculas.

Enzima	SAB	Referência
α -amilase	PEG/Fosfato de Potássio	Porfiri <i>et al.</i> , 2011
β -glucosidade	PEG-fosfato	Coimbra <i>et al.</i> , 2003
Lipase	PEG/Fosfato de Potássio	Souza, 2014
β -amilase	PEG/Na ₂ SO ₄ /KH ₂ PO ₄	Shahriari <i>et al.</i> , 2010
Quimosina	PEG/tartarato de sódio/sucinato de sódio/citrato de sódio	Rengifo, 2015

2.7 Enzimas

As enzimas são utilizadas para uma variedade de aplicações industriais (COLLA *et al.*, 2012). O mercado global de enzimas atingiu US\$ 3,6 bilhões em 2010, e cerca de US\$ 6 bilhões em 2016 (BCC RESEARCH, 2016).

Enzimas são proteínas (com exceção das ribozimas, que não são de natureza protéica) que catalisam reações químicas que ocorrem nos organismos e em células. São responsáveis pelo metabolismo, ou seja, pelas reações bioquímicas que resultam no crescimento e desenvolvimento das células. Desenvolvem um papel funcional em alimentos, medicamentos, assim como em sistemas biológicos. Estimulado pelo avanço da biotecnologia, abriu-se uma nova era de aplicações de enzimas em muitos processos industriais, resultando não somente no desempenho dos vários processos existentes, mas no desenvolvimento de uma série de novos produtos (ROBERTS *et al.*, 1995; HOUDE *et al.*, 2004). Podem ser de origem microbiana, vegetal ou animal, obtidas por meio de processos fermentativos ou por trituração de tecidos vegetais e animais (FORGATY, 1990; FUCINOS *et al.*, 2005).

Dentre as diversas enzimas industriais, comercializadas mundialmente, merecem destaque as proteases, amilases, celulasas e lipases. A utilização das amilases nos setores

industriais, alavancaram o crescimento do mercado mundial desta enzima, representando cerca de 30% deste mercado (ASOODEH et al., 2010). Assim, enzimas amilolíticas estão atualmente atraindo uma enorme atenção por causa de seu potencial biotecnológico.

2.8 Enzimas amilolíticas

As amilases constituem um conjunto de enzimas vastamente distribuídas na natureza. Existem diversos tipos de amilases e elas são utilizadas em vários tipos de indústrias como a de papel, têxtil, panificação, álcool, bebidas, entre outras. As principais amilases são: α -amilases, β -amilases e glicoamilases.

A α -amilase (1,4- α -D glucanohidrolase glucana, EC 3.2.1.1) constitui um importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas, sendo encontradas em plantas, animais e microrganismos, sendo que, as de origem microbiana são predominantes para aplicação comercial (SINDHU et al., 2017). A massa molar da α -amilase varia de 10 a 210 kDa, dependendo da sua origem (SPIER, 2005). O ponto isoelétrico da α -amilase é em torno de 5,0 (ZHI, 2004). Pertence à classe das hidrolases, que cliva aleatoriamente as ligações α -1,4 entre unidades adjacentes de glicose no amido e polissacarídeos relacionados, para produzir principalmente maltose e maltodextrinas (SINGH & KAYASTHA 2014).

As β -amilases (EC 3.2.1.2, α -1,4-D-glicano-maltoidrolase) hidrolisam a penúltima ligação α -1,4 a partir da extremidade não redutora da molécula de amilose, liberando maltose. São abundantemente encontradas em plantas, especialmente em trigo, soja, batata doce e algumas culturas de microrganismos (*Bacillus polymyxa*, *B. cereus* e *B. megaterium*) (HIZUKURI, 1996).

As glicoamilases (EC 3.2.1.3, α -1,4-D-glicano-glicoidrolase) são exoamilases que rompem as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido, glicogênio e olissacarídeos. Elas são capazes de remover unidades de glicose apenas a partir da extremidade não redutora dos seus substratos (BAGHERI, KHODARAHMI e MOSTAFAIE, 2014). Esta é em sua maior parte produzida por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo que, dentre essas, a amiloglicosidase de *Aspergillus* é a mais termoestável (SANTOS, 2006).

2.9 Aplicação das α -Amilases na Indústria

As α -amilases estão entre as enzimas mais utilizadas nos mercados industriais, encontram aplicações em vários processos, tais como, liquefação de amido, desengomagem de tecidos, detergentes, panificação, produção de bioetanol, dentre outros. Com os novos desenvolvimentos da biotecnologia, as α -amilases tem aplicações em campos clínicos e médicos (SINDHU et al., 2017).

O maior mercado de α -amilase está na produção de amido hidrolisado, obtendo-se glicose como produto final. Para a produção do xarope de milho com alto teor de frutose, o amido é convertido em glicose e depois em frutose pela ação da glicose isomerase. Devido ao seu alto poder adoçante, é utilizado em grande quantidade nas indústrias de bebidas, como por exemplo em refrigerantes (GUPTA *et al.*, 2003).

A utilização dessa enzima no processamento de alimentos tem sido muito vantajosa, pois além do rendimento ser semelhante ou maior do que o do processamento químico, não há formação de compostos não desejados. Além disso, as enzimas amilolíticas têm a vantagem de catalisar reações sob condições moderadas, além de serem naturais e não tóxicas. Essas capacidades as tornam imprescindíveis para a indústria de alimentos, além de que, a maioria das enzimas é ativa em baixas concentrações (FENEMA, 1985).

As amilases, mais especificamente a α -amilase, tem sido usada na indústria papelreira com o propósito de diminuir a viscosidade da goma de amido que é empregada sobre o papel durante o processamento do mesmo. As α -amilases têm sido utilizadas nas formulações de detergentes líquidos para reduzir em parte, a agressividade dos detergentes sobre madeiras e porcelanas (GUPTA *et al.*, 2003).

2.10 Métodos de Purificação da Amilase

Tipicamente, o processo de purificação de uma enzima é composto por múltiplas etapas cuidadosamente definidas que têm como fundamento à distinção das enzimas com base na sequência de aminoácidos, no conteúdo de carboidratos e de lipídios na estrutura tridimensional, e na sua atividade biológica (BIAZUS *et al.*, 2010).

As técnicas mais utilizadas para a purificação da amilase são: adsorção em leito expandido que segundo Biazus *et al.* (2010) foi utilizada na purificação das enzimas α e β -amilases de malte de milho; cromatografia de filtração em gel usada para purificar α -amilase a partir de uma estirpe identificada como *Bacillus methylotrophicus* (XIE *et al.*, 2014); filtração em gel e cromatografia de troca iônica utilizada para purificar a enzima amilase da casca de pitaya (AMID E MANAP, 2014); eletroforese e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na purificação de uma amilase maltogênica de sementes de Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) (KHEMAKHEM *et al.*, 2013); cromatografias em colunas de DEAE-celulose e Sephadex G-100 empregada para purificar α -amilase de *Aspergillus oryzae* IFO30103 (DEY e BANERJEE, 2015), dentre outras.

Entretanto, as principais restrições para a produção de enzimas puras são os vários passos necessários para purificação, que em geral, causa perdas de atividade enzimática e exigem alto consumo de energia e de produtos químicos (MARTÍNEZ-ARAGÓN *et al.*, 2009). Uma

alternativa para a purificação destas enzimas sem interferir em sua atividade, com viabilidade econômica é a utilização de sistemas aquosos bifásicos (KRONER *et al.*, 1978; SELBER *et al.*, 2001).

2.11 Modelos Termodinâmicos

2.11.1 Métodos de contribuição de grupos

O conceito da contribuição de grupos foi introduzido por Langmuir (1925) e trata uma substância como um conjunto de grupos funcionais, podendo-se determinar as propriedades da substância somando-se as contribuições individuais de cada um dos grupos que a constituem. Por exemplo, a molécula de PEG não deve ser estudada apenas como uma molécula de PEG e sim pelos grupos funcionais que formam essa molécula, os quais são CH₂, CH₂O e OH⁻. Dentre esses métodos tem-se o UNIFAC, que nesse trabalho foi utilizado para as estimativas dos coeficientes de atividade. A vantagem do UNIFAC é que ele permite representar uma quantidade muito grande de substâncias partindo de uma pequena quantidade de grupos.

O cálculo do coeficiente de atividade através desse método é expresso por duas partes: combinatorial e residual. A parte combinatorial leva em consideração diferenças na forma e tamanho entre as moléculas na mistura e pode ser identificada como uma contribuição entrópica. Já a parte residual considera as interações energéticas entre os grupos que compõem as moléculas e pode ser identificada como uma contribuição entálpica (OLIVEIRA, 2010).

2.11.2 UNIFAC

O modelo UNIFAC desenvolvido por Prausnitz e colaboradores (FREDENSLUND *et al.*, 1975) utiliza o conceito de contribuição de grupos para o cálculo dos coeficientes de atividade. Sendo assim, o coeficiente de atividade de cada componente é a soma de todas as interações binárias entre os grupos funcionais desse componente com todos os outros grupos dos componentes que compreendem a mistura (TESTER e MODELL, 1996).

Para que o modelo UNIFAC (“Uniquac Functional - Group Activity Coefficient”) possa ser implementado, é necessário que seja efetuada correlações satisfatórias de dados de atividade obtidos experimentalmente para obter parâmetros que caracterizam interações entre pares de grupos estruturais nos sistemas. Posteriormente, estes parâmetros podem ser utilizados para prever atividades em outros sistemas que não foram estudados experimentalmente mas que contêm os mesmos grupos funcionais (OISID e PRAUSNITZ, 1978).

O modelo apresenta o coeficiente de atividade como a soma de uma parte combinatorial e uma residual. Conforme pode ser observado na equação 4.

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^{com} + \ln \gamma_i^{res} \quad (4)$$

A parte combinatorial do método UNIFAC é dada pela equação 5 (REID *et al.*, 1987).

$$\ln \gamma_i^{com} = \left(\ln \frac{\varphi_i}{X_i} + 1 - \frac{\varphi_i}{X_i} \right) - \frac{z}{2} q \left(\ln \frac{\varphi_i}{\theta_i} + 1 - \frac{\varphi_i}{\theta_i} \right) \quad (5)$$

Onde:

$$\varphi_i^* = \frac{r_i X_i}{\sum_j r_j X_j} \quad (5.1)$$

$$\theta_i = \frac{q_i X_i}{\sum_j q_j X_j} \quad (5.2)$$

$$r_i = \sum_k V_k^{(i)} R_k \quad (5.3)$$

$$q_i = \sum_k V_k^{(i)} Q_k \quad (5.4)$$

As nomenclaturas dos parâmetros da parte combinatorial, relacionados à equação 5 são:

- r_i é o parâmetro de volume para o componente i ;
- Z é o número de coordenação;
- q_i é o parâmetro de área superficial para o componente i ;
- φ_i^* é a fração volumétrica do componente em termos de r_i ;
- θ_i é a fração de área superficial do componente em termos de
- $V_k^{(i)}$ é o número de grupos do tipo k na molécula i .

Os valores dos parâmetros de volume e área de grupo R_K e Q_K , respectivamente, estão tabelados na literatura (REID *et al.*, 1987).

Os parâmetros dos componentes puros, r_i e q_i (ou r_j e q_j), são, respectivamente, medidas moleculares de volumes de Van der Waals e áreas superficiais.

A parte residual é composta pelas contribuições individuais de cada grupo presente na solução, menos a soma das contribuições individuais dos mesmos grupos no componente puro. Por exemplo, em um sistema formado por PEG + citrato de sódio + água, teremos os seguintes grupos funcionais, CH₂, CH₂O, OH⁻, Na⁺, COO⁻, C e H₂O. O CH₂, por exemplo, faz parte da estrutura do PEG, então a parte residual deste componente será a contribuição que ele tem com todas as moléculas menos a contribuição que ele tem com as moléculas do PEG (CH₂O, OH⁻). Este termo constitui a chamada "solução por grupos", onde as contribuições individuais de cada grupo são funções da concentração e da temperatura (WILSON e DEAL, 1962), como apresentado na Equação 6.

$$\ln y_i^r = \sum_K^{\text{grupos}} v_k^{(i)} (\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)}) \quad (6)$$

Os coeficientes de atividade residual dos grupos são dados pela equação 7.

$$\ln \Gamma_k = Q_k [1 - \ln(\sum_m \theta_m \Psi_{mk}) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{km}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}}] \quad (7)$$

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad (7.1)$$

$$X_m = \frac{\sum_i^M V_m^{(i)} X_i}{\sum_i^M \sum_i^N V_j^{(i)} X_i} \quad (7.2)$$

Sendo que θ_m e X_m são a fração de área do grupo m e a fração molar do grupo m , respectivamente. O coeficiente de atividade residual é definido como função da fração de grupo X_m .

Na contribuição residual, as interações entre os grupos são expressas em termos de parâmetros, dados pela equação 7.3.

$$\Psi_{mn} = \exp\left[-\frac{U_{mn}-U_{nm}}{RT}\right] = \exp\left(-\frac{U_{mn}}{T}\right) \quad (7.3)$$

Parâmetros de interação de grupos, U_{mn} , podem ser avaliados a partir de dados experimentais de equilíbrio de fases. Notar que U_{mn} tem unidade de Kelvin e $U_{mn} \neq U_{nm}$. Os parâmetros U_{mn} e U_{nm} são obtidos a partir de um banco de dados utilizando uma grande quantidade de resultados experimentais.

Parâmetros de interação de grupo a_{mn} para uma grande quantidade de grupos têm sido sistematicamente reportados por vários autores, como ZARKARIAN *et al.* (1979), HERSKOWITZ e GOTTLIEB (1981), GMEHLING *et al.* (1982), MACEDO *et al.* (1983), TIEGS *et al.* (1987) HANSEN *et al.* (1991). A aplicação do modelo UNIFAC a sistemas contendo sais foi feita por KIKIC *et al.* (1991) e DAHL E MACEDO (1992). A diferença entre as duas abordagens é que KIKIC e colaboradores consideraram um sal como composto de dois grupos, cátion e ânion, enquanto DAHL e MACEDO consideraram um sal como sendo um grupo funcional diferenciado. Em 1996, Aznar utilizou a abordagem de DAHL e MACEDO para representar o equilíbrio líquido-vapor de sistemas binários e ternários contendo sais. Nesse trabalho, a abordagem de KIKIC e colaboradores é utilizada.

A modelagem termodinâmica de sistemas aquosos bifásicos constituídos por polímeros apresenta inúmeras dificuldades relacionadas ao comportamento das soluções poliméricas no que se refere à caracterização das fases, tamanho da cadeia e interação entre as moléculas do polímero e do solvente (HUANG *et al.*,2001).

2.12 Microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC)

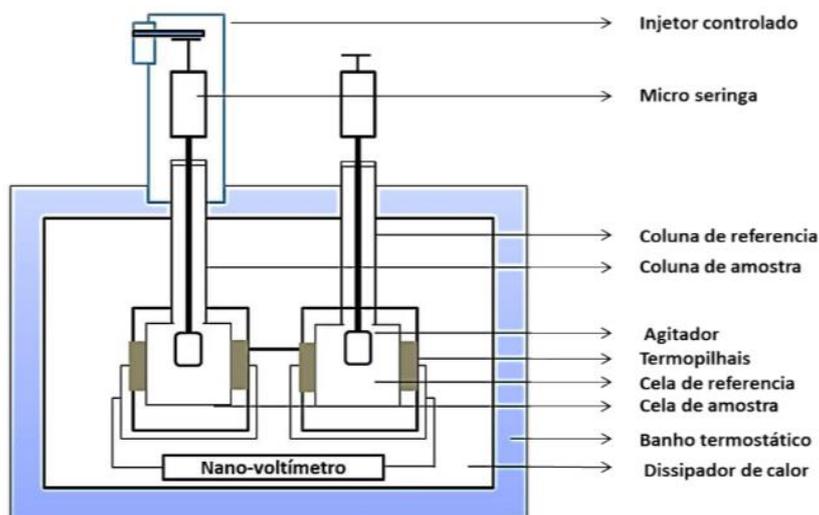
Os recentes avanços no desenvolvimento de calorímetros cada vez mais sensíveis e com melhor precisão torna essa técnica cada vez mais utilizada, desempenhando um papel importante na área de biotecnologia, oferecendo aos pesquisadores informações essenciais sobre a termodinâmica de enzimas, ácidos nucleicos, lipídios e outras biomoléculas (ULTRASENSITIVE, 2016).

A entalpia associada à mistura e reação de duas soluções de composições diferentes pode ser medida pela microcalorimetria de titulação isotérmica. Dessa forma, os processos físicos e químicos podem ser acompanhados pela liberação ou absorção de energia (HEERKLOTZ e SEELIG, 2000).

Este método consiste na adição do titulante, através de uma micropipeta automática, sobre o titulado que se encontra na célula de amostra. Em um experimento típico de interação entre uma enzima e seu ligante, a macromolécula (enzima) é colocada na célula de amostra e titulada com o ligante. A interação entre as duas espécies implica em uma liberação ou absorção de calor, a energia produzida ou consumida é medida em função do tempo. Todo esse processo

é realizado sob agitação constante e em temperatura controlada (SILVA, 2002). Na Figura 4 está ilustrado um microcalorímetro de titulação isotérmica (ITC).

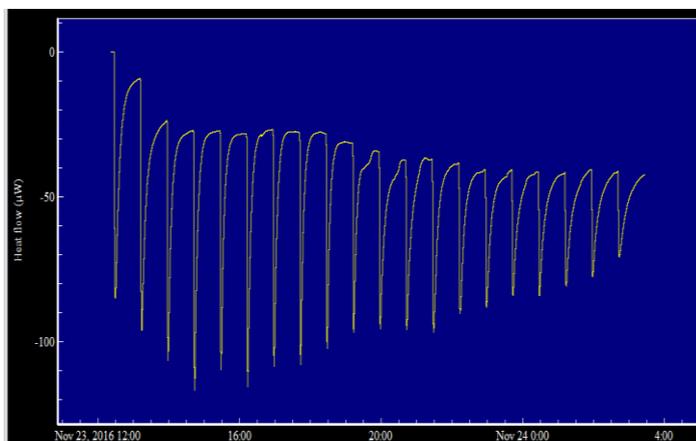
Figura 4. Microcalorímetro de titulação isotérmica (ITC).



Fonte: (RENGIFO, 2015).

Cada medida de fluxo de energia gera um pico que representa a energia associada à injeção de um pequeno volume da solução da seringa na solução presente na célula de amostra (Figura 5). À medida que a solução presente na célula de amostra vai atingindo a saturação, o sinal de energia liberada vai diminuindo até atingir a saturação completa. Integrando a área de cada pico (energia liberada ao longo de um intervalo de tempo) obtêm-se a medida do H (em unidades de joules por mol do componente A) resultante do processo de mistura a ser estudado. Com posse dessa informação chega-se aos outros parâmetros termodinâmicos desejados no estudo em questão (GOMES, 2009).

Figura 5. Gráfico de potência em função do tempo referente a transferência da α -amilase.



3 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo geral a obtenção de dados de equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG, citrato de sódio e água e aplicação na partição α -amilase.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter dados de equilíbrio de sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 1500 ou 4000, citrato de sódio e água nos valores de pH de 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C;
- Estudar a influência da temperatura, pH e massa molar do polímero sobre as curvas binodais, comprimento e inclinação das linhas de amarração obtidas;
- Utilizar os dados das linhas de amarração obtidos pela regra da alavanca para estimar parâmetros de interação de grupo para o modelo de contribuição de grupo UNIFAC;
- Avaliar a partição da α -amilase nos sistemas bifásicos estudados (K_p , K_e , Y % e S);
- Determinar propriedades termodinâmicas de $\Delta_{tr}G$, $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$ da partição da α -amilase.

4 MATERIAIS 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 Materiais

Os reagentes utilizados na condução deste trabalho foram: polietilenoglicol (massa molar de 1500 e 4000 g.mol⁻¹) e ácido cítrico, adquiridos da Synth, citrato de sódio adquirido da VETEC Brasil e a α -amilase *Aspergillus Oryzae* (CAS 9001-19-8 647-016-00-X) adquirida da Sigma Aldrich Brasil.

Nos experimentos foram empregados água destilada e todos os reagentes usados foram de grau analítico.

4.2 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

4.2.1 Determinação das Curvas Binodais

Para preparar os SAB's, compostos de PEG, citrato de sódio e água, foram preparadas soluções estoque com cada PEG (1500 e 4000) em água e de sal em água, utilizando uma balança analítica M254A (Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) com uma precisão de $\pm 0,0001$ g. A concentração da solução estoque de PEG foi de 50 % m/m e da solução de citrato de sódio e ácido cítrico de 35 % m/m. O pH da solução salina de citrato de sódio foi ajustada com ácido cítrico e conferida em pHmetro (QUIMIS, Q400MT) a fim de obter-se valores de pH desejados. As curvas binodais para sistemas formados por PEG + citrato de sódio + água, variando-se a massa molar de PEG (1500 e 4000), temperatura (30 e 40)°C e pH (4,0, 5,0, 6,0 e 7,0), foram obtidas utilizando-se o método turbidimétrico (ALBERTSSON, 1986), totalizando 16 curvas.

Para a obtenção das curvas binodais, pesou-se 1,5g da solução estoque de PEG em tubos de vidro, e em seguida, os tubos contendo o polímero e os tubos contendo as soluções foram colocados em banho termostático (Tecnal, Te-184, Brasil) cerca de 30 minutos, até alcançar o equilíbrio térmico. Após atingir o equilíbrio, foram adicionadas alíquotas de 50 μ L da solução de sal com uma pipeta automática, agitando-se em um agitador vortex (PHOENIX, modelo AP-56), até alcançar a turbidez. Nesse momento foi anotada a quantidade de sal que provocou a turvação. O aparecimento dessa turbidez mostra que o sistema passou de monofásico para bifásico. Em seguida, foi titulada água destilada no sistema até que o mesmo se tornasse límpido e depois foi anotada a quantidade de água utilizada para sua homogeneização. A titulação foi feita repetidamente até obter os pontos necessários para construir a curva binodal. Esse procedimento foi realizado para todas as combinações da massa molar dos polímeros, valores

de pH e temperaturas requeridas. A equação 8 sugerida MERCHUK *et al.* (1998), foi ajustada as curvas binodais.

$$X_{PEG} = \exp(a + b(X_{SAL})^{0,5} + cX_{SAL} + d(X_{SAL})^2) \quad (8)$$

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

4.2.2 Determinação das Linhas de Amarração

As linhas de amarração (LA) foram obtidas utilizando o método gravimétrico descrito por MERCHUK *et al.* (1998), que consiste em selecionar primeiro um ponto acima da região bifásica, através do qual a LA vai passar, chamado de ponto global. Foram utilizados três pontos globais para cada sistema PEG-Sal, os quais estão apresentados nas Tabela 2 e 3. Os pontos que deram origem a linha de amarração foram obtidos para cada condição de estudo, em tubos de centrífuga graduados de fundo cônico, a partir da massa das soluções estoques de PEG, sal e água para uma massa total do sistema de 40 g.

Tabela 2. Composições globais dos sistemas formados por PEG 1500 + Citrato de Sódio + Água, expressas em porcentagem mássica (%m/m).

Ponto Global	pH 4,0		pH 5,0		pH 6,0		pH 7,0	
	PEG	Sal	PEG	Sal	PEG	Sal	PEG	Sal
30 °C								
1	20	18	15	16	15	14	16	12
2	23	19	18	17	18	15	19	13
3	26	20	21	18	21	16	22	14
40 °C								
1	25	16	15	16	14	12	17	13
2	28	17	18	17	18	13	21	14
3	31	18	21	18	22	14	25	15

Tabela 3. Composições globais dos sistemas formados por PEG 4000 + Citrato de Sódio + Água, expressas em porcentagem mássica (%m/m).

Ponto Global	pH 4,0		pH 5,0		pH 6,0		pH 7,0	
	PEG	Sal	PEG	Sal	PEG	Sal	PEG	Sal
30 °C								
1	17	16	14	13	15	12	11	11
2	20	17	17	14	18	13	14	12
3	23	18	20	15	21	14	17	13
40 °C								
1	17	16	14	12	13	12	13	12
2	20	17	17	13	17	13	17	13
3	23	18	20	14	21	14	21	14

A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada em centrífuga (SP LABOR, modelo Sp-701) a uma força centrífuga de 3500 g por 15 minutos, para acelerar a separação de fases. Os tubos foram mantidos em repouso, durante 12 a 24 horas em estufa B.O.D, nas temperaturas de trabalho estudadas, para se alcançar o equilíbrio das fases.

4.2.2.1 Coleta das Fases

Após ser atingido o equilíbrio, e as duas fases límpidas serem observadas, uma alíquota de cada fase resultante foi coletada com o auxílio de uma seringa de 5 mL. 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 pesadas, colocadas em recipientes com tampa e armazenadas sob refrigeração até que as análises fossem realizadas. Os componentes do sistema foram estimados em cada fase e os diagramas de equilíbrio foram construídos.

4.2.3 Determinação dos Componentes do Sistema

Depois das fases terem sido separadas, elas foram pesadas e a concentração de cada componente nas fases foi estimada pela aplicação da regra da alavanca, que é uma relação entre a composição (em massa) da fase superior e a composição total do sistema.

Para determinação dos componentes da LA o seguinte sistema de quatro equações (Equações 9-12) e quatro incógnitas (X_{PEG}^s , X_{PEG}^i , X_{SAL}^s , X_{SAL}^i) foi resolvido (HU *et al.*, 2003):

$$X_{PEG^s} = \exp(a + b (X_{SAL^s})^{0,5} + cX_{SAL^s} + d(X_{SAL^s})^2) \quad (9)$$

$$X_{PEG^i} = \exp(a + b (X_{SAL^i})^{0,5} + cX_{SAL^i} + d(X_{SAL^i})^2) \quad (10)$$

$$\frac{X_{PEG^s} - X_{PEG^M}}{X_{PEG^M} - X_{PEG^i}} = \frac{m_i}{m_s} \quad (11)$$

$$\frac{X_{SAL^M} - X_{SAL^s}}{X_{SAL^i} - X_{SAL^M}} = \frac{m_i}{m_s} \quad (12)$$

Onde X_{PEG^s} , X_{SAL^s} , X_{PEG^i} , X_{SAL^i} , X_{PEG^M} , X_{SAL^M} são as composições em fração mássica do PEG e do sal na fase superior, inferior e na mistura, respectivamente, m_i e m_s é a massa da fase inferior e superior, respectivamente. E a, b, c e d são parâmetros de ajuste da equação sugerida por MERCHUK *et al.* (1998).

O comprimento da linha de amarração foi obtida pela equação 1 e a inclinação da linha de amarração foi determinada pela equação 2, ambas descritas no item 2.2.

4.2.4 Determinação da Massa Específica

As massas específicas de cada fase foram determinadas a 30 °C e 40 °C usando um Densímetro Digital de Bancada Anton Paar DMA-5000 (Anton-Paar, Graz, Áustria) com uma precisão de 5×10^{-6} g.cm⁻³ e repetibilidade de 1×10^{-6} g.cm⁻³ na faixa de operação 0 a 3 g.cm⁻³, com uma precisão de $\pm 0,01$ °C e repetibilidade de $\pm 0,001$ °C.

A massa específica foi determinada para calcular a razão de fases (R) e, assim, calcular a recuperação teórica Y (%) da partição.

4.2.5 Modelagem termodinâmica

4.2.5.1 Cálculo dos coeficientes de atividade

O cálculo dos coeficientes de atividade foi realizado utilizando-se o modelo UNIFAC, descrito no item 2.11.2. Para o modelo de contribuição de grupos, os seguintes valores dos parâmetros foram utilizados nos cálculos de cada grupo:

Tabela 4. Parâmetros Q_k e R_k utilizados nesse trabalho.

Grupo k	R_k	Q_k	Referências
CH ₂	0,6744	0,540	Hansen <i>et al.</i> , 1991
CH ₂ O	0,9183	0,780	Magnussen, 1981
OH ⁻	1,0000	1,200	Hansen <i>et al.</i> , 1991
C	0,2195	0,000	Magnussen, 1981
COO ⁻	1,0020	0,880	Pinto, 2015

Na ⁺	3,0000	3,000	Bondi, 1968
H ₂ O	0,9200	1,400	Hansen <i>et al.</i> , 1991

4.2.5.2 Cálculo das energias de interação

A energia de interação foi calculada utilizando os parâmetros de interação, obtidos pelo modelo UNIFAC. Os valores de energia de interação podem ser obtidos pelas Equações 13 e 14.

$$\tau_{ij} = \exp\left(-\frac{\Delta u_{ij}}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{a_{ij}}{T}\right) \quad (13)$$

$$\tau_{ji} = \exp\left(-\frac{\Delta u_{ji}}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{a_{ji}}{T}\right) \quad (14)$$

Em que, Δu_{ij} e Δu_{ji} são os parâmetros de interação característicos da energia de interação $i-j$, T é a temperatura e R é a constante ideal dos gases.

4.2.5.3 Cálculo dos volumes de exclusão

O volume de exclusão foi determinado utilizando as massas e concentrações experimentais obtidos na confecção das curvas binodais. Esses dados foram inseridos no programa Origin 6 que utiliza o método numérico Levenberg-Marquadt para que o ajuste acontecesse e se descobrisse o volume de exclusão pela Equação 15.

$$\ln\left(V_{213}^* \frac{w_2}{M_2} + f_{213}\right) + \left(V_{213}^* \frac{w_1}{M_1}\right) = 0 \quad (15)$$

Onde o V_{213}^* e f_{213} indicam o volume de exclusão do sal e a fração volumétrica efetiva do sal na fase polimérica, M e w representam a massa molecular e a fração de massa, os índices "1" e "2" mostram referência à quantidade de PEG e sal respectivamente, nas fases.

4.2.6 Partição da α -amilase em Sab's

As linhas de amarração foram utilizadas para construção do sistema aquoso bifásico utilizado para partição da α -amilase. Os sistemas foram formados com adição de quantidades adequadas da solução estoque de PEG + citrato de sódio + água e 0,01 g da enzima em pó, para uma massa total de 12,5 g, em tubos de centrífuga cônico, misturados e mantidos em repouso durante 15 horas em estufa B.O.D. nos valores de pH e temperaturas de estudo. Após o

equilíbrio de fases dos sistemas, as fases foram coletadas com seringas, para posterior determinação da atividade enzimática e determinação do teor de proteína, descritas nos itens 4.2.6.1 e 4.2.6.2, respectivamente.

4.2.6.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da α -amilase foi determinada utilizando metodologia adaptada de OKOLO *et al.* (1995). A mistura consiste de 0,5 mL das fases apropriadamente diluídas em 0,5 mL de amido solúvel a 1% (m/v) solubilizada em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,6). Após 30 minutos de incubação a 50 °C os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme Miller (1959), utilizando comprimento de onda de 540 nm. Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μ mol de açúcar redutor por mL de extrato por minuto sob as condições de ensaio descritas.

$$U = \text{ART} \times \frac{VT}{0,18 \times Vc \times TH} \quad (16)$$

Onde:

ART: Açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg/mL);

VT: Volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume da amostra) (mL);

VC: Volume da amostra utilizado na hidrólise (mL);

TH: Tempo de hidrólise (minuto);

0,18: 1 μ mol de glicose (mg).

4.2.6.2 Determinação do teor de proteína

A quantificação de proteínas totais no extrato enzimático foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda fixado em 595 nm. As curvas analíticas foram construídas utilizando como padrão a Albumina do Soro Bovino (BSA).

4.2.6.3 Determinação dos parâmetros da partição

O coeficiente de partição para atividade enzimática (K_e) definido como a atividade enzimática (U/mL) nas fases Superior (U_{sup}) e Inferior (U_{inf}) do sistema foi determinada conforme descrito pela Equação 17.

$$K_e = \frac{[U]_{sup}}{[U]_{inf}} \quad (17)$$

O coeficiente de partição da proteína (K_p), o qual é a relação entre a concentração de equilíbrio (mg / mL) da proteína total na fase superior (C_{sup}) e inferior (C_{inf}) foi determinado como descrito na equação 18.

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (18)$$

A seletividade (S) foi calculada como a razão entre o coeficiente de partição da atividade da lipase (K_e) e o coeficiente de partição da proteína total (K_p) pela equação 19.

$$S = \frac{K_e}{K_p} \quad (19)$$

Para selecionar o SAB com melhor capacidade de extração das proteínas estudadas, foi calculada a recuperação teórica (Y %) do sistema, utilizando-se a equação 20 (PICÓ *et al.*, 2006):

$$Y (\%) = \frac{100}{1 + (1 / R K_e)} \quad (20)$$

Onde R corresponde a razão entre os volumes da fase superior e inferior e K_e corresponde ao coeficiente de partição de atividade da α -amilase.

4.2.7 Eletrofore em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS -PAGE)

A Eletroforese SDS-PAGE foi realizada em mini géis verticais. O gel de acrilamida foi preparado como um gel de separação a 12% e um gel de empilhamento a 5%. Alíquotas das amostras pré-concentradas foram ressuspensas em tampão de desnaturação (Tris-HCl pH 6,8, 4% m / v de SDS, 4% v / v de 2-mercaptoetanol, 20% v / v de glicerol e azul de bromofenol) e com ajuda de uma micropipeta aplicou-se 200 μ L de cada amostra. A eletroforese foi realizada a 250 V e 30 mA, durante 2h, aproximadamente. Terminada a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e as proteínas foram fixadas com 12% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) durante 30 min e, em seguida, imersas em solução corante com 0,1% de azul de Coomassie Brilhante G250, dissolvido em uma mistura de 50% de metanol e 2% de TCA, por 180 min. Os processos de fixação, coloração e descoloração foram realizados sob agitação lenta constante em mesa agitadora. A descoloração foi realizada durante uma noite com solução de 30% de metanol e 7,5% de ácido acético.

4.2.8 Estudo microcalorimétrico do sistema

As medidas de entalpia de transferência foram feitas utilizando-se um microcalorímetro de titulação isotérmica, (TAM III). Este microcalorímetro é composto por um par de celas com capacidade para 2,0 mL de solução, sendo uma para a amostra e outra para a referência e uma seringa que adiciona volumes determinados da solução titulante (fase extratora) ao mesmo tempo em que agita a solução a uma determinada temperatura. Os experimentos de titulação consistiram de injeções consecutivas de alíquotas de 10 μL da fase superior (em uma concentração de PEG pré-estabelecida) ao vaso calorímetro contendo 1,8 mL da fase inferior, com 3 mg/mL da proteína (α -amilase). Para a obtenção da energia de transferência descontou-se da energia total (descrita acima) a energia associada à formação de microfases da fase superior dispersa na fase inferior. Para isso, alíquotas da fase superior foram também injetadas na fase inferior pura (ausência de enzima) (SOUSA *et al.*, 2009).

A quantidade de enzima presente na fase salina ao ser transferida para a gota da solução polimérica adicionada, registrava picos cujas áreas eram proporcionais à energia relativa à transferência da enzima para a fase superior presente na seringa. A integral da curva potência x tempo fornece a entalpia decorrente do processo de transferência, conforme a equação 21.

$$\Delta_{tr}H = \int_{t_1}^{t_2} P(t). dt \quad (21)$$

Os valores de variação da entalpia de transferência foram calculados levando-se em conta a quantidade de mols de enzima transferidos em cada injeção, utilizando-se para isso os valores de coeficiente de partição obtidos experimentalmente. Em cada experimento foram feitas 20 injeções.

A variação de energia livre de Gibbs ($\Delta_{tr}G$) foi calculada conforme a Equação 22.

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln K \quad (22)$$

Onde: T é a temperatura absoluta, em que o ensaio será realizado; R é constante dos gases ideais ; e K é o coeficiente de partição (pode ser k_p e k_e).

Como as medidas de variação de entalpia ($\Delta_{tr}H$) foram realizadas utilizando o microcalorímetro, a variação de Entropia ($\Delta_{tr}S$) foi calculada por diferença empregando a Equação 23.

$$\Delta_{tr}G = \Delta_{tr}H - T\Delta_{tr}S \quad (23)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diagramas de Equilíbrio

Os diagramas fornecem informações sobre a concentração dos componentes necessários para a formação das duas fases. A partir destes pode-se, também, verificar a influência de variáveis como temperatura, pH e massa molar do polímero na formação das fases.

Os dados obtidos experimentalmente na obtenção das curvas binodais dos sistemas compostos por PEG, citrato de sódio e água, onde foi variada a temperatura (30 e 40) °C, pH (4,0, 5,0, 6,0 e 7,0) e massa molar do PEG (1500 ou 4000) foram ajustados a equação não linear (Equação 8) proposta por Merchuk *et al.* (1998). Os valores obtidos para os parâmetros *a*, *b*, *c* e *d*, bem como os coeficientes de determinação (R^2) da equação ajustadas para os sistemas estudados estão apresentados na Tabela 5. Com base nos valores de R^2 pode-se concluir que a equação se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais.

Tabela 5. Parâmetros *a*, *b*, *c*, e *d* e o coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o sistemas PEG- Citrato de Sódio pela equação de HU *et al.* (2003).

pH	<i>A</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	R^2
PEG 1500 a 30 °C					
4,0	1,2202	-13,8644	23,6637	-42,5588	0,9988
5,0	-0,2974	-5,4513	10,0337	-49,0143	0,9990
6,0	0,6343	-13,4317	28,6554	-94,2402	0,9994
7,0	-0,0479	-6,6111	10,0498	-85,5235	0,9994
PEG 4000 a 30 °C					
4,0	1,3433	-14,9135	26,5617	-63,3807	0,9991
5,0	-0,3325	-5,2723	10,7185	-85,9268	0,9996
6,0	-0,1542	-6,4250	15,0230	-126,5102	0,9988
7,0	0,0878	-9,7465	23,3842	-204,2991	0,9997
PEG 1500 a 40 °C					
4,0	0,1737	-5,3501	6,4219	-24,6755	0,9996
5,0	0,4086	-12,3404	29,7104	-103,2291	0,9986
6,0	1,5442	-23,7582	58,9169	-192,4723	0,9985
7,0	-0,0318	-7,3294	14,4300	-97,4727	0,9993
PEG 4000 a 40 °C					
4,0	-0,2533	-5,1833	11,9550	-59,6708	0,9994
5,0	-0,2777	-6,1937	14,2167	-127,3172	0,9997

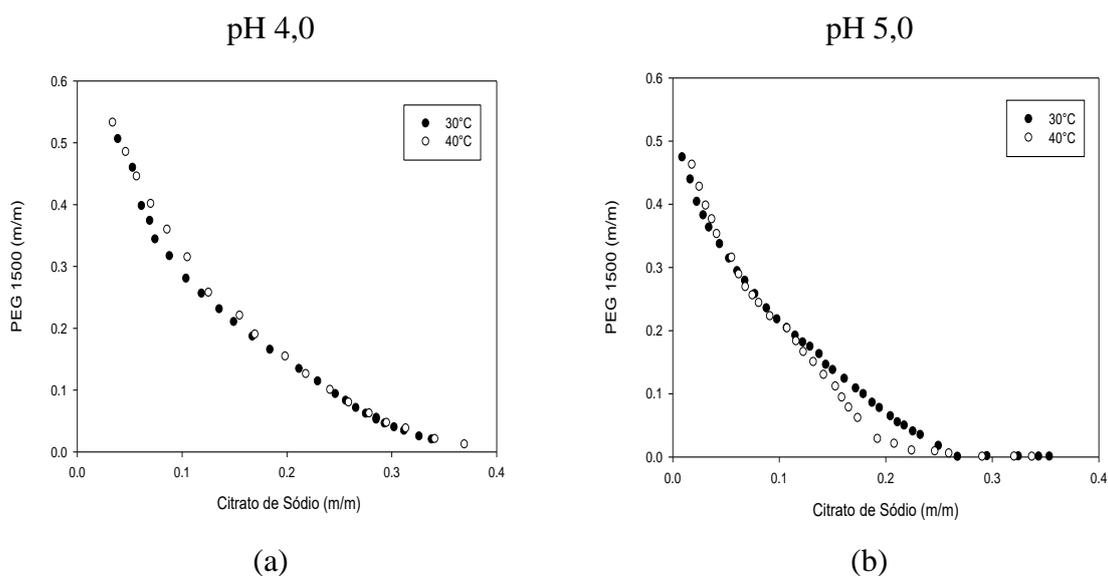
6,0	-0,0783	-8,6412	-8,6412	-274,3847	0,9996
7,0	-0,3030	-3,3080	-5,0429	-103,7153	0,9994

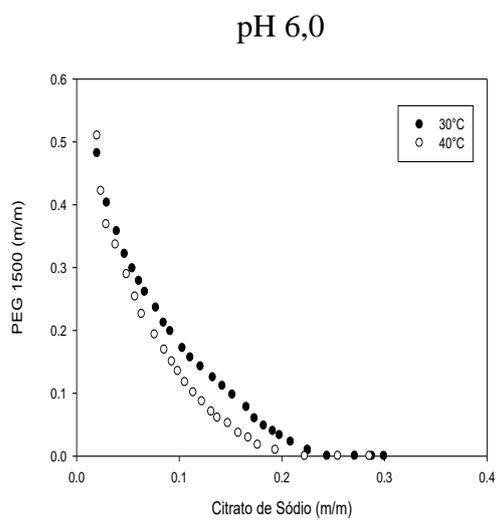
5.1.1 Efeito da Temperatura nos Diagramas de Equilíbrio

Os diagramas de fases para os sistemas PEG-citrato de sódio são apresentados nas Figuras 6 (a, b, c e d) para o PEG 1500 e Figuras 7 (a, b, c e d) para o PEG 4000 em função da temperatura. Esses diagramas fornecem informações sobre a concentração dos componentes necessários para a formação das duas fases.

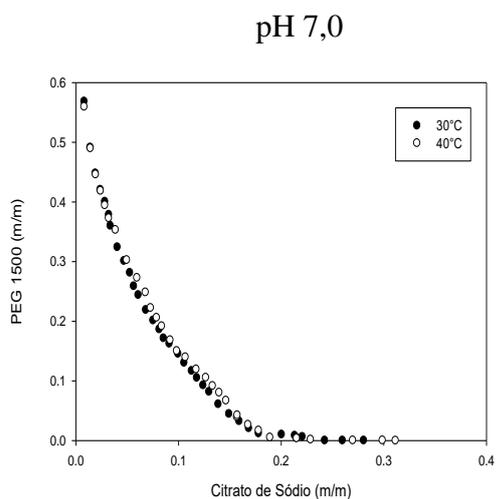
Observou-se que todos os sistemas estudados não sofreram variação da região bifásica com aumento da temperatura. A influência da temperatura sobre o comportamento do diagrama de fases com polímero e sal foi avaliada por vários autores. Sampaio *et al.* (2016), estudando o efeito da temperatura de 20 °C, 40 °C e 60 °C em diferentes massas molares (PEG 400, PEG 4000 e PEG 6000) com sulfato de sódio e água, observaram o mesmo comportamento. MURARI *et al.* (2015), também notou para os sistemas formados por (PEG 400, PEG 10000 e PEG 35000) e sulfato de amônio nas temperaturas de 10 °C, 25 °C e 40 °C, que o efeito da temperatura não foi notável sobre as composições de equilíbrio de fase. O pequeno efeito da temperatura sobre a composição do equilíbrio de fase pode ser atribuído a uma baixa variação de entalpia do sistema durante o processo de separação de fases (PATRÍCIO *et al.*, 2011).

Figura 6. Diagrama de fases do sistema PEG 1500 + Citrato de Sódio + água, a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d), em diferentes temperaturas.



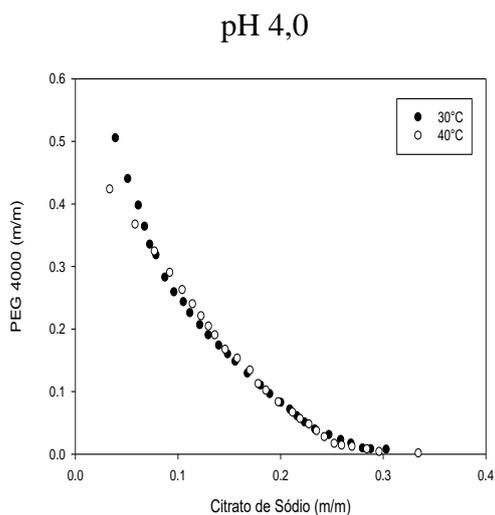


(c)

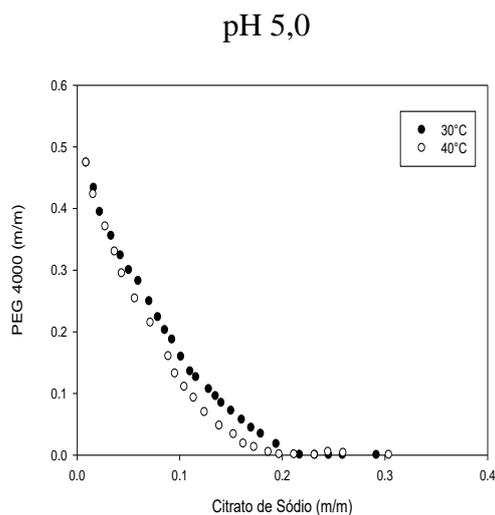


(d)

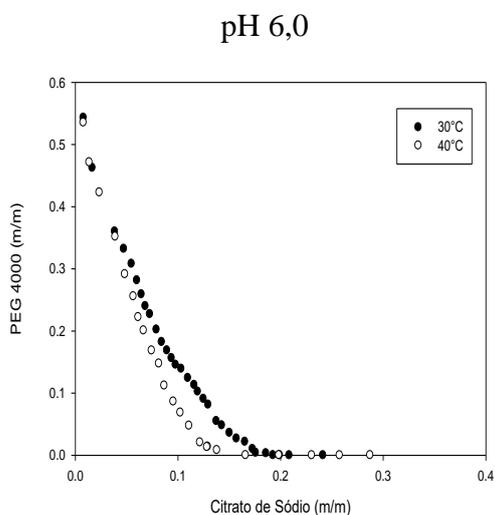
Figura 7. Diagrama de fases do sistema PEG 4000 + Citrato de Sódio + água, a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d), em diferentes temperaturas.



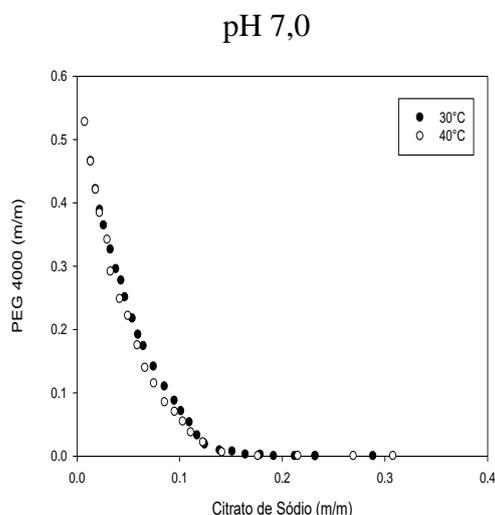
(a)



(b)



(c)



(d)

(c)

(d)

5.1.2 Efeito do pH nos Diagramas de Equilíbrio

Os diagramas obtidos evidenciando-se o efeito do pH estão representados nas Figuras 8 e 9.

A partir da análise dos dados, verificou-se que com o aumento do pH, a curva é deslocada em direção a concentrações mais baixas de PEG e sal, aumentando assim, a região de separação de fases. Tal resultado está de acordo com diversos trabalhos da literatura como o de COSTA *et al.* (2015), que estudou sistemas contendo PEG (1000 ou 4000) e citrato de sódio em valores de pH de 5,5, 6,5 e 7,5; CHAKRABORTY e SEN (2016), ao estudar sistema de PEG 4000 e citrato de sódio em diferentes valores de pH.

De acordo com TORRES (2013), o ânion citrato é uma espécie trivalente. À medida que se adiciona uma solução de ácido cítrico a uma solução de citrato de sódio, aumenta-se a quantidade de íons H^+ no meio, reduzindo-se o pH, e obtém-se novos tipos de ânions, os divalentes e monovalentes. Quanto menor o pH, menor é a concentração de íons trivalentes, o que faz com que a razão $HC_6H_5O_7^{2-}/C_6H_5O_7^{3-}$ aumente. A região de duas fases se expande com o aumento do valor de pH, porque os íons trivalentes são mais eficientes do que os íons divalentes e monovalentes na promoção da formação de duas fases. Isto é explicado baseado em que as interações de ligação de hidrogênio do PEG estão enfraquecidas em valores de pH mais elevados. Com o aumento do pH menos protonação de ânions ocorre, e, por conseguinte, uma valência mais elevada é observada. Ânions com uma valência superior são melhores agentes de salting-out do que ânions com uma valência inferior, visto que, eles têm uma capacidade de hidratação superior em comparação com aqueles com valências mais baixas. Logo, os ânions com valências mais elevadas em soluções com um valor de pH maior são mais eficientes na formação de duas fases, em comparação com aqueles com valências mais baixas em soluções com um valor de pH menor (TUBÍO *et al.*, 2006), (CHAKRABORTY e SEN, 2016).

Sendo assim, para maiores valores de pH (7,0 e 6,0), como ilustrado nas Figuras, uma menor concentração de citrato é necessária para a formação das duas fases e, conseqüentemente, uma maior região bifásica é observada.

Figura 8. Diagrama de fases para sistemas formados por PEG + Citrato de sódio + Água, para o PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b), na temperatura de 30 °C.

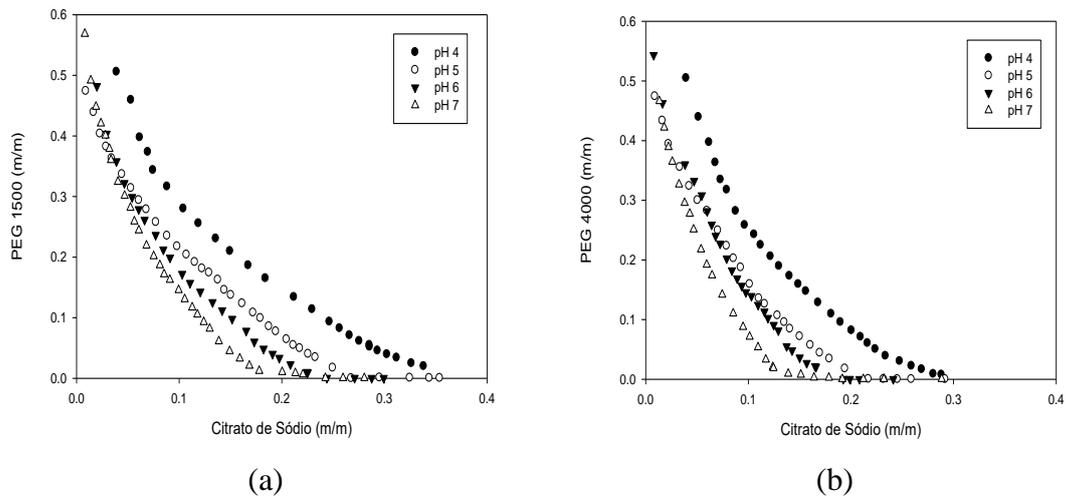
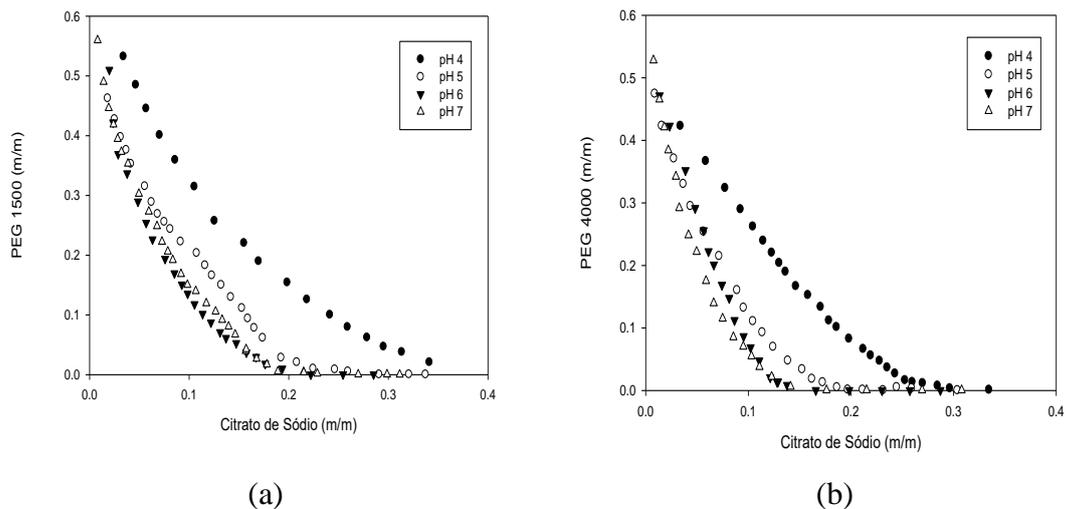


Figura 9. Diagrama de fases para sistemas formados por PEG + Citrato de sódio + Água, para o PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b), na temperatura de 40 °C.



5.1.3 Efeito da Massa Molar nos Diagramas de Equilíbrio

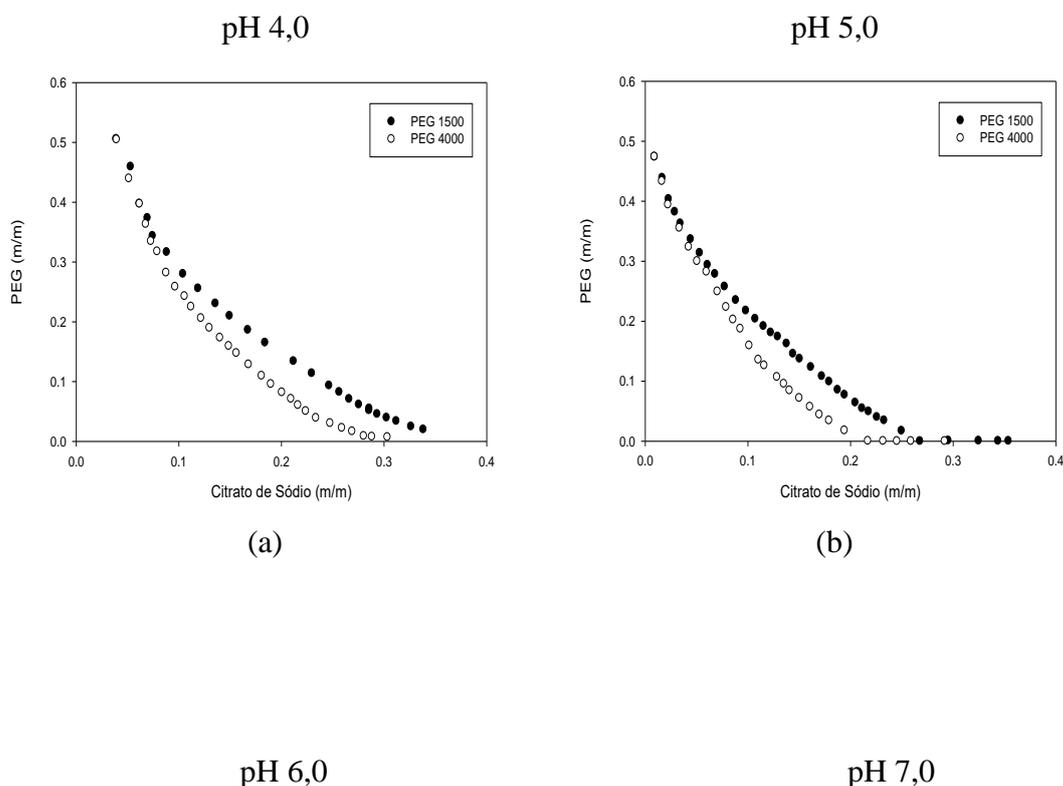
O efeito da massa molar dos polímeros está apresentado nas Figuras 10 e 11, na qual relacionam os diagramas formados por PEG (1500 ou 4000), citrato de sódio e água nas temperaturas e valores de pH estudados. Pode-se observar um aumento da região bifásica nos diagramas formados por polímero de maior massa. Ao se comparar os sistemas, o PEG 4000 para todas as temperaturas e valores de pH de estudo apresentou uma região bifásica maior que do PEG 1500. Logo, supoe-se que o aumento da massa molar do polímero provoca um aumento da sua hidrofobicidade, contribuindo para que processo de segregação ocorra com menores

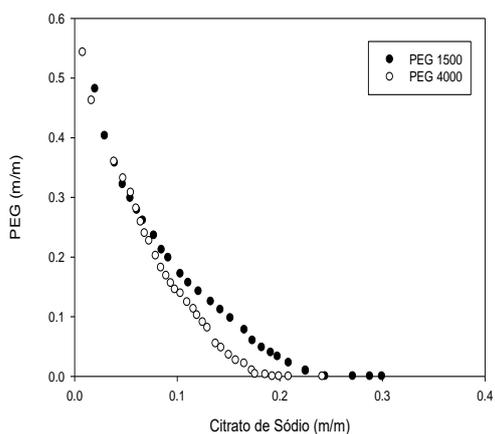
quantidades de sal e polímero (MURARI *et al.*, 2015). Portanto, o aumento da massa molar do polímero promove o alargamento da região bifásica.

De acordo com Carvalho (2004), o aumento da cadeia do polietilenoglicol diminui o grau de liberdade das moléculas, diminuindo a entropia configuracional e, conseqüentemente, a entropia de mistura do sistema. Simultaneamente, o aumento do tamanho da molécula do polímero provoca o enovelamento da cadeia da macromolécula, aumentando a entropia conformacional. As ligações carbono-carbono no polímero passam da forma TRANS para a CIS (mais energética) aumentando a sua entropia. Este processo de enovelamento resulta na diminuição do número de sítios disponíveis às interações, o que contribui para que a cadeia do polímero sature com menor quantidade de sal.

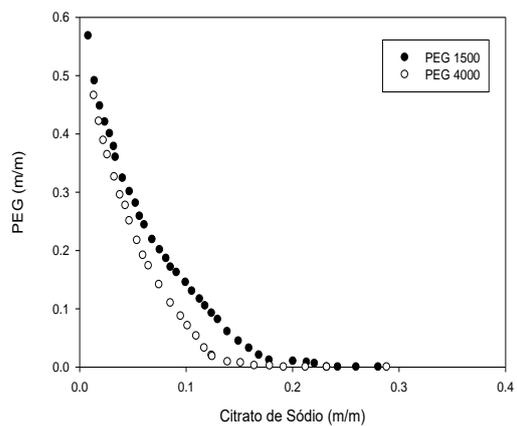
SAMPAIO *et al.* (2016), estudaram o efeito da massa molecular de PEG 400, PEG 4000 e PEG 6000 em sistemas com sulfato de sódio a 20 °C, 40 °C e 60 °C e observaram que a região de duas fases se expandiu com o aumento da massa molecular do PEG. Resultados semelhantes também foram obtidos por COSTA *et al.* (2015), ao estudar sistemas formados por PEG (1000 ou 4000), citrato de sódio e água; RENGIFO *et al.*, (2015) e PADILHA *et al.* (2011), para sistemas aquosos contendo PEG/Fosfato.

Figura 10. Diagrama de fases do sistema PEG + Citrato de Sódio + água, em pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d), na temperatura de 30 °C em diferentes massas molares do polímero.





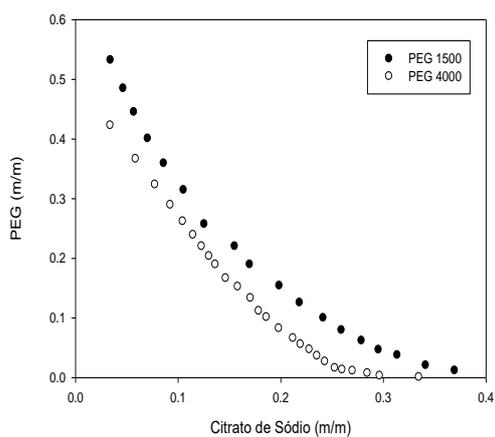
(c)



(d)

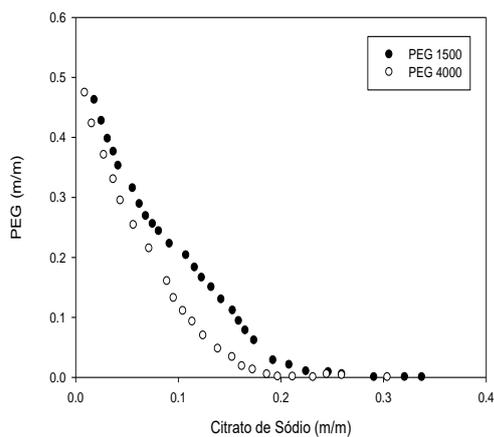
Figura 11. Diagrama de fases do sistema PEG + Citrato de Sódio + água, em pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d), na temperatura de 40 °C em diferentes massas molares do polímero.

pH 4,0



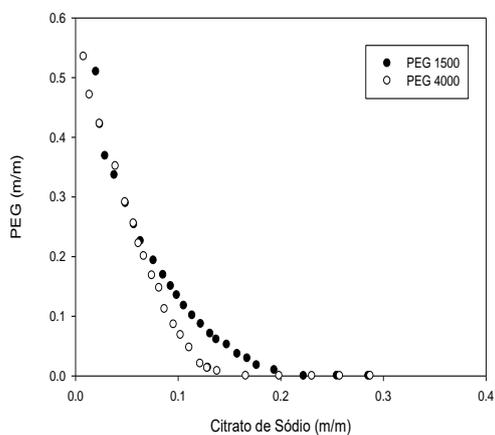
(a)

pH 5,0

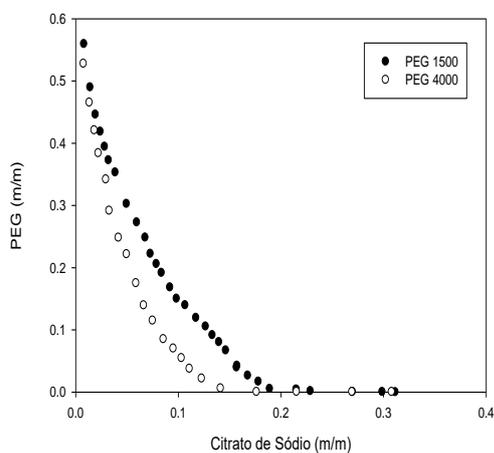


(b)

pH 6,0



pH 7,0



(c)

(d)

5.1.4 Estudo do Comportamento das Linhas de Amarração

O conhecimento do comprimento da linha de amarração de cada SAB é um parâmetro termodinâmico, normalmente utilizado para indicar o possível comportamento da partição de biomoléculas (BARBOSA, 2013). De acordo com Da SILVA e LOH (2006) com o aumento do CLA, a biomolécula de interesse tende a migrar preferencialmente para uma das fases, isto é, o valor do coeficiente de partição torna-se mais distante de 1. Esse comportamento é resultado do aumento da diferença de composição entre as fases, que aumenta as contribuições entálpicas e entrópicas na transferência da biomolécula para uma das fases.

Os resultados obtidos, das três linhas de amarração determinadas para cada SAB, estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Dados das linhas de amarração em porcentagem mássica (%m/m) dos sistemas formados por PEG 1500 (W₁) + Citrato de Sódio (W₂) + Água, valores da densidade das fases ($\rho/g.cm^{-3}$) e razão de volume das fases (R), em diferentes valores de pH e diferentes temperaturas.

pH	LA	Composição										
		Global		Fase Superior			Fase Inferior			CLA	ILA	R
		W ₁	W ₂	W ₁	W ₂	ρ	W ₁	W ₂	ρ			
30 °C – PEG 1500												
4,0	1	20,000	18,000	31,909	8,845	1,069	4,587	29,848	1,246	34,462	-1,300	0,663
	2	23,000	19,000	40,125	6,047	1,076	2,057	34,840	1,262	47,731	-1,322	0,697
	3	26,000	20,000	51,192	3,971	1,087	1,878	35,347	1,257	58,449	-1,572	0,903
5,0	1	15,000	16,000	26,946	7,467	1,066	3,067	24,522	1,208	29,344	-1,400	0,883
	2	18,000	17,000	36,690	3,210	1,064	1,038	29,513	1,225	44,300	-1,355	0,956
	3	21,000	18,000	43,908	1,481	1,069	0,448	32,819	1,247	53,579	-1,386	0,955
6,0	1	15,000	14,000	26,014	6,717	1,057	1,544	22,897	1,215	29,334	-1,512	0,712
	2	18,000	15,000	34,295	4,114	1,068	0,462	26,716	1,223	40,687	-1,497	1,231
	3	21,000	16,000	40,699	2,888	1,063	0,142	29,883	1,257	48,720	-1,502	1,252
7,0	1	16,000	12,000	26,385	5,708	1,067	0,819	21,197	1,168	29,892	-1,650	0,628
	2	19,000	13,000	33,253	3,970	1,082	0,214	24,900	1,194	39,112	-1,579	0,676
	3	22,000	14,000	38,460	2,909	1,070	0,041	28,795	1,239	46,326	-1,484	1,544
40 °C – PEG 1500												
4,0	1	25,000	16,000	37,242	8,069	1,059	6,111	28,236	1,250	37,093	-1,544	1,822
	2	28,000	17,000	46,088	5,164	1,070	3,209	33,221	1,255	51,242	-1,528	1,607
	3	31,000	18,000	53,990	3,315	1,079	1,989	36,529	1,258	61,703	-1,566	1,471

5,0	1	15,000	16,000	29,033	6,426	1,072	0,630	25,803	1,192	34,383	-1,466	0,878
	2	18,000	17,000	37,865	3,355	1,069	0,165	29,250	1,226	45,737	-1,456	0,970
	3	21,000	18,000	44,932	2,092	1,069	0,050	31,925	1,238	53,892	-1,504	0,988
6,0	1	14,000	12,000	26,577	5,160	1,072	1,014	19,061	1,137	29,098	-1,839	0,913
	2	18,000	13,000	31,297	4,018	1,052	0,045	25,127	1,206	37,714	-1,480	0,646
	3	22,000	14,000	39,073	2,832	1,054	0,005	28,387	1,240	46,685	-1,529	0,659
7,0	1	17,000	13,000	30,540	4,942	1,063	0,490	22,825	1,192	34,969	-1,680	0,731
	2	21,000	14,000	36,598	3,398	1,055	0,048	28,239	1,245	44,192	-1,471	1,585
	3	25,000	15,000	46,106	1,723	1,062	0,014	30,717	1,259	54,453	-1,589	1,404

Tabela 7. Dados das linhas de amarração em porcentagem mássica (%m/m) dos sistemas formados por PEG 4000 (W1) + Citrato de Sódio (W2) + Água, valores da densidade das fases (ρ /g.cm-3) e razão de volume das fases (R), em diferentes valores de pH e diferentes temperaturas.

pH	LA	Composição										
		Global		Fase Superior			Fase Inferior			CLA	ILA	R
		W ₁	W ₂	W ₁	W ₂	ρ	W ₁	W ₂	ρ			
30 °C – PEG 4000												
4,0	1	17,000	16,000	27,389	9,434	1,060	3,575	24,484	1,209	28,171	-1,582	1,474
	2	20,000	17,000	36,771	6,507	1,068	1,475	28,590	1,219	41,635	-1,598	1,260
	3	23,000	18,000	46,311	4,618	1,082	0,875	30,699	1,223	52,389	-1,742	1,073
5,0	1	14,000	13,000	24,075	7,228	1,073	1,900	19,932	1,155	25,555	-1,745	1,292
	2	17,000	14,000	29,507	5,311	1,050	0,275	25,618	1,216	35,593	-1,439	1,548
	3	20,000	15,000	37,076	2,905	1,071	0,065	29,119	1,214	45,354	-1,412	1,323
6,0	1	15,000	12,000	32,133	4,826	1,078	1,615	17,604	1,136	33,085	-2,388	0,823

	2	18,000	13,000	33,883	4,368	1,079	0,180	22,683	1,168	38,357	-1,840	1,220
	3	21,000	14,000	43,968	2,069	1,076	0,058	24,878	1,209	49,480	-1,925	0,996
	1	11,000	11,000	22,554	5,293	1,069	0,444	16,214	1,125	24,660	-2,024	0,960
7,0	2	14,000	12,000	26,090	4,513	1,064	0,026	20,653	1,165	30,656	-1,615	1,157
	3	17,000	13,000	29,934	3,727	1,057	0,000	25,187	1,218	36,831	-1,395	1,513
40 °C – PEG 4000												
	1	17,000	16,000	26,096	10,58	1,069	3,396	24,095	1,190	26,415	-1,680	1,663
4,0	2	20,000	17,000	36,397	5,826	1,068	0,734	30,128	1,202	43,155	-1,467	1,322
	3	23,000	18,000	45,275	2,254	1,075	0,214	34,107	1,212	55,182	-1,414	1,153
	1	14,000	12,000	23,628	6,305	1,066	0,505	19,982	1,145	26,865	-1,690	1,505
5,0	2	17,000	13,000	28,363	4,919	1,055	0,040	25,061	1,201	34,755	-1,406	1,699
	3	20,000	14,000	34,640	3,191	1,056	0,004	28,762	1,224	43,052	-1,354	1,582
	1	13,000	12,000	28,802	5,001	1,062	0,075	17,724	1,137	31,418	-2,258	0,875
6,0	2	17,000	13,000	30,219	4,723	1,055	0,000	23,644	1,200	35,654	-1,597	1,594
	3	21,000	14,000	37,854	3,166	1,044	0,000	27,499	1,243	45,000	-1,555	1,618
	1	13,000	12,000	28,669	3,613	1,065	0,169	18,867	1,134	32,337	-1,868	0,872
7,0	2	17,000	13,000	30,605	3,303	1,052	0,006	25,112	1,205	37,575	-1,403	1,430
	3	21,000	14,000	38,276	2,226	1,045	0,001	28,310	1,246	46,318	-1,467	1,449

Pode-se observar nas Tabelas 6 e 7 que a fase superior foi composta majoritariamente por PEG e a fase inferior majoritariamente por sal. Com o aumento da composição global dos sistemas, a concentração de PEG na fase inferior reduziu, e em alguns casos o PEG é quase que totalmente excluído desta fase, no entanto, na fase superior é observado comportamento oposto. Efeito similar foi observado para SAB formados por PEG e citrato (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Costa *et al.* (2015) também observaram o mesmo comportamento nos SAB's formados por PEG (1000 ou 4000), citrato de sódio e água em valores de pH 5,5, 6,5 e 7,5 na temperatura de 25 °C.

Observando a Tabela 6 e Figura 12, pode-se dizer que não ocorreu nenhum efeito ao avaliar o efeito da temperatura e a ILA com o aumento da composição global. Efeito similar foi observado por CARVALHO *et al.* (2007), ao analisar sistema formado por PEG 4000 + fosfato de potássio.

Já na Tabela 7 e Figura 13, pode-se constatar uma tendência ao aumento da ILA com o aumento da temperatura e de cada composição global avaliada. Este comportamento era esperado, pois a variação da ILA se deve ao fato de que o aumento da hidrofobicidade, intensificado pelo aumento da temperatura, promove a migração de moléculas de água de solvatação do polímero da fase superior para a fase inferior. Resultado semelhante foi obtido por RENGIFO *et al.* (2015), visto que, a concentração de sal na fase inferior diminui e a concentração de polímero na fase superior aumenta, como consequência, observa-se um aumento da ILA.

Para que ocorra a variação da concentração de PEG e de sal nas fases superior e inferior, respectivamente, é necessário que ocorra a transferência da água de uma fase para a outra. O aumento da temperatura aumenta a intensidade da interação sal-PEG, deslocando a curva binodal para região mais próxima aos eixos do diagrama de equilíbrio. Com o aumento da temperatura, a entropia conformacional do polímero aumenta por causa do processo de enovelamento da cadeia e consequente diminuição da solubilidade em água. Neste caso, o aumento da ILA com a elevação da temperatura acontece devido à transferência de água da fase superior para a fase inferior, resultando na diminuição da concentração de sal na fase inferior e aumento da concentração de PEG na fase superior.

Figura 12. Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração formado por PEG 1500 + Citrato de Sódio + Água a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d).

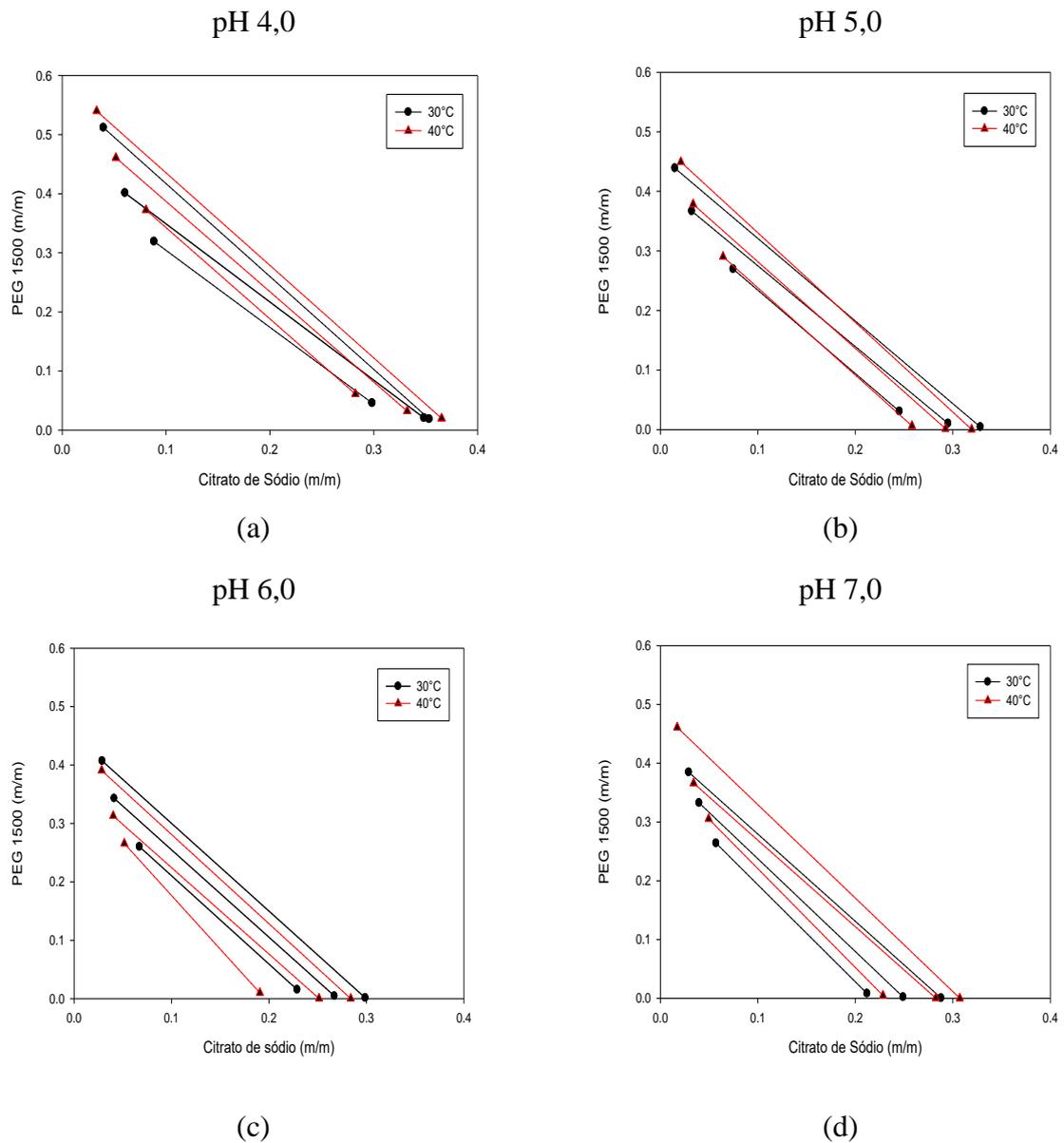
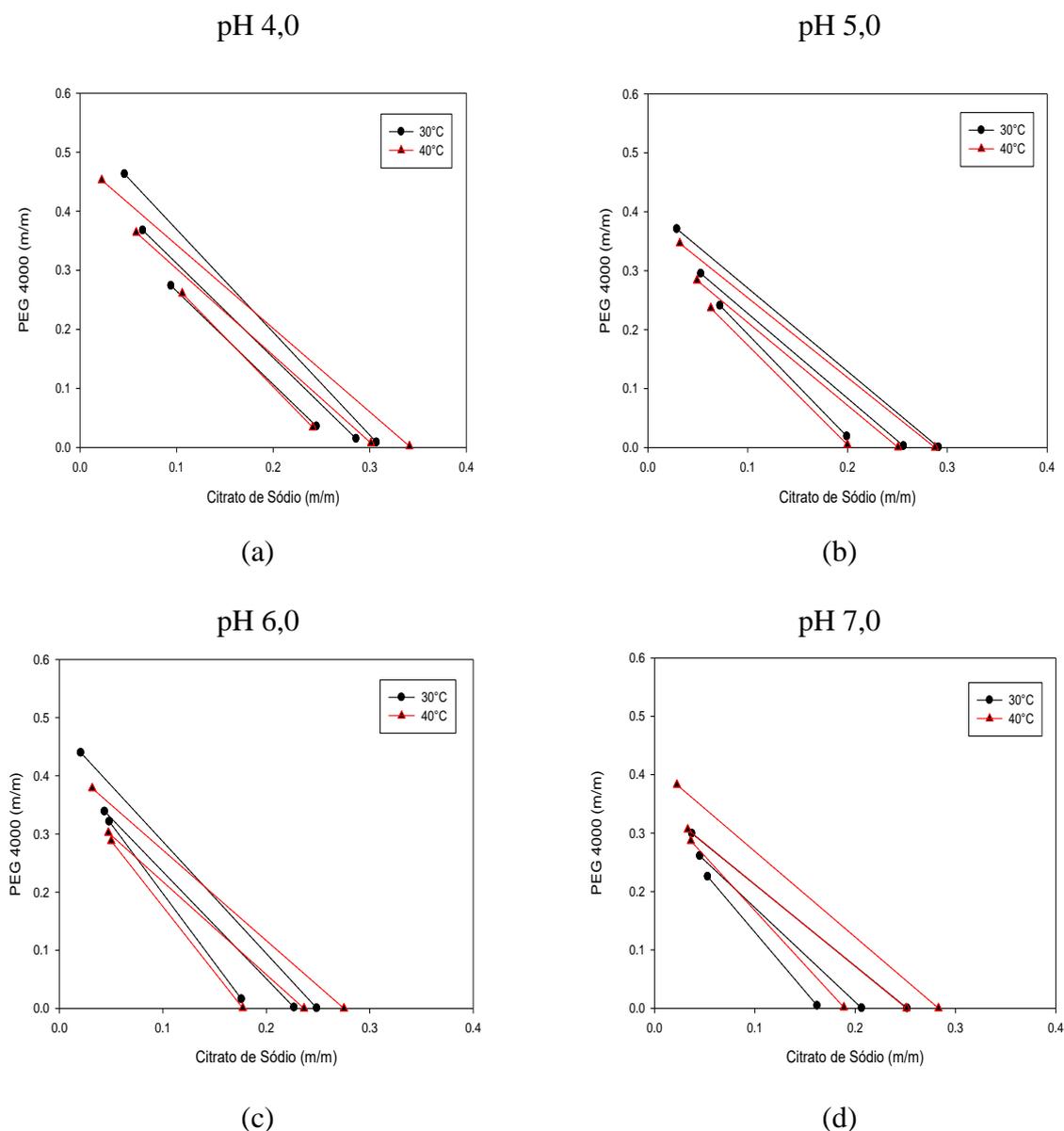


Figura 13. Efeito da temperatura sobre a região bifásica na linha de amarração formado por PEG 4000 + Citrato de Sódio + Água a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d).



As Figuras 14 a 17 e Tabelas 6 e 7, mostram o efeito do pH e da massa molar dos polímeros em relação ao CLA e a ILA, respectivamente. É importante mencionar que não foi observado efeito na inclinação da linha de amarração. TUBÍO *et al.* (2006), estudou a influência dos valores de pH (5,20, 8,20 e 9,20) na temperatura de 22 °C em sistemas compostos por PEG/citrato de sódio, e não observou diferenças nos valores de ILA quando os valores de pH foram variados. TORRES (2013), também não constatou mudanças na ILA quando variou os valores de pH (5,0, 6,0 e 7,0), massa molar (PEG 4000, PEG 6000 e PEG 8000) na temperatura de 25 °C ao estudar sistemas formados por citrato de sódio.

Verificou-se que o CLA aumenta com o aumento da composição global para todos os sistemas estudados, esse comportamento está de acordo com resultados obtidos por SOUSA *et al.*, (2009); MARTINS, (2010) e SAMPAIO *et al.*, (2012).

Figura 14. Efeito do pH no CLA e ILA nos sistemas de PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b) na temperatura de 30 °C.

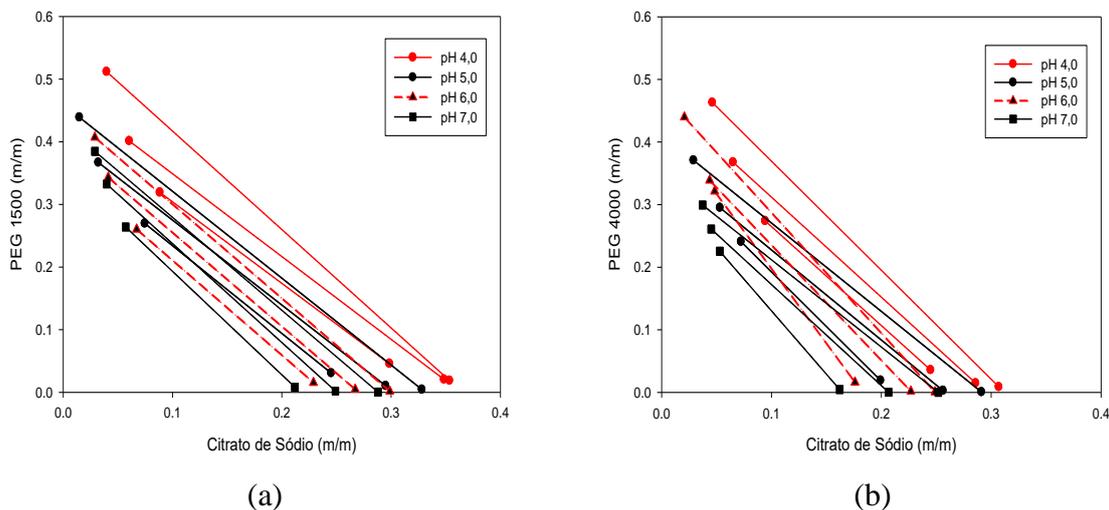


Figura 15. Efeito do pH no CLA e ILA nos sistemas de PEG 1500 (a) e PEG 4000 (b) na temperatura de 40 °C.

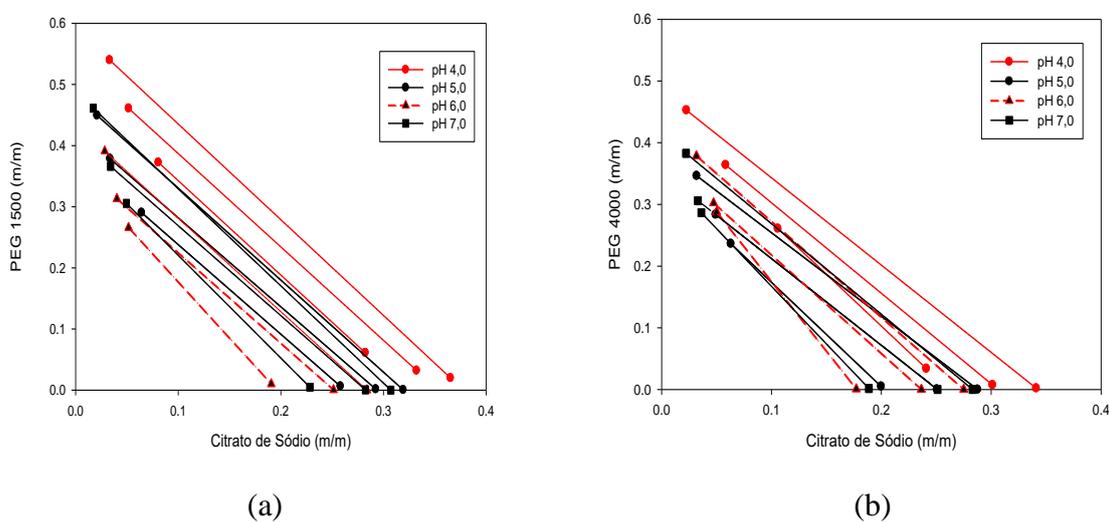


Figura 16. Efeito da massa molar no CLA e ILA dos sistemas formados por PEG 1500 e PEG 4000 a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d) na temperatura de 40 °C.

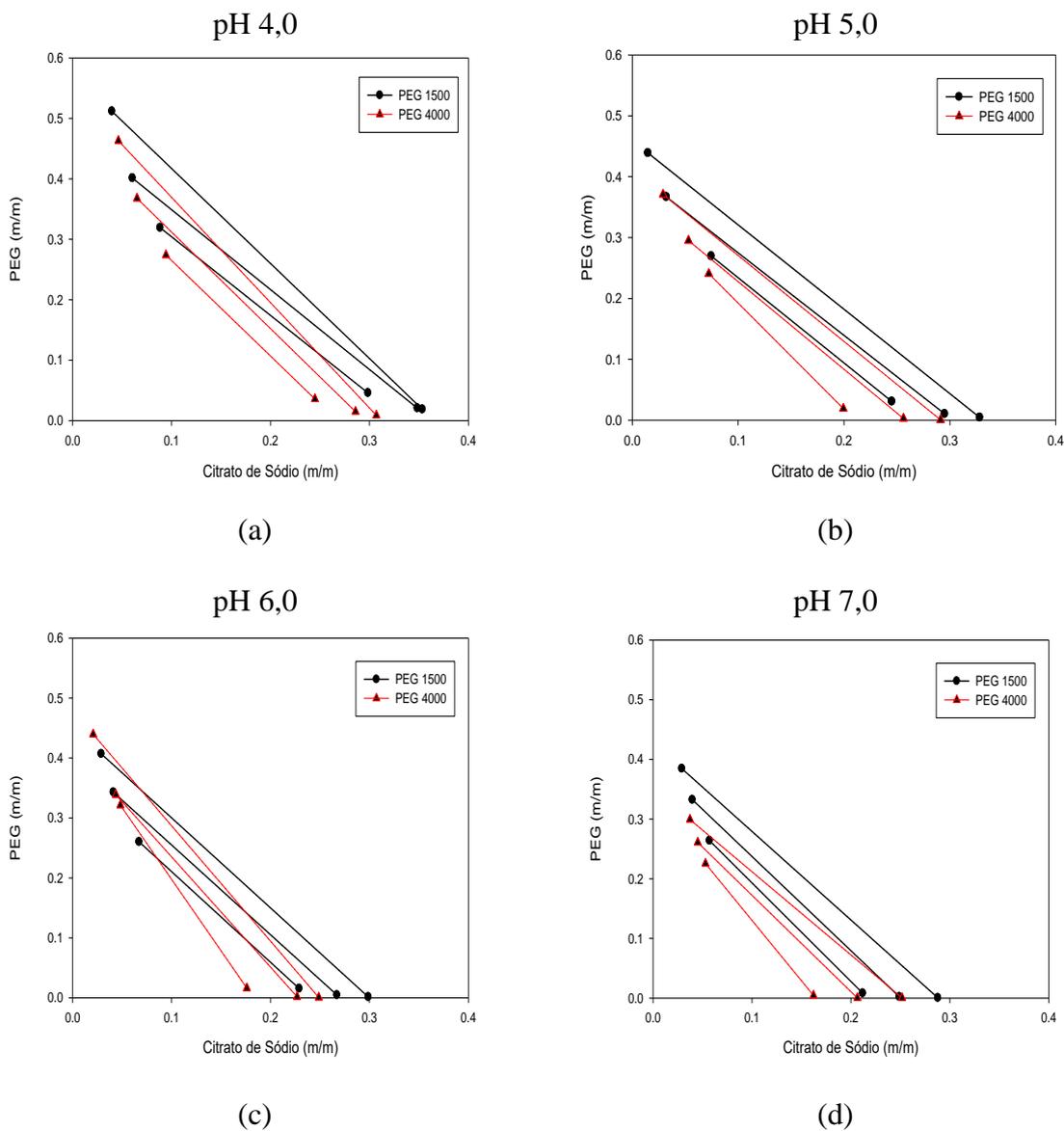
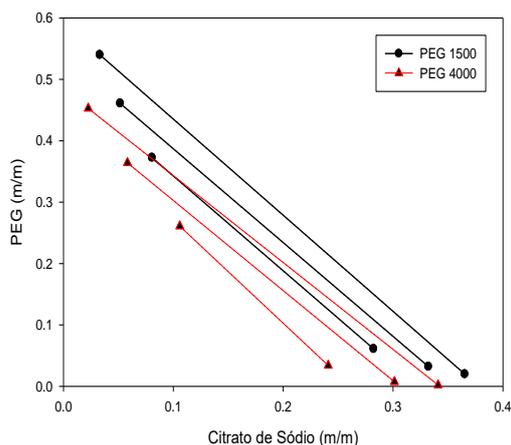


Figura 17. Efeito da massa molar no CLA e ILA dos sistemas formados por PEG 1500 e PEG 4000 a pH 4,0 (a), pH 5,0 (b), pH 6,0 (c) e pH 7,0 (d) na temperatura de 30 °C.

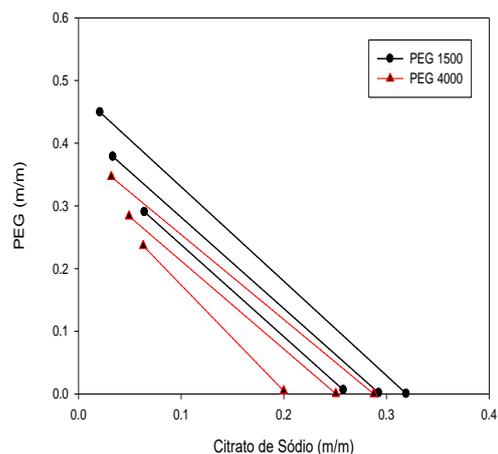
pH 4,0

pH 5,0



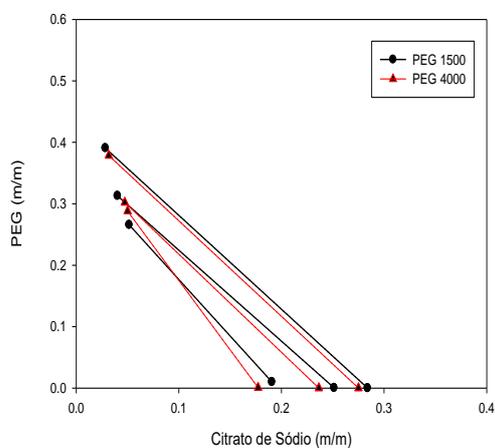
(a)

pH 6,0

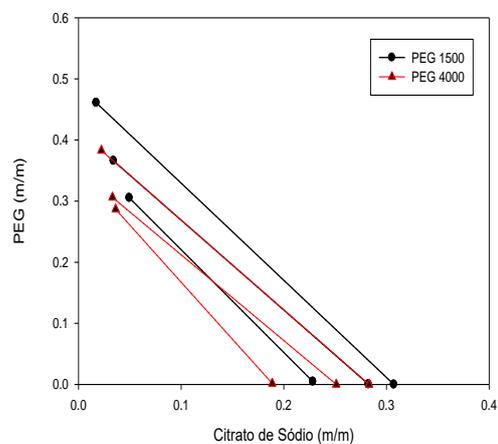


(b)

pH 7,0



(c)



(d)

Os dados obtidos experimentalmente para densidade ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) das fases superior e inferior estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, para os sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água e PEG 4000 + citrato de sódio + água, nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0, nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.

Observa-se que a densidade das fases superior e inferior dos sistemas estudados variaram de $1,044 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $1,087 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e $1,125 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $1,262 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, respectivamente. Com o aumento da temperatura, os valores da densidade em ambas as fases tiveram uma tendência a diminuir levemente ou permanecerem próximos com o aumento composição global.

De acordo com SILVA (2005), a elevação da temperatura leva à redução da densidade de ambas as soluções avaliadas. A diminuição da densidade em decorrência do aumento da temperatura pode ser atribuída a maior mobilidade das moléculas do líquido, que causa a diminuição de interações moleculares e a expansão do volume (SIANGCO; LERON; LI, 2013).

A partir das Tabelas 6 e 7, também é possível observar que a fase inferior, composta majoritariamente por sal e água, é muito mais densa que a fase superior, rica em PEG e água,

consequentemente, a formação de fase será mais rápida em razão da grande diferença de densidade entre as fases. O mesmo comportamento foi verificado por BARBOSA *et al.* (2016), em sistemas compostos por PEG 1500 + sulfato de sódio + água, PEG 2000 + sulfato de sódio + água, PEG 4000 + sulfato de sódio + água, PEG6000 + sulfato de sódio + água, nas temperaturas de 20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C no pH 2,0.

As análises seguintes desse trabalho foram realizadas com sistemas formados por PEG 1500, pois de acordo com os resultados expostos apresentaram os melhores ajustes para o CLA e ILA, quando comparados aos sistemas formados por PEG 4000.

5.2 Estimativa de parâmetros

Nesse trabalho os dados experimentais das linhas de amarração foram utilizados para estimar novos parâmetros de interação de grupo para o modelo UNIFAC original.

Os dados das linhas de amarração obtidos experimentalmente nesse trabalho para sistemas formados por PEG 1500, citrato de sódio e água, nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C, foram correlacionados pelo modelo UNIFAC. Para essa estimativa foram necessários parâmetros de volume e área de grupo R_K e Q_K . Estes podem ser visualizados na Tabela 4, descrita no item 4.2.5.1.

Alguns parâmetros de interação de grupo já existentes na literatura, parâmetros estimados, e os valores da energia de interação (T_{ij}) dos melhores ajustes obtidos, estão dispostos nas Tabelas 8-11.

Tabela 8. Parâmetros de interação de grupo da literatura, parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio, pH 4,0 em temperatura de 30 °C.

Grupo i	Grupo j	A_{ij}	A_{ji}	T_{ij}	Referências
CH ₂	CH ₂ O	662,1	1571	0,112461	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	OH ⁻	644,6	328,2	0,1191475	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	C	0	0	1	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	COO ⁻	541,6	1172	0,167385	Pinto, 2015
CH ₂	Na ⁺	1257,7	1681,1	0,0157514	Yan <i>et al.</i> , 1999
CH ₂	H ₂ O	1300	342,5	0,013699	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	OH ⁻	137,1	262,5	0,6360518	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	C	1571	662,1	0,005601	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	COO ⁻	-13414	2746,6	1,685E ⁺¹⁹	Parâmetros estimados
CH ₂ O	Na ⁺	-8000,1	-32,452	2,929E ⁺¹¹	Parâmetros estimados
CH ₂ O	H ₂ O	212,8	64,42	0,4954394	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
OH ⁻	C	328,2	644,6	0,3385213	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
OH ⁻	COO ⁻	68,3	186,8	0,7981869	Pinto, 2015
OH ⁻	Na ⁺	1610,4	783,6	0,004918	Yan <i>et al.</i> , 1999
OH ⁻	H ₂ O	28,73	-122,4	0,909538	Magnussen <i>et al.</i> , 1981

C	COO ⁻	541,6	1172	0,167385	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
C	Na ⁺	1257,7	1681,1	0,0157514	Yan <i>et al.</i> , 1999
C	H ₂ O	1300	342,5	0,013699	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
COO ⁻	Na ⁺	-8235,1	-14071	6,361E ⁺¹¹	Parâmetros estimados
COO ⁻	H ₂ O	-125,79	2974,1	1,5145957	Parâmetros estimados
Na ⁺	H ₂ O	-165	22,38	1,7238402	Yan <i>et al.</i> , 1999

Tabela 9. Parâmetros de interação de grupo da literatura, parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio, pH 5,0 em temperatura de 30 °C.

Grupo i	Grupo j	A _{ij}	A _{ji}	T _{ij}	Referências
CH ₂	CH ₂ O	662,1	1571	0,112461	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	OH ⁻	644,6	328,2	0,119148	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	C	0	0	1	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	COO ⁻	541,6	1172	0,167385	Pinto, 2015
CH ₂	Na ⁺	1257,7	1681,1	0,015751	Yan <i>et al.</i> , 1999
CH ₂	H ₂ O	1300	342,5	0,013699	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	OH ⁻	137,1	262,5	0,636052	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	C	1571	662,1	0,005601	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	COO ⁻	1765,2	-465,49	0,002951	Parâmetros estimados
CH ₂ O	Na ⁺	-2713,1	621,54	7739,756	Parâmetros estimados
CH ₂ O	H ₂ O	212,8	64,42	0,495439	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
OH ⁻	C	328,2	644,6	0,338521	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
OH ⁻	COO ⁻	68,3	186,8	0,798187	Pinto, 2015
OH ⁻	Na ⁺	1610,4	783,6	0,004918	Yan <i>et al.</i> , 1999
OH ⁻	H ₂ O	28,73	-122,4	0,909538	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
C	COO ⁻	541,6	1172	0,167385	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
C	Na ⁺	1257,7	1681,1	0,015751	Yan <i>et al.</i> , 1999
C	H ₂ O	1300	342,5	0,013699	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
COO ⁻	Na ⁺	-2995,9	-2936,5	19681,98	Parâmetros estimados
COO ⁻	H ₂ O	-417,47	-2248,2	3,966122	Parâmetros estimados
Na ⁺	H ₂ O	-165	22,38	1,72384	Yan <i>et al.</i> , 1999

Tabela 10. Parâmetros de interação de grupo da literatura, parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio, pH 6,0 em temperatura de 30 °C.

Grupo i	Grupo j	A _{ij}	A _{ji}	T _{ij}	Referências
CH ₂	CH ₂ O	662,1	1571	0,112461	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	OH ⁻	644,6	328,2	0,119148	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	C	0	0	1	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	COO ⁻	541,6	1172	0,167385	Pinto, 2015
CH ₂	Na ⁺	1257,7	1681,1	0,015751	Yan <i>et al.</i> , 1999
CH ₂	H ₂ O	1300	342,5	0,013699	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	OH ⁻	137,1	262,5	0,636052	Magnussen <i>et al.</i> , 1981

CH ₂ O	C	1571	662,1	0,005601	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	COO ⁻	-8947	1530,8	6,67E ⁺¹²	Parâmetros estimados
CH ₂ O	Na ⁺	-2697,6	-146,15	7353,784	Parâmetros estimados
CH ₂ O	H ₂ O	212,8	64,42	0,495439	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
OH ⁻	C	328,2	644,6	0,338521	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
OH ⁻	COO ⁻	68,3	186,8	0,798187	Pinto, 2015
OH ⁻	Na ⁺	1610,4	783,6	0,004918	Yan <i>et al.</i> , 1999
OH ⁻	H ₂ O	28,73	-122,4	0,909538	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
C	COO ⁻	541,6	1172	0,167385	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
C	Na ⁺	1257,7	1681,1	0,015751	Yan <i>et al.</i> , 1999
C	H ₂ O	1300	342,5	0,013699	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
COO ⁻	Na ⁺	-3001,3	-10057	20035,89	Parâmetros estimados
COO ⁻	H ₂ O	-54,651	-9243,3	1,197656	Parâmetros estimados
Na ⁺	H ₂ O	-165	22,38	1,72384	Yan <i>et al.</i> , 1999

Tabela 11. Parâmetros de interação de grupo da literatura, parâmetros estimados e energia de interação para sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio, pH 7,0 em temperatura de 30 °C.

Grupo i	Grupo j	A _{ij}	A _{ji}	T _{ij}	Referências
CH ₂	CH ₂ O	662,1	1571	0,112461	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	OH ⁻	644,6	328,2	0,119148	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	C	0	0	1	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂	COO ⁻	541,6	1172	0,167385	Pinto, 2015
CH ₂	Na ⁺	1257,7	1681,1	0,015751	Yan <i>et al.</i> , 1999
CH ₂	H ₂ O	1300	342,5	0,013699	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	OH ⁻	137,1	262,5	0,636052	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	C	1571	662,1	0,005601	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
CH ₂ O	COO ⁻	-11752	-612,54	6,99E ⁺¹⁶	Parâmetros estimados
CH ₂ O	Na ⁺	1079,4	-165,29	0,028371	Parâmetros estimados
CH ₂ O	H ₂ O	212,8	64,42	0,495439	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
OH ⁻	C	328,2	644,6	0,338521	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
OH ⁻	COO ⁻	68,3	186,8	0,798187	Pinto, 2015
OH ⁻	Na ⁺	1610,4	783,6	0,004918	Yan <i>et al.</i> , 1999
OH ⁻	H ₂ O	28,73	-122,4	0,909538	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
C	COO ⁻	541,6	1172	0,167385	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
C	Na ⁺	1257,7	1681,1	0,015751	Yan <i>et al.</i> , 1999
C	H ₂ O	1300	342,5	0,013699	Magnussen <i>et al.</i> , 1981
COO ⁻	Na ⁺	-1310	-11660	75,44714	Parâmetros estimados
COO ⁻	H ₂ O	1679,1	2471,3	0,00392	Parâmetros estimados
Na ⁺	H ₂ O	-165	22,38	1,72384	Yan <i>et al.</i> , 1999

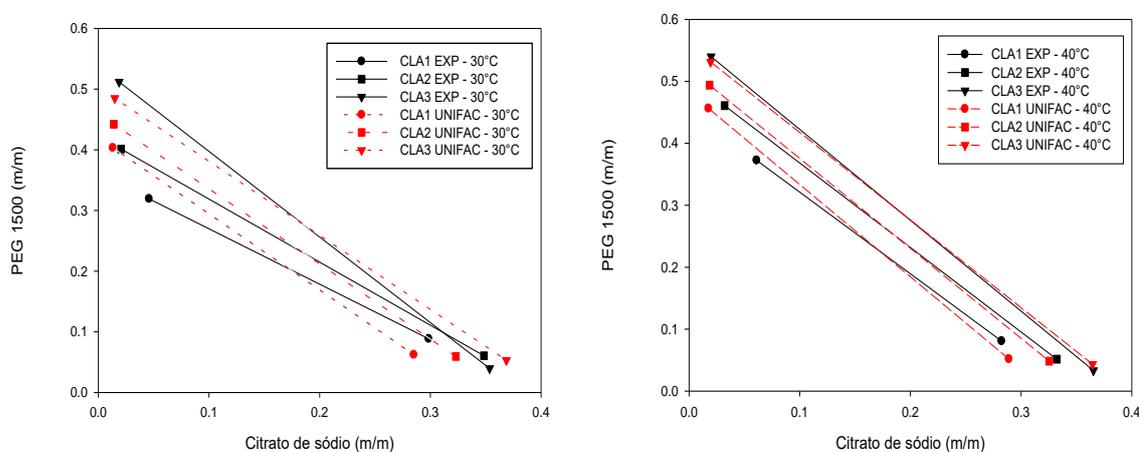
O desvio médio calculado para cada sistema utilizando o modelo UNIFAC, aparece na Tabela 12.

Tabela 12. Desvios nas composições (UNIFAC) para o PEG 1500.

Sistemas	Δw (%)
PEG + citrato de sódio + água, pH 4,0, T = 30 °C	3,36
PEG + citrato de sódio + água, pH 4,0, T = 40 °C	2,79
PEG + citrato de sódio + água, pH 5,0, T = 30 °C	6,55
PEG + citrato de sódio + água, pH 5,0, T = 40 °C	8,45
PEG + citrato de sódio + água, pH 6,0, T = 30 °C	10,54
PEG + citrato de sódio + água, pH 6,0, T = 40 °C	11,08
PEG + citrato de sódio + água, pH 7,0, T = 30 °C	10,11
PEG + citrato de sódio + água, pH 7,0, T = 40 °C	9,39
Desvio médio global	7,78

Na figura 18 são apresentados os gráficos comparativos dos dados experimentais e calculados através do modelo UNIFAC.

Figura 18. Dados experimentais e preditos pelo modelo UNIFAC para o sistema PEG1500 + citrato de sódio+ água, pH 4,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.



Com base nos desvios obtidos, conclui-se que o modelo UNIFAC pode ser satisfatoriamente utilizado para prever os dados das linhas de amarração para sistemas formados por PEG 1500, citrato de sódio e água, no valor de pH 4,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C. Resultado semelhante foi obtido por PERUMALSAMY (2006), ao estudar sistemas formados por PEG 2000 e citrato de sódio nas temperaturas de 25 °C, 35 °C e 45 °C. LEMOS *et al*, (2011) obtiveram resultados satisfatórios para sistemas formados por PEG 1500 e sal (sulfato de zinco e sulfato de amônio) nas temperaturas de 25 °C e 40 °C. O modelo UNIFAC não originou bons resultados para os valores de pH 5,0, 6,0 e 7,0.

5.3 Volume de exclusão

O volume de exclusão foi calculado com base nos dados experimentais das binodais e os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores calculados do volume de exclusão de sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água, nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 a 30 °C e 40 °C.

pH	Temperatura (°C)	V ₂₁₃ [*] (g/mol ⁻¹)	R ²
4	30	2176,714	0,992
5	30	2708,462	0,978
6	30	2818,755	0,975
7	30	2959,106	0,952
4	40	2046,438	0,996
5	40	2489,888	0,990
6	40	2516,283	0,967
7	40	2562,438	0,985

Com base no valores de volume de exclusão obtidos na Tabela 13 pode-se observar que com o aumento dos valores de pH o volume de exclusão, isto é, os espaços vazios disponíveis para interações moleculares, teve uma tendência a aumentar.

Esse comportamento pode ser explicado devido ao tipo de sal usado, pois o ânion citrato é uma espécie trivalente, à medida que se adiciona uma solução de ácido cítrico a uma solução de citrato de sódio, aumenta-se a quantidade de íons H⁺ no meio, reduzindo-se o pH, e formando novos tipos de ânions, os divalentes e os monovalentes. De acordo com TUBÍO *et al.*, (2006), os íons trivalentes são mais facilmente solvatados pelas moléculas de água e, portanto, mais eficientes na promoção da exclusão do polímero.

Sendo assim, com o aumento do pH, menos protonação de ânions ocorre, e, por conseguinte, uma valência mais elevada é observada. Ânions com uma valência superior são melhores agentes de salting-out do que ânions com uma valência inferior, visto que, eles têm uma maior capacidade de hidratação. Devido à maior hidratação, a fase salina possuirá maior disponibilidade de interação com moléculas de água, por isso o volume de exclusão dos sistemas formados com pH 7 são maiores que os demais.

De acordo os parâmetros da energia de interação descritos nas Tabelas 8-11 podemos observar que a interação do sal (Na⁺) com a água (H₂O) foi maior do que o PEG (CH₂O) com água (H₂O), esse comportamento era esperado pois os íons do sal tem maior capacidade de interagir com a água do que com as moléculas do PEG. Outro fator observado, foi que com o

aumento dos valores de pH aumenta-se a valência dos íons de sal presentes na fase salina, com esse aumento, esses terão maior capacidade de hidratação, logo, estariam solvatando mais moléculas de água, sobrando assim menores moléculas de sal para interagir com a fase polimérica sendo menor a energia de interação entre eles e maior o volume de exclusão. Comprovando assim, os resultados obtidos na Tabela 14 a 30 °C.

5.4 Partição da α -amilase

Foram realizados os estudos de partição da α -amilase utilizando sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água. Nas Tabelas 14 a 17 estão apresentados os valores para o coeficiente de partição da proteína (K_p), da atividade enzimática (K_e) e da recuperação teórica (Y%) e seletividade (S) da α -amilase nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.

A distribuição desigual de proteínas entre as duas fases aquosas, é resultante de um delicado balanço de interações entre a proteína e as outras espécies presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (LUECHAU *et al.*, 2010). Diversas propriedades físico-químicas do sistema e da biomolécula determinam o valor de K_p , por exemplo, algumas propriedades das fases como natureza químicas dos componentes, massa molar, pH, temperatura, concentrações de sal e do polímero, comprimento das linhas de amarração, entre outras (DA SILVA e LOH, 2006).

Tabela 14. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e), recuperação teórica (Y%) e seletividade (S) nos sistemas formados por citrato de sódio + PEG 1500 + água no valor de pH 4,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.

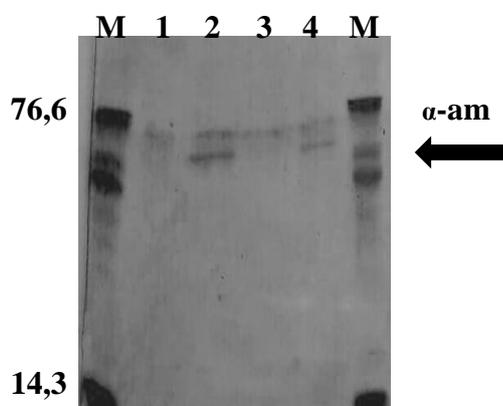
CLA	T (°C)	K_p	K_e	Y(%)	S
		PEG 1500			
34,46	30	2,188	0,069	4,377	0,031
47,73		1,319	0,253	15,000	0,192
58,44		1,072	0,308	21,763	0,287
37,09	40	1,665	1,155	67,792	0,694
51,24		1,427	1,710	73,325	1,198
61,70		1,164	3,640	84,264	3,127

Na Tabela 14 observa-se que o valor de k_p foi maior que 1,0, indicando que ocorreu uma maior migração de moléculas de proteínas para a fase superior. Como na amostra existiam outras proteínas além da α -amilase, o K_e foi determinado. Verificou-se que apesar de ocorrer uma concentração das proteínas na fase superior para as duas temperaturas estudadas, a α -

amilase concentrou-se na fase inferior para a temperatura de 30 °C e na fase superior na temperatura de 40 °C.

Para comprovar a presença da α -amilase em uma das fases em sistema formado por PEG 1500 + citrato de sódio + água no valor de pH 4,0 e temperatura de 30 °C foi realizado a análise de eletroforese SDS-PAGE, apresentado na figura 19.

Figura 19. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) da α -amilase, (M) marcador molecular de proteínas (Lisozima 14,3 kDa, Conalbumina 76,6 kDa e Albumina 45 kDa); (1) LA1 – Fase superior; (2) LA1 – Fase inferior; (3) LA3 – Fase superior; (4) LA3 – Fase inferior; (M) marcador molecular de proteínas (Lisozima 14,3 kDa, Conalbumina 76,6 kDa e Albumina 45 kDa).



As bandas do marcador molecular utilizado foram de 14,3 até 76,6 kDa. Pode-se observar a presença da α -amilase no intervalo de aproximadamente 59 kDa, a mesma teve preferência pela fase inferior em todas as amostras analisadas, indicando que esses sistemas são adequados para a separação da α -amilase. PORFIRI *et al.* (2016), estudando a partição da enzima α -amilase produzida por *Aspergillus oryzae*, observaram que a massa molar para esta, foi de 55 kDa.

Logo, o sistema formado por PEG 1500 a 30 °C houve uma boa capacidade de separação das proteínas presentes ao observar o coeficiente de partição e o coeficiente de atividade da α -amilase, indicando ser o melhor sistema para o valor de pH 4,0.

Notou-se também que os maiores valores de seletividade (S) corresponderam aos maiores valores de coeficiente de partição da atividade da α -amilase (K_e). Valores de K_e e seletividade maiores que a unidade podem indicar que a α -amilase teve maior afinidade pela fase rica em PEG nas condições experimentais analisadas.

Tabela 15. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e), recuperação teórica (Y%) e seletividade (S) nos sistemas formados por citrato de sódio + PEG 1500 + água no valor de pH 5,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.

CLA	T (°C)	K_p	K_e	Y(%)	S
		PEG 1500			
29,34	30	0,678	0,574	33,645	0,846
44,30		0,259	0,625	37,416	2,413
53,57		0,107	0,901	46,263	8,420
34,38	40	0,253	0,102	8,222	0,403
45,73		0,192	0,229	18,190	1,193
53,89		0,179	0,275	21,370	1,536

Pode-se verificar na tabela 15 que para todos os sistemas analisados, os valores do coeficiente de partição da proteína (K_p) foram inferiores a 1, exibindo migração preferencialmente para a fase inferior rica em sal. Comportamento semelhante foi observado por PEREZ *et al.* (2013), ao estudar a partição da α -amilase em sistemas formados por PEG (4000, 6000 ou 8000) e citrato de sódio na temperatura de 22 °C em pH 5,0. Isso pode ter ocorrido em virtude da menor concentração de sal da fase superior que a fase inferior, que implica numa menor concentração de íons livres, isso pode ocasionar uma maior estabilidade da enzima na fase inferior (GANDOLFI, 2016).

O melhor sistema para o pH 5,0 foi observado no valor da seletividade $S = 8,420$, visto que, quanto maior o valor de S, mais seletivo é o processo.

Tabela 16. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e), recuperação teórica (Y%) e seletividade (S) nos sistemas formados por citrato de sódio + PEG 1500 + água no valor de pH 6,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.

CLA	T (°C)	K_p	K_e	Y(%)	S
		PEG 1500			
29,33	30	1,786	0,667	32,207	0,373
40,68		7,286	1,054	56,488	0,144
48,72		18,803	1,017	56,023	0,054
29,09	40	0,057	0,402	26,853	7,052
37,71		0,256	0,544	26,003	2,125
46,68		2,076	0,730	32,497	0,339

Observa-se na Tabela 16 que o coeficiente de partição diminui com o aumento da temperatura do sistema a 40 °C e aumenta com o aumento da CLA. Tem sido relatado que quando a temperatura aumenta, a estrutura de PEG se torna mais aberta e, como resultado a sua interação com a proteína diminui, reduzindo o coeficiente de partição e aumentando o efeito de

volume de exclusão (NUCCI *et al.*, 2001). Comportamento similar foi observado por JUNQUEIRA (2014), ao analisar a partição da lipase em sistemas formados por PEG 4000/citrato de sódio nas temperaturas de (5, 10, 25, 35 45) °C.

Com base nos resultados analisados na Tabela 17, os pontos ótimos para a separação da α -amilase foram nos sistemas formados por PEG 1500 a 30 °C, por apresentar os maiores coeficientes de partição.

Tabela 17. Coeficiente de partição da proteína (K_p), atividade amilásica (K_e), recuperação teórica (Y%) e seletividade (S) nos sistemas formados por citrato de sódio + PEG 1500 + água no valor de pH 7,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C.

CLA	T (°C)	K_p	K_e	Y(%)	S
		PEG 1500			
29,89	30	0,396	0,646	28,875	1,631
39,11		0,612	0,832	36,000	1,359
46,32		7,402	1,596	71,132	0,215
34,97	40	4,578	0,355	20,611	0,077
44,19		6,582	1,022	61,835	0,155
54,45		8,394	14,684	95,373	1,749

Pode-se verificar na Tabela 17 que o coeficiente de partição aumentou com o aumento da temperatura, indicando que a α -amilase tem preferência pela fase rica em PEG. SARUBBO *et al.*, (2004) observaram um aumento no coeficiente de partição da enzima tripsina ao utilizar um SAB formado por PEG 1500, variando a temperatura de 25 °C para 40 °C.

Pode-se observar ainda que tanto o coeficiente de partição da proteína, quanto o coeficiente de partição da atividade da α -amilase tiveram uma tendência a aumentar com o aumento da concentração dos constituintes PEG + citrato de sódio. De acordo com DA SILVA e LOH (2006), tal comportamento é resultado do aumento da diferença de composição entre as fases.

Desta forma é evidenciado que os SAB's composto por PEG 1500 + citrato de sódio + água a 40 °C apresentados neste estudo podem ser uma alternativa para pré-concentração da α -amilase, tendo em vista que esta é uma técnica que apresentam boa seletividade para a separação desta enzima.

5.5 Análise termodinâmica da partição

A energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{tr}G$) é o parâmetro termodinâmico utilizado para relacionar as contribuições entálpicas e entrópicas da partição das moléculas alvo. Para a partição de proteínas, esta variável termodinâmica é a variação na energia livre molar associada

com o processo de transferência da proteína da fase salina para a fase polimérica e é calculada pela equação da termodinâmica clássica (Eq. 22), a partir do valor do coeficiente de partição (K). Na Tabela 18 está a relação entre as variáveis $\Delta_{tr}G$ e CLA para os SAB's estudados, onde os coeficientes de partição utilizados foram o K_p e o K_e , respectivamente.

Observa-se um aumento da energia livre ($\Delta_{tr}G_p$) do sistema com o aumento do CLA para os valores de pH 4,0 e 5,0, para as duas temperaturas estudadas. Entretanto, observa-se comportamento oposto para os valores de pH 6,0 e 7,0. SOUSA *et al.* (2009), ao estudar a partição da conalbumina em sistemas formados por PEG 1500 e sal (citrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de lítio e sulfato de sódio), observou uma aumento linear da energia livre do sistema com o aumento do CLA, no entanto, para a lisozima foi verificado o comportamento contrário.

Para os valores de $\Delta_{tr}G_e$ verifica-se a redução para todos valores de pH em função do aumento da CLA. Verifica-se que em algumas condições o comportamento da partição da α -amilase é inverso ao das proteínas totais.

Tabela 18. Energia livre de transferência $\Delta_{tr}G$ da α -amilase em SAB's formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água nos valores de pH 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 a 30 °C e 40 °C.

Ph	CLA	$\Delta_{tr}G_p$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{tr}G_e$ (kJ mol ⁻¹)	CLA	$\Delta_{tr}G_p$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{tr}G_e$ (kJ mol ⁻¹)
4,0	34,46	-1,973	6,735	37,09	-1,326	-0,375
4,0	47,73	-0,697	3,462	51,24	-0,925	-1,396
4,0	58,44	-0,175	2,967	61,70	-0,395	-3,362
5,0	29,34	0,978	1,399	34,38	3,576	5,940
5,0	44,30	3,403	1,184	45,73	4,294	3,836
5,0	53,57	5,630	0,263	53,89	4,476	3,359
6,0	29,33	-1,461	1,020	29,09	7,454	2,371
6,0	40,68	-5,003	-0,132	37,71	3,545	1,584
6,0	48,72	-7,391	-0,042	46,68	-1,900	0,819
7,0	29,89	2,333	1,101	34,97	-3,832	2,609
7,0	39,11	1,236	0,463	44,19	-4,746	-0,055
7,0	46,32	-5,042	-1,178	54,45	-5,359	-6,768

Observa-se que a transferência das proteínas para a fase polimérica nos valores de pH 4,0 em ambas as temperaturas, é um processo espontâneo ($\Delta_{tr}G < 0$). No entanto, avaliando-se a

transferência da α -amilase para a fase superior verifica-se que esta é espontânea somente para a temperatura de 40 °C. Neste caso, pode-se supor que a contribuição entálpica se sobrepõe à contribuição entrópica. Logo, pode-se constatar que a partição é governada por interações moleculares. A fase polimérica tem menor gasto de energia para separar as ligações PEG-água do que as ligações água-sal. Deste modo, com o aumento da concentração de PEG a auto-energia da fase superior também aumenta, favorecendo a partição da α -amilase para esta fase (SOUSA *et al.*, 2009).

Já a transferência da α -amilase nos valores de pH 5,0 em ambas as temperaturas, é um processo não espontâneo ($\Delta_{tr}G > 0$). Isto significa que a partição não é governada por interações intermoleculares e sim pelo número de configurações que a proteína pode assumir na fase salina, devido ao maior conteúdo de moléculas presentes nesta fase (maior entropia) (SOUSA *et al.*, 2009).

Nos valores de pH 6,0 e 7,0 observou uma variação na transferência de proteínas, tanto para a fase polimérica quanto para a fase salina.

5.5.1 Determinação da variação da Entalpia e da Entropia da partição da α -amilase

Termodinamicamente, $\Delta_{tr}G_p$ pode ser dividida em duas contribuições, uma entálpica ($\Delta_{tr}H_p$) e outra entrópica ($\Delta_{tr}S_p$). A entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H_p$) foi obtida pela microcalorimetria de titulação isotérmica. A partir dos valores de $\Delta_{tr}G_p$ e de $\Delta_{tr}H_p$, usando a equação (Eq. 23) descrita no item 4.2.8 foi possível calcular a entropia de transferência.

Na Tabela 19 estão apresentados os parâmetros termodinâmicos para os sistemas PEG 1500+citrato+água, na temperatura 40 °C e valores de pH de 4,0 e 7,0.

Tabela 19. Propriedades termodinâmicas de transferência da α -amilase em sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio + água na temperatura de 40 °C.

CLA	pH	$\Delta_{tr}G(\text{kJ mol}^{-1})$	$\Delta_{tr}H(\text{kJ mol}^{-1})$	$T\Delta_{tr}S(\text{kJ mol}^{-1})$
37,09	4,0	-1,326	1,843	3,170
51,24	4,0	-0,925	-0,576	0,349
61,70	4,0	-0,395	-0,001	0,394
34,97	7,0	-3,832	-0,605	3,230
44,19	7,0	-4,746	-0,107	4,640
54,45	7,0	-5,359	0,792	6,150

Observa-se na Tabela 19 que para todos os sistemas o coeficiente de partição da α -amilase é um processo espontâneo ($\Delta_{tr}G < 0$). Verificou-se que tanto em pH 4,0, quanto em pH 7,0 a partição da α -amilase foi entropicamente dirigida para a fase superior.

A entropia leva a proteína a particionar para a fase com maior número de moléculas, pois nesta fase haverá um maior número de formas de distribuí-las, aumentando assim a contribuição da entropia configuracional. Assim, a contribuição entrópica fará a enzima tender a particionar para a fase com maior conteúdo de moléculas de água.

Possivelmente, a α -amilase ao migrar para a fase superior promove a liberação de moléculas de água que estavam interagindo com o PEG, o que favorece a entropia do sistema, fazendo com que aja preferência da enzima pela fase superior do sistema estudado. Resultado semelhante foi obtido por Santos (2011), ao estudar a partição de β -galactosidase em sistemas aquosos bifásicos constituídos por PEG e poliacrilato de sódio.

6 CONCLUSÃO

Foi possível verificar que nos sistemas formados por PEG, citrato de sódio e água, o efeito da temperatura não apresentou grandes variações na região bifásica. No entanto, quanto maior o valor do pH e a massa molar do polímero, maior a região bifásica. Em relação às linhas de amarração, para sistemas formados por PEG 1500, não se observou efeito da temperatura sobre a inclinação da linha de amarração, enquanto que para sistemas formados por PEG 4000 os valores da ILA tenderam a aumentar com o aumento da temperatura.

Utilizou-se os dados experimentais das linhas de amarração para estimar novos parâmetros de interação de grupo com o modelo UNIFAC para sistemas formados por PEG 1500 e citrato de sódio. Em pH 4,0 nas temperaturas de 30 °C e 40 °C notou-se os menores desvios.

Com relação a partição da α -amilase, foi observado em pH 4,0 que a mesma possuía uma forte tendência em se transferir para a fase rica em polímero. Foi verificado que a α -amilase teve preferência pela fase inferior composta por sal em pH 5,0. Ao avaliar o valor de pH 6,0, notou-se que o coeficiente partição da proteína aumentou com a redução da temperatura a 30 °C. Já em pH 7,0 pode-se notar que o coeficiente de partição aumentou com a temperatura.

Ao avaliar a energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_r G$) dos coeficientes de partição (K_p e o K_e) da α -amilase observou-se que a transferência das proteínas para a fase polimérica nos valores de pH 4,0 em ambas as temperaturas, é um processo espontâneo. Já a transferência da α -amilase para a fase superior nos valores de pH 5,0 em ambas as temperaturas, é um processo não espontâneo. Ao determinar a variação da Entalpia e da Entropia da partição da α -amilase, verificou-se que em pH 4,0 e 7,0 a partição foi entropicamente dirigida para a fase superior.

Portanto, pode-se concluir que os SAB's em estudo pode ser uma alternativa promissora para a pré-concentração da enzima α -amilase, uma vez que estes proporcionaram a separação da mesma.

7 REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. J. G.; TJERNELD, F. Aqueous two-phase separations. In: ASENJO, J. A. (Ed.). Separation Processes in Biotechnology. New York: Marcell Dekker, Cap. p. 287-327, 1990.
- ALBERTSSON, P-Å. Partition of Cell Particles and Macromolecules. Stockolm: Almquist & Wiksells, p. 231 , 1960.
- ALBERTSSON, P.A. Partition of cell and macromolecules. New York: John Wiley, p. 346, 1986.
- ALVARENGA, J. M.; FIDELES, R. A.; SILVA, M. V.; MURARI, G. F.; TAYLOR, J. G.; LEMOS, L. R.; RODRIGUES, D. R.; MAGESTE, A. B. Partition study of textile dye Remazol Yellow Gold RNL in aqueous two-phase systems. Fluid Phase Equilibria, v. 391, p. 1–8, 2015.
- AMARESH, S. P.; SHREELA, M.; REGUPATHI, I.; MURUGESAN, T. Liquid- Liquid Equilibrium of Poly (ethylene glycol) 4000 + diAmmonium Hydrogen Phosphate + Water at different temperatures. J. Chem. Eng. Data, v. 53, p. 1574–1578, 2008.
- AMID, M.; MANAP, M. Y. A. Purification and characterisation of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. Food Chemistry, v.165, p. 412–418, 2014.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. Journal of Chromatography A, v. 1238, p. 1-10, 2012.
- ASOODEH, A.; CHAMANIC, J.; LAGZIANA, M. A novel thermostable, acidophilic α amylase from a new thermophilic “*Bacillus sp, Ferdowsicus*” isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. International Journal of Biological Macromolecules, v.46, p.289-297, 2010.
- AZNAR, M. Equilíbrio líquido-vapor de sistemas com eletrólitos via contribuição de grupo, PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1996.
- BAGHERI, A.; KHODARAHMI, R.; MSTAFAIE, A. Purification and biochemical characterization of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. Food Chemistry, v. 161, p. 270-278, 2014.
- BARBOSA, A. A. OBTENÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO DE SISTEMAS AQUOSOS FORMADOS POR PEG, SULFATO E ÁGUA E PARTIÇÃO DE ANTOCIANINA DO JAMELÃO. Itapetinga – BA: UESB, p. 74, 2013, (Dissertação– Mestrado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Processos de Alimentos).

- BARBOSA, A. A.; BONOMO, R. C. F.; MARTINS, C. V.; FONTAN, R. C. I.; JÚNIOR, E. C. S.; MINIM, L. A.; PIGNATA, M. C. Equilibrium Data and Physical Properties of Aqueous Two Phase Systems Formed by PEG (1500 and 4000) g·mol⁻¹ + Sodium Sulfate + Water at Different Temperatures and pH 2. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 61, p. 3-11, 2016.
- BARRUETO, Y.; MUÑOZ, K.; GARNICA, K.; VILLALOBOS, I.; JIMENEZ, Y. P. Aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 4000 and sodium molybdate at different temperatures, *Fluid Phase Equilibria*, v. 399, p. 66–73, 2015.
- BCC RESEARCH. Global Markets for enzymes in industrial applications. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>. Acesso em 10/05/2016.
- BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Purificação de amilases de malte de Zea mays, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 30, p. 218-223, 2010.
- BRADFORD. M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BONDI, A., *Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Gases*, New York, Wiley, p. 89, 1968.
- BRASIL. Aprova o Regulamento Técnico que aprova o uso dos aditivos alimentares, coadjuvantes de tecnologia, estabelecendo suas funções e limites, e veículos para suplementos vitamínicos e ou minerais. Resolução RDC no 24. de 15 de fevereiro de 2005, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União, Brasília, 16 de fevereiro de 2005.
- CARVALHO, C. C.; COIMBRA, J. S. R.; COSTA, I. A. F.; MINIM, L. H.; MAFFIA, M. C. Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278.15 to 318.15) J. *Chem. Eng. Data*, v. 52, p. 351-356, 2007.
- CARVALHO, C. Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol. Sais e Água. Dissertação de Mestrado. Departamento de Tecnologia de Alimentos. UFV. Viçosa, 2004.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL. S. Extraction of protease from calotropis procera latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1148-1155, 2010.

- CHAKRABORTY, A.; SEN, K. Impact of pH and temperature on the phase diagrams of different aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography*, v. 1433, p. 41-55, 2016.
- COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L.A.; MEIRELLES, A.J.A. *Uso de Sistemas Aquosos Bifásicos na Extração Líquido-Líquido*, Editora UFV, 2003.
- COIMBRA, J. S. R.; TEIXEIRA, J. *Engineering Aspects of Milk and Dairy Products*. BocaRaton. CRC Press, 2009.
- COLLA, L. M; REINEHR, C. O; COSTA, J. A. V. Applications and Production of Microbial Lipases. *Revista CIATEC – UPF*, v.4, p.1-14, 2012.
- COSTA, A. R.; COIMBRA, J. S. R.; FERREIRA, L. A.; MARCOS, J. C.; SANTOS, I. J. B.; SALDANA, M.; TEIXEIRA, J. A. C. The partitioning of bovine lactoferrin in the aqueous two-phase system containing poly (ethylene glycol) and sodium citrate. *Food and Bioproducts Processing*, v. 95, p. 118-124, 2015.
- DAHL, S. e MACEDO, E. A. The MHV2 Model: A UNIFAC-Based Equation of State Model for Vapor-Liquid and Liquid-Liquid Equilibria of mixtures with Strong Electrolytes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.31, p.1195-1201, 1992.
- DA SILVA, C. A. S.; COIMBRA, J.S.R.; ROJAS, E.E.G; TEIXEIRA, J.A.C. Partitioning of glycomacropetide in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1213-1216, 2009.
- 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.
- DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, p. 83–90, 2015.
- FENEMA, O. R. *Introducción a la Ciencia de los Alimentos*. Barcelona. Ed. Reveré. S. A, v. 1, p. 445, 1985.
- FORCINIT, I. D.; HALL, C. K.; KULA, M. R. Protein partitioning at the isoelectric point - Influence of polymer molecular-weight and concentration and protein size. *Biotechnol Bioeng*, v. 38, p. 986- 994, 1991.

FORGATY, W. K. C. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. 2. New York: Elsevier, 1990.

FUCINOS, P.; ABADIN, C. M.; SANROMAN, A.; LONGO, M. A.; PASTRANA, L.; RUA, M. L. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. *Journal of Biotechnology*, v. 117, p. 233-241, 2005.

FREDENSLUND, A.; JONES, R. L.; PRAUSNITZ J. M. Group-contribution estimation of activity coefficients in non-ideal liquid mixtures. *AIChE Journal*, v. 21, n. 6, p 1086-1099, 1975.

GANDOLFI, O. R. R. Caracterização de sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, PEG e água e aplicação na partição de α -amilase. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, UESB). p. 93, 2016.

GMEHLING, J., RASMUSSEN, P. e FREDENSLUND, AA. Vapor-Liquid Equilibria by UNIFAC Group Contribution. Revision and Extension. 2. *Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev.*, v. 21, p. 118-127, 1982.

GOMES, D. S. B. Formação e caracterização de micelas reversas de (EO)₁₃(PO)₃₀(EO)₁₃ em P-Xileno. Dissertação de Mestrado em Física Aplicada. UFV. Viçosa-MG, 2009.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN B. “Microbial α -amylases: a biotechnological perspective”. *Process Biochemistry*, v. 38. p. 1599-616, 2003.

HANSEN, H.K., RASMUSSEM, P., FREDENSLUND, AA., SCHILLER, M., GMEHLING, J., Vapor-Liquid Equilibria by UNIFAC Group Contribution. Revision and Extension. 5. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 30, p. 2355-2358, 1991.

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

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

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim. Biophys. Avta* 1508: 69-85, 2000.

HERSKOWITZ, M. e GOTTLIEB, M. UNIFAC Group Contribution Method for Silicone Compounds. *Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev.*, v.20, p.407-409, 1981.

HOUDE, A; KADEMI, A; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. *Appl Biochem Biotech*, v. 118, p. 155-170, 2004.

HUANG, Y.; WHITTAKER, A.D.; LACEY, R.E. Automation for food engineering: Food quality quantization and process control. CRC Press, 2001.

HU, M.; ZHAI, Q.; LIU, Z.; XIA, S. Liquid–Liquid and Solid–Liquid Equilibrium of the Ternary System Ethanol + Cesium Sulfate + Water at (10, 30, and 50) °C. *Journal Chemical & Engineering Data*, v.48, p.1561-1564, 2003.

JOHANSSON, G.; ANDERSON, M.; AKERLUND, H.E. Counter distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands. *Journal of Chromatography*, v. 289, p. 483-493, 1984.

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

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.

KHEMAKHEM, B.; FENDRI, I.; DAHECH, I.; BELGHUITH, K.; KAMMOUN, R.; MEJDOUB, H. Purification and characterization of a maltogenic amylase from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds using the Box Benken Design (BBD). *Industrial Crops and Products*, v. 43, p. 334–339, 2013.

KIKIC, I., FERMEGLIA, M. UNIFAC prediction of vapor-liquid equilibria in mixed solvent-salt systems. *Chemical Engineering Science*, v. 2, n. 11, p. 2775-2780, 1991.

KRONER, K.H.; HUSTEDT, H.; GRANDA, S.; KULA, M.R. Technical aspects of separation using aqueous two-phase systems in enzyme isolation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 20, p. 1967-1988, 1978.

KUMARI, A.; SINGH, V. K.; FITTER, J.; POLEN, T.; KAYASTHA, A. M. α -Amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds – Purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. *Phytochemistry*, v. 71, p. 1657-1666, 2010.

LANGMUIR, I. The Distribution and Orientation of Molecules. 3rd Colloid Symposium Monograph. The Chemical Catalog Co., Inc., New York, 1925.

LEMOS, L. R.; PATRÍCIO, P. R.; RODRIGUES, G. D.; CARVALHO, R. M. M.; SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M. Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene oxide) 1500 and different electrolytes ((NH₄)₂SO₄, ZnSO₄ and K₂HPO₄): Experimental and correlation. *Fluid Phase Equilibria*, v. 305, p. 19–24, 2011.

- LI, S.H.; HE, C.Y.; LIU, H.W.; LI, K.; LIU, F. 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.
- 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.
- LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Two-step process for initial capture of plasmid DNA and partial removal of RNA using aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 45 (8), p. 1432-1436, 2010.
- LU, S.; ANSETH, K.S. Release behavior of high molecular weight solutes from poly(ethylene glycol)-based degradable networks. *Macromolecules*, v. 33, p. 2509-2515, 2000.
- MACEDO, E.A., WEIDLICH, U., GMEHLING, J., RASMUSSEN, P., Vapor-Liquid Equilibria by UNIFAC Group Contribution. Revision and Extension. 3, *Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev.*, v. 22, p. 676-678, 1983.
- MAGNUSSEN, T.; RASMUSSEN, P.; FREDENSLUND, A. UNIFAC Parameter Table for Prediction of Liquid-Liquid Equilibria. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, v. 20, p. 331-339, 1981.
- MARTÍNEZ-ARAGÓN M, BURGHOFF S, GOETHEER ELV, DE HAAN AB. Guidelines for solvent selection for carrier mediated extraction of proteins. *Separation and Purification Technology*, v. 65, p. 65-72, 2009.
- MARTINS, J. P. Partição de cianocomplexos em sistemas aquosos bifásicos com diferentes balanços hidrofílico-lipofílicos. *Dissertação (Mestrado em Agroquímica)*. UFV, 2008.
- MARTINS, J. P. Diagramas de sistemas ternários formados por polímero ou copolímero tribloco. sal e água. e partição de proteínas do soro do leite. *Tese (Doutorado em Agroquímica)*. UFV, p. 154, 2010.
- MERCHUK, J.C.; ANDREWS. B.A.; ASENJO, J.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. v. 711, p. 285-293, 1998.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

- MURARI, G. F.; PENIDOA, J. A.; MACHADO, P. A. L.; LEMOS, L. R.; LEMES, N. H. T.; VIRTUOSO, L. S.; RODRIGUES, G. D.; MAGESTE, A. B. Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol + ammonium sulfate + water: equilibrium data and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilibria*, v. 406, p. 61–69, 2015.
- NANDINI, K. E.; RASTOGI, N. K. Liquid-Liquid extraction of lipase using aqueous twophase system. *Food Bioprocess Technology*, v. 4, p. 295-303, 2011.
- NUCCI, H.D.; NERLI, B.; PICO, G. Comparison between the thermodynamic features of a 1-antitrypsin and human albumin partitioning in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol–dextran. *Biophys Chem*, v. 89, p. 219–29, 2001.
- OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. *Journal of Science of Food and Agriculture*, v. 69, p.109-115, 1995.
- OLIVEIRA, R. M. *et al.* Liquid–liquid equilibria of biphasic systems composed of sodium citrate + polyethylene (glycol) 1500 or 4000 at different temperatures. *J ChemEng Data.*; v. 53, p. 895-9, 2008.
- OLIVEIRA, A. C. Modelo de contribuições de grupos aplicado a reações para a formação do biodiesel. Dissertação (Mestrado). UFSCar. p. 106, 2010.
- OISID, T.; PRAUSNITZ, J.M. "Estimation of Solvent Activities in Polymer Solutions using a Group Contribution Method", *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, v. 17, p. 333- 339, 1978.
- PADILHA, G. S; FERREIRA, J. F; ALEGRE, R. M; TAMBOURGI, E. B. Efeito do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. São Paulo – SP: UNICAMP, v. 33, n. 1, p. 1-4, 2011.
- PATRÍCIO, P. R.; MAGESTE, A. B.; LEMOS, L. R.; CARVALHO, R. M. M.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H. Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO + organic salts + H₂O and PPO + organic salts + H₂O aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilib*, v. 305, p. 1–8, 2011.
- PEREZ, B.; MALPIEDI, L. P.; TUBÍO, G.; NERLI, B.; FILHO, P. A. P. Experimental determination and thermodynamic modeling of phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing biodegradable salts. *J. Chem. Thermodynamics*, v. 56, p. 136–143, 2013.

- PERUMALSAMY, M.; MURUGESAN, T. Prediction of liquid–liquid equilibria for PEG 2000–sodium citrate based aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v. 244, p. 52–61, 2006.
- PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. São Paulo. SP: Editora Manole, 2005.
- PICÓ, A.; COLAVIZZA, D.; BENAÏSSA, M.; MAES, P.; TARTAR, A.; MONTREUIL, J.; SPIK, G. 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, 2006.
- PINTO, C.N. Otimização de parâmetros de interação do modelo UNIFAC-VISCO de misturas de interesse para a indústria de óleos essenciais. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga, p. 87, 2015.
- PORFIRI, M. C.; MILATICH, E. J.; FARRUGGIA, B. M.; ROMANINI, D. Production of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* for several industrial applications in a single step. *Journal of Chromatography B*, v. 1022, p. 87–92, 2016.
- PORFIRI, M. C.; PICÓ, G.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B. *Aspergillus oryzae* alphaamylase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, p. 7–13, 2011.
- PRAUSNITZ J. M. *Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria*. 2 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1986.
- REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. C., POLING, B. C. *The Properties of Gases & Liquids*, 4^a Ed., p. 357-372, 1987.
- RENGIFO, A. F. C. Determinação das forças motrizes de formação e partição em sistemas aquosos bifásicos macromolécula + sal. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Viçosa, p. 89, 2015.
- RENGIFO, A. F. C; FERREIRA, G. M. D; FERREIRA, G. M. D; SILVA, M. C. H; SILVA, L. H. M. Phase diagrams. densities and refractive indexes of poly(ethylene oxide) + organic salts + water aqueous two-phase systems: Effect of temperature. anion and molar mass. *Fluid Phase Equilibria*, v. 406, p. 70–76, 2015.
- REGUPATHI, I.; SHREELA, M.; GOVINDARAJAN, R.; AMARESH, S. P.; MURUGESAN, T. Liquid-Liquid Equilibrium of Poly(ethylene glycol) 6000 + Triammonium Citrate + Water Systems at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, v. 54, p. 1094–1097, 2009.

- ROBERTS, S. M.; TURNER, N. J.; WILLETS, A. J.; TURNER, N. K. Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organism. New York: Cambridge University Press, p. 1-33, 1995.
- RODRIGUES, L. R. M. Valorização da Fração Proteica do Soro de Queijo. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia. Departamento de Engenharia Biológica. Universidade do Minho, 2001.
- SAMPAIO, D.A; MAFRA, L.I; YAMAMOTO, C.I; ANDRADE, E.F; SOUZA, M.O; MAFRA, M.R; CASTILHOS, F. Aqueous two-phase (polyethylene glycol + sodium sulfate) system for caffeine extraction: Equilibrium diagrams and partitioning study. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 98, p. 86–94, 2016.
- SAMPAIO, V. S.; BONOMO, R. C. F.; MONTEIRO FILHO, E. S.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Physical Properties and Liquid–Liquid Equilibrium of Aqueous Two Phase Systems Containing Poly(ethylene glycol) + Potassium Chloride + Sodium Polyacrylate. *J. Chem. Eng. Data*, v. 57, p. 3651–3657, 2012.
- SANTOS, G. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, PR, p. 81, 2006.
- SANTOS, W. O. Partição de β -galactosidase em sistemas aquosos bifásicos constituídos por polietileno glicol e poliacrilato de sódio. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, p. 78, 2011.
- SARUBBO, L. A., et al. Partition of proteins in aqueous two-phase systems based on cashew-nut tree gum and poly (ethylene glycol). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, n. 5, p. 685-691, 2004.
- SELBER, K.; COLLEN, A.; HYYTIA, T.; PENTTILA, M.; TJERNELD, F.; KULA, MR. Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems. *Bioseparation*, v. 10, p. 229-236, 2001.
- SHAHRIARI, S.; TAGHIKHANI, V.; VOSSOUGH, M.; SAFE KORDI, A. A.; ALEMZADEH, I.; PAZUKI, G. R. Measurement of partition coefficients of β -amylase and amyloglucosidase enzymes in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and Na₂SO₄/KH₂PO₄ at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, v. 292, p. 80-86, 2010.
- SILVA, C. A. S. Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), UFV, p. 57, 2007.

- SILVA, L. H.; MEIRELLES, A. J. A. Bovine serum albumin, α -lactoalbumin and β -lactoglobulin partitioning in poly (ethylene glycol) maltodextrin aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, v. 42, n. 3, p. 279-282, 2000.
- SILVA, R. C. Aplicação de calorimetria ao estudo da interação entre polímeros não iônicos e surfactantes iônicos. Tese de Doutorado em Química. UNICAMP, Campinas-SP, 2002.
- SILVA, R. M. M. Propriedades Termofísicas de Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol. Sulfato de Lítio e Água. Viçosa – MG: UFV, p. 88, 2005.
- SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. 1 – α -Amylases. The current evolution of Biotechnology Bioengineering, p. 3–24, 2017.
- SIONGCO, K. R.; LERON, R. B.; LI, M-H. Densities, refractive indices, and viscosities of N,N-dimethylethanol ammonium chloride-glycerol or-ethylene glycol deep eutetic solvents and their aqueous solutions. *Journal Chemical Thermodynamics*, v. 65, p. 65-72, 2013.
- SOUSA, R. C. S.; COIMBRA, J. S. R.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H.; ROJAS, E. E. G.; Vicente, A. A. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysozyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci*, v. 877, p. 2579–2584, 2009.
- SOUZA JR, E. C.; COIMBRA, J. S. R.; OLIVEIRA, E. B.; BONOMO, R. C. F. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 973, p. 84–88, 2014.
- SOUZA, R. L. Sistemas aquosos bifásicos formados por constituintes não convencionais para purificação de enzimas lipolíticas. Dissertação de doutorado, Universidade Tiradentes, p. 229, 2014.
- TESTER J. W.; MODELL M. *Thermodynamics and Its Applications*. 3 ed. Upper SaddleRiver: Prentice Hall editor, p. 557, 1996.
- TIEGS, D, GMEHLING, J., RASMUSSEN, P., E FREDENSLUND, AA., VaporLiquid Equilibria by UNIFAC Group Contribution. Revision and Extension. 4. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 26, p. 159-161, 1987.
- TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P-A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p. 1036-1043, 1985.

- TORRES, A. A. F. N. Estudo da Partição de Imunoglobulina G em Sistemas Aquosos Bifásicos Utilizando Peg/Tampão Citrato. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFC, p. 55, 2013.
- TUBÍO, G.; PELLEGRINI, L.; NERLI, B. B.; PICO, G. A. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly (ethylene glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate. *J. Chem. Eng. Data*, v. 51, p. 209-212, 2006.
- ULTRASENSITIVE Calorimetry for Life Sciences. Disponível em: Acesso em: 07 nov. 2016.
- VERNAU, J.; KULA, M. R. Extraction of Proteins from Biological Raw Materials Using Aqueous Poly(ethylene) glycol-Citrate Phase Systems. *Biotechnol. Appl. Biochem*, v. 12, p. 397-404, 1990.
- WILSON, G.M.; DEAL, C.H. Activity coefficients and molecular structure. Activity coefficients in changing environments - Solutions of groups, *I&EC Fundamentals*, v. 1, n 1, p. 20-23, 1962.
- XIE, F.; QUANA, S.; LIU, D.; MA, H.; LI, F.; ZHOU, F.; CHEN, G. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. *Process Biochemistry*, v. 49, p. 47–53, 2014.
- ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R.; HAMIDI, A. A. Liquid–liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and sodium citrate: experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib*, v. 219, p. 149–155, 2004.
- ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib*, v. 181, p. 95-112, 2001.
- ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; JAFARI, P. Phase diagrams for liquid–liquid and liquid–solid equilibrium of the ternary polyethylene glycol + di-sodium hydrogen citrate + water system. *Fluid Phase Equilib*, v. 337, p 224–233, 2013.
- ZARKARIAN, J.A., ANDERSON, F.E., BOYD, J.A., PRAUSNITZ, J.M. UNIFAC Parameters from Gas-Liquid Chromatographic Data. *Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev.*, v.18, p.657-661, 1979.
- ZASLAVSKY, B. Y. Aqueous Two-Phase Partitioning. Physical chemistry and bioanalytical applications. New York: Marcel Decker Inc, 1994.
- ZASLAVSKY, B. Y. Aqueous Two-Phase Partitioning. Physical chemistry and bioanalytical applications. New York: Marcel Decker, p. 696, 1995.